

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica**

**Avaliação da avidez de anticorpos induzidos por imunização de camundongos  
com formulações baseadas em antígenos de *Plasmodium vivax***

**Camila Verholeak Maffetano**

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo  
2023

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Irene da Silva Soares que abriu as portas de seu laboratório para o meu projeto de Iniciação Científica e me orientou dentro desse mundo importante de pesquisa acadêmica. Sou eternamente grata por todos os ensinamentos e pela oportunidade de crescimento que me ofereceu durante esse período.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste projeto, incluindo a bolsa de Iniciação Científica.

À toda equipe do Laboratório de Parasitologia Clínica da FCF/USP, mestre e técnica Kátia Sanches Françoso, Dra. Tatiane Oliveira e Dra. Laura Cristina Lima Diniz que me auxiliaram em dúvidas e experimentos.

À amiga Nathalia Tiemi Taguchi, foi a partir da Iniciação Científica que pude te conhecer e sua amizade durante esse período me foi muito valiosa, e agradeço todo apoio em vários experimentos que realizamos juntas.

À minha mãe, Márcia Verholeak, que sempre acreditou em meu potencial e me incentivou a sempre buscar mais, a desafiar e sonhar. Sem seu apoio eu não teria chegado a esse momento.

Aos meus avós, Araci Portela Celistino Verholeak e Miguel Verholeak, que infelizmente não puderam me ver chegar à graduação, mas que sei que estão cuidando de mim e estariam orgulhosos das minhas conquistas. Sentimos falta de vocês todos os dias.

À todas as amizades que ganhei nesses últimos anos, agradeço todas as conversas, risadas, apoio. Chegamos bem longe e fico orgulhosa de todos nós.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT .....	6
LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE TABELAS .....	8
1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> .....	9
1.2. Dados epidemiológicos .....	10
1.3. Infecção por <i>P. vivax</i> .....	13
1.4. Vacinas .....	13
2. OBJETIVOS .....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1. Proteínas utilizadas.....	19
3.2. Protocolos de imunização .....	20
3.3. Expressão das proteínas bPvMSP1 <sub>19</sub> , FliC-PvCSP-VK210, FliC-PvCSP-VK247 e FliC-PvCSP- <i>P. vivax</i> -like em <i>Escherichia coli</i> .....	22
3.4. Avaliação dos títulos e avidez de anticorpos IgG induzidos pelos diferentes protocolos de imunização .....	23
4. RESULTADOS .....	24
4.1. Expressão das proteínas bPvMSP1 <sub>19</sub> , FliC-PvCSP-VK210, FliC-PvCSP-VK247 e FliC-PvCSP- <i>P. vivax</i> -like.....	24
4.2. Avaliação da magnitude dos anticorpos induzidos pelos protocolos de imunização em regime <i>prime-boost</i> homólogo .....	26
4.3. Avaliação da magnitude dos anticorpos induzidos pelos protocolos de imunização <i>prime-boost</i> heterólogo .....	28
4.4. Avaliação da magnitude dos anticorpos induzidos pelos protocolos de imunização em regime <i>prime-boost</i> homólogo e heterólogo em camundongos BALB/c .....	30
4.5. Determinação da avidez dos anticorpos IgG induzidos pelas imunizações experimentais em protocolo <i>prime-boost</i> homólogo.....	32
4.6. Determinação da avidez dos anticorpos IgG induzidos pelas imunizações experimentais em protocolo <i>prime-boost</i> heterólogo .....	33
4.7. Determinação da avidez dos anticorpos IgG induzidos pelas imunizações	

experimentais em protocolo <i>prime-boost</i> homólogo e heterólogo em camundongos BALB/c .....	35
4.8. Determinação da avidez dos anticorpos IgG induzidos pelas imunizações experimentais em protocolo <i>prime-boost</i> homólogo, três meses após a terceira dose.....	36
5. DISCUSSÃO .....	37
6. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXOS .....	48

## RESUMO

MAFFETANO, Camila Verholeak. **Avaliação da avidez de anticorpos induzidos por imunização de camundongos com formulações baseadas em antígenos de *Plasmodium vivax*.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

**INTRODUÇÃO:** Com o aumento da morbidade e mortalidade em decorrência de infecções por *Plasmodium vivax* e a sua complexidade biológica e de invasão celular, formulações vacinais contendo mais de um antígeno de diferentes estágios de infecção vêm sendo estudadas. Estudos anteriores caracterizaram a importância de proteínas como Proteína 1 de Superfície do Merozoíta, porção final de 19KDa (PvMSP1<sub>19</sub>) e Proteína Circunsporozoíta de *P. vivax* (PvCSP) como antígenos imunodominantes. **OBJETIVO:** avaliação imunoenzimática da magnitude de anticorpos IgG e avidez de soros de camundongos C57BL/6 e BALB/c imunizados previamente com uma nova proteína recombinante correspondente aos antígenos PvCSP e MSP1<sub>19</sub> fusionados em regimes *prime-boost* homólogo ou heterólogo, utilizando virus recombinantes expressando cada uma das proteínas. **MATERIAL E MÉTODOS:** As proteínas recombinantes derivadas da PvCSP e MSP1<sub>19</sub> foram obtidas individualmente a partir da expressão em sistemas heterólogos (*Pichia pastoris* ou *Escherichia coli*) e utilizadas para sensibilização das placas de ELISA. Os títulos de anticorpos IgG e avidez foram obtidos a partir de soros de camundongos previamente imunizados. **RESULTADOS:** A proteína quimérica (yPvCSP-MSP1<sub>19</sub>) foi capaz de induzir anticorpos tanto no regime de imunização homólogo como heterólogo. Quando avaliada a avidez, as maiores porcentagens de anticorpos foram obtidas com o regime heterólogo. **CONCLUSÃO:** Os resultados obtidos demonstram que a proteína quimérica é imunogênica e pode ser utilizada futuramente em uma formulação vacinal multi-antigênica e multi-estágio.

**Palavras-chave:** Vacina; *Plasmodium vivax*; Parasitologia; Imunologia; Proteína quimérica; Malária; Anticorpos; Avidez.

## ABSTRACT

MAFFETANO, Camila Verholeak. **Evaluation of the affinity antibodies induced by *Plasmodium vivax* multi-antigen based formulations in mice.** 2023. Course Conclusion Paper (Graduation) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

**INTRODUCTION:** With the increase in morbidity and mortality due to *Plasmodium vivax* infections and its biological complexity and cell invasion, vaccine formulations containing more than one antigen from different stages of infection have been studied. Previous studies have characterized the importance of proteins such as Merozoite Surface Protein 1, final portion of 19KDa (PvMSP1<sub>19</sub>) and *P. vivax* Circumsporozoite Protein (PvCSP) as immunodominant antigens. **OBJECTIVE:** Immunoenzymatic evaluation of the magnitude of IgG antibodies and avidity of sera from C57BL/6 and BALB/c mice previously immunized with a new recombinant protein corresponding to the PvCSP and MSP1<sub>19</sub> antigens fused in homologous or heterologous prime-boost regimens, using recombinant viruses expressing each of the proteins. **MATERIAL AND METHODS:** The recombinant proteins derived from PvCSP and MSP1<sub>19</sub> were obtained individually from expression in heterologous systems (*Pichia pastoris* or *Escherichia coli*) and used to sensitize the ELISA plates. IgG antibody titres and avidity were obtained from the sera of previously immunized mice. **RESULTS:** The chimeric protein (yPvCSP-MSP1<sub>19</sub>) was able to induce antibodies in both homologous and heterologous immunization regimens. When avidity was assessed, the highest percentages of antibodies were obtained with the heterologous regimen. **CONCLUSION:** The results obtained show that the chimeric protein is immunogenic and could be used in the future in a multi-antigen, multi-stage vaccine formulation.

**Keywords:** Vaccine; *Plasmodium vivax*; Parasitology; Immunology; Chimeric protein; Malaria; Antibodies; Avidity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> .....	10
Figura 2 – Casos confirmados por 1000 habitantes na América.....	11
Figura 3 – Mapa de Incidência Parasitária Anual no Brasil .....	12
Figura 4 – Esquematização da estrutura da proteína quimérica yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub> ...	19
Figura 5 - Cronograma das imunizações aplicadas em camundongos C57BL/6 e BALB/c com as formulações de interesse .....	20
Figura 6 – Perfil de eluição das proteínas por cromatografia de troca-iônica.....	25
Figura 7 – Padrão de migração das proteínas recombinantes .....	25
Figura 8 - Resposta de anticorpos totais em soros de camundongos C57BL/6 imunizados em regime de <i>prime-boost</i> homólogo.....	26
Figura 9 - Resposta de anticorpos totais contra as variantes alélicas da proteína PvCSP em soros de camundongos C57BL/6 imunizados em regime <i>prime-boost</i> homólogo.....	27
Figura 10 - Resposta de anticorpos totais em soros de camundongos C57BL/6 imunizados em regime de <i>prime-boost</i> heterólogo.....	29
Figura 11 - Resposta de anticorpos totais contra as variantes alélicas da proteína PvCSP em soros de camundongos C57BL/6 imunizados em regime <i>prime-boost</i> heterólogo .....	30
Figura 12 - Resposta de anticorpos totais em soros de camundongos BALB/c imunizados em regime de <i>prime-boost</i> homólogo e heterólogo .....	31
Figura 13 - Resposta de anticorpos totais contra as variantes alélicas da proteína PvCSP em soros de camundongos BALB/c imunizados em regime <i>prime-boost</i> homólogo e heterólogo .....	32

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Detalhamento das proteínas expressas para utilização nos protocolos de imunização e sensibilização das placas para ensaios de ELISA.....	20
Tabela 2 - Delineamento experimental em regimes <i>prime-boost</i> homólogo e heterólogo em camundongos C57BL/6 para avaliação dos títulos e avidez dos anticorpos IgG.....	21
Tabela 3 - Delineamento experimental em regimes <i>prime-boost</i> homólogo e heterólogo em camundongos BALB/c para avaliação dos títulos e avidez dos anticorpos IgG.....	22
Tabela 4 - Análise comparativa da avidez dos anticorpos contra proteínas PvMSP1 <sub>19</sub> , PvCSP em protocolo <i>prime-boost</i> homólogo em camundongos C57BL/6.....	33
Tabela 5 - Análise comparativa da avidez dos anticorpos contra proteínas PvMSP1 <sub>19</sub> , PvCSP em protocolo <i>prime-boost</i> heterólogo em camundongos C57BL/6.....	34
Tabela 6 - Análise comparativa da avidez dos anticorpos contra proteínas PvMSP1 <sub>19</sub> , PvCSP em protocolo <i>prime-boost</i> homólogo e heterólogo em camundongos BALB/c.....	36
Tabela 7 - Análise comparativa da avidez dos anticorpos contra proteínas PvMSP1 <sub>19</sub> , PvCSP em protocolo <i>prime-boost</i> homólogo em camundongos C57BL/6, na terceira dose e três meses após a terceira dose.....	37

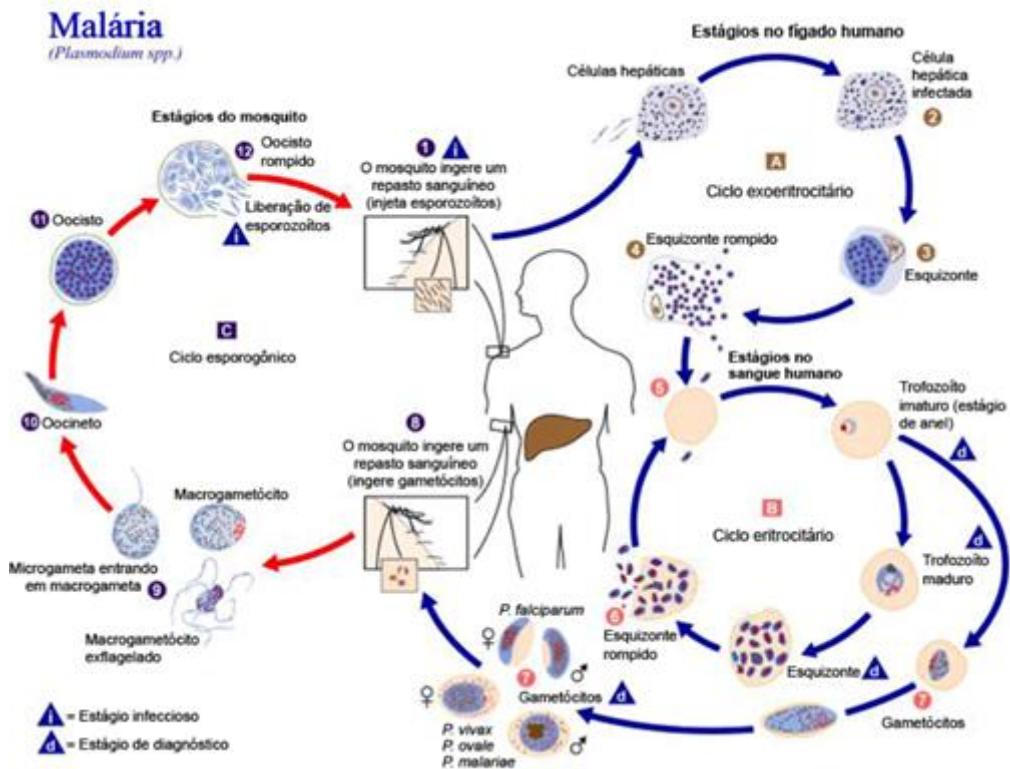
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Ciclo de vida do *Plasmodium*

A malária é uma doença parasitária causada pela infecção com protozoários patogênicos do gênero *Plasmodium*, com cinco espécies importantes: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (SATO, 2021). Entretanto, são as espécies *P. falciparum* e *P. vivax* responsáveis pelo grande impacto na saúde pública (PHILLIPS *et al.*, 2017). Esses parasitas possuem um complexo ciclo de vida que inclui a infecção em dois hospedeiros: humano e o mosquito vetor fêmea *Anopheles* (NOGUEIRA; ROSÁRIO, 2010). No Brasil há 11 espécies com importância epidemiológica na transmissão da doença, sendo o principal vetor o *Anopheles darlingi* (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2021, p. 839).

A malária é transmitida pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* (COWMAN *et al.*, 2016). É durante o repasto sanguíneo que o mosquito infectado inocula esporozoítas (estágio infectante e móvel do *Plasmodium*) que migram dos vasos sanguíneos do hospedeiro humano até os hepatócitos do fígado. É dentro do hepatócito que o esporozoíta irá gerar os merozoítas (estágio resultante da multiplicação assexuada). As células hepáticas infectadas são rompidas e os merozoítas são liberados na corrente sanguínea onde irão infectar os glóbulos vermelhos para sua replicação (estágio sintomático da doença) (PHILLIPS *et al.*, 2017).

Os sintomas se desenvolvem de 4 a 8 dias após a invasão inicial das células sanguíneas. O ciclo de replicação dos merozoítas nos glóbulos vermelhos coincide com os ciclos das febres, onde os glóbulos vermelhos infectados se lisam e liberam endotoxinas (ÂNGELO FERREIRA CHORA; MOTA; PRUDÊNCIO, 2022). Os merozoítas liberados dos glóbulos vermelhos podem continuar a replicação, mas uma fração deles se diferenciam e amadurecem em gametócitos machos e fêmeas (estágio responsável pela multiplicação sexuada). É esse estágio, junto com as outras formas do parasita disponíveis no sangue, que será ingerido pelo mosquito vetor durante sua alimentação, infectando-o (WATERS, 2016) (**Figura 1**).



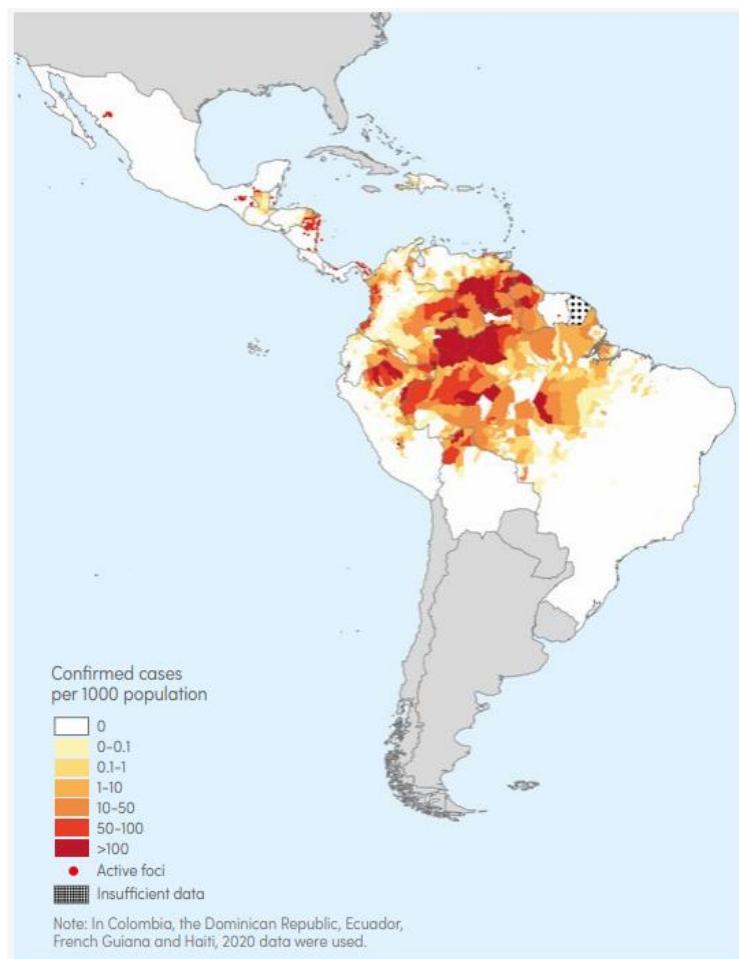
**Figura 1 – Ciclo biológico do *Plasmodium*.** Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention Image Library.

## 1.2. Dados epidemiológicos

Apesar de a malária ser evitável e tratável, ela continua a ter um impacto devastador na saúde e subsistência das pessoas no mundo, sendo considerada um dos mais sérios problemas de saúde pública (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a). Sua forma grave pode levar a internação e possivelmente óbitos. Apenas em 2021 foram estimados 247 milhões de casos de malária em 84 países endêmicos, e cerca de 619 mil pessoas morreram em consequência da doença (WHO, 2022).

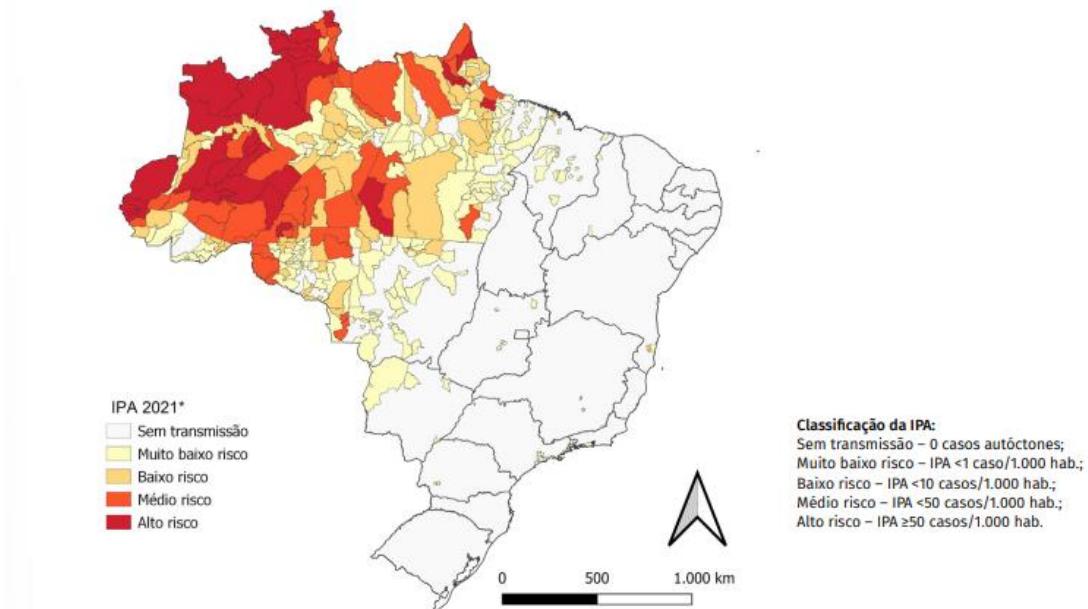
É distribuída principalmente em países e regiões tropicais e subtropicais, sendo considerada mais grave no continente Africano, concentrando cerca de 90% de todas as mortes no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). Grande parte das infecções por *P. vivax* ocorrem no Sudeste Asiático, América do Sul e África Subsaariana, sendo pouco presente e até ausente na maior parte da África (GUERRA *et al.*, 2006; WHO, 2015). Dentro das Américas, chega a representar 74,1% dos casos, segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). A Venezuela, Brasil e Colômbia somam 79% de todos os casos na região,

sendo que a maioria deles é causada pelo *P. vivax* (71,5% em 2021) (WHO, 2022) (**Figura 2**).



**Figura 2 – Casos confirmados por 1000 habitantes na América.** Fonte: WHO, 2022.

No Brasil, cerca de 99,9% da transmissão ocorre na Região Amazônica, com 33 municípios concentrando 80,0% do total de casos autóctones de malária em 2021, tendo um grande impacto em morbidade e economia (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b). O Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária utiliza a Incidência Parasitária Anual (IPA) para classificar os municípios em locais de muito baixo risco até alto risco (contabilizando apenas casos autóctones). Em 2021, a Região Amazônica apresentou 29 municípios classificados como alto risco (**Figura 3**).



Fonte: Sivep-Malaria e Sinan/SVS/MS. Excluídas lâminas de verificação de cura. Dados do Sivep-Malaria atualizados em: 14/3/2022. Dados do Sinan atualizados em: 10/3/2022.

\*Dados de 2021 são preliminares, sujeitos a alterações.

**Figura 3 – Mapa de Incidência Parasitária Anual no Brasil.** Fonte: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a.

No Brasil, podem-se associar três espécies causadoras da doença, sendo elas, *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (FUCHS, 2019). Em 2020, foram registrados 140.974 casos de malária em todo o território, sendo que 84,2% dos casos foram causados por *P. vivax* e 15,8% por *P. falciparum* (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Sendo que a Região extra-Amazônica é responsável por menos de 1% dos casos de malária, sendo os estados com maior número de casos: São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a).

O Brasil encontra-se ainda longe da fase de eliminação da malária, embora tenha como objetivo reduzir os casos em 90% até 2030 e alcançar a eliminação em todo território até 2035 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). O Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária foi instituído em 2003 e tem como objetivo: reduzir a mortalidade, reduzir os casos graves, reduzir a incidência da doença, interromper a transmissão e a manutenção da eliminação em regiões onde a meta foi alcançada (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

### **1.3. Infecção por *P. vivax***

O *P. vivax* apresenta características biológicas particulares quando comparado com as outras espécies, a primeira é que esse parasita infecta exclusivamente os reticulócitos, que possuem metabólitos que podem ser utilizados pelo parasita (SRIVASTAVA *et al.*, 2015) e a segunda é que inclui uma forma parasitária dormente nos hepatócitos, chamada de hipnozoítas, responsáveis pelas eventuais recaídas da malária (LOVER *et al.*, 2018). Estudos sugerem que em regiões de alta endemicidade, cerca de 96% dos casos de malária vivax se dá por essa forma parasitária, que pode permanecer dormente semanas a meses após a inoculação inicial (COMMONS *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, houve um aumento de casos de malária grave causada por *P. vivax*, principalmente na Índia (AUNG PYAE PHYO *et al.*, 2022). Em áreas de baixa transmissão, o *P. vivax* pode causar a doença grave, enquanto infecções recorrentes com *P. vivax* em áreas de alta transmissão estão associadas com anemia grave e mortalidade na fase aguda (DINI *et al.*, 2020).

Além disso, outras características do *P. vivax* podem contribuir como barreira para o seu controle, baseado em diagnóstico precoce e tratamento imediato (FERREIRA; CASTRO, 2016). Essa espécie pode persistir com parasitemias periféricas muito baixas, com todas as fases infecciosas do parasita circulando antes do aparecimento dos primeiros sintomas, como também pode persistir em áreas com múltiplos vetores potenciais (após controle dos vetores primários) sendo estes focos altamente resilientes (LOVER *et al.*, 2018).

### **1.4. Vacinas**

O desenvolvimento de formulações vacinais eficazes contra este parasita é, segundo a Organização Mundial de Saúde, uma prioridade global. A descoberta de novas ferramentas de controle da malária é de suma importância, já que irá preencher os vazios deixados pelas intervenções utilizadas atualmente, que inclui a distribuição de mosquiteiros, aplicação de inseticidas, desenvolvimento de novos medicamentos e inseticidas (PATH'S MALARIA VACCINE INITIATIVE, 2015) bem como, o crescimento da resistência a medicamentos, como a cloroquina, observada na maioria das áreas endêmicas, e também resistência dos mosquitos aos inseticidas (PRICE *et al.*, 2014; WHO, 2020).

Para outras doenças como catapora e coqueluche, a aplicação de vacinas ofereceu um melhor custo-efetivo e eficácia em prevenir doenças e mortes (PATH'S MALARIA VACCINE INITIATIVE, 2015). Da mesma forma, de acordo com o grupo Malaria Eradication Research Agenda (malERA) o uso da vacinação poderia controlar e até, eventualmente, eliminar a malária. As principais dificuldades em se desenvolver uma vacina contra a malária envolvem a sua complexa biologia, ciclo de vida e genoma, além do parasita conseguir evadir do sistema imunológico humano e a falta de uma imunidade estéril para a doença (LORENZ; PANAGIOTIS KARANIS, 2011).

O tamanho e complexidade genética do *Plasmodium* resultam em milhares de抗ígenos para o sistema imune em diferentes estágios do seu ciclo de vida. Entender cada抗ígeno é extremamente necessário para determinar quais pode ser um alvo útil para o desenvolvimento de uma vacina.

Imunizações que contém esporozoítas atenuados por irradiação mostraram induzir proteção em modelos animais e no homem (HOFFMAN *et al.*, 2002) e, atualmente, há esforços em se desenvolver uma vacina de alta eficácia para *P. falciparum* com esporozoítas atenuados por irradiação (SAID JONGO *et al.*, 2023). Entretanto, uma vacina desse método não é uma opção para *P. vivax*, devido à impossibilidade de se cultivar essa espécie *in vitro* (YADAVA *et al.*, 2007).

Entretanto, protocolos baseados na utilização de proteínas chave no processo de entrada do parasita nas células alvo vêm demonstrando resultados promissores, induzindo elevada resposta humoral e celular (DE ALMEIDA *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2021). Até o momento, apenas duas vacinas contra malária foram aprovadas, enquanto outras permanecem em testes clínicos. A primeira vacina aprovada, chamada de RTS,S, produzida por GlaxoSmithKline (GSK) é baseada na Proteína de Superfície do Circunsporozoíta (CSP) do *P. falciparum*, uma proteína abundante na superfície dos esporozoítas na fase pré-eritrocítica (COHEN *et al.*, 2010) e é utilizada principalmente em áreas de grandes riscos, sendo importante sua administração combinada com outras ferramentas (RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP, 2014; OUATTARA; LAURENS, 2015). Essa vacina, conhecida como Mosquirix, reduziu significativamente os casos de malária e a sua forma grave entre crianças jovens. Até março de 2023, cerca de 1,3 milhões de crianças receberam pelo menos 1 dose da vacina através do programa implementado pela OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2023).

Agora, em 2023, a OMS recomendou o uso de uma nova vacina, a R21/Matrix-M, para a prevenção de malária em crianças, também baseada na proteína CSP do *P. falciparum*. Em áreas de alta transmissão, o uso da vacina R21 resultou na diminuição de casos sintomáticos de malária em 75% durante 12 meses após a aplicação de 3 doses. Esse esquema vacinal apresenta uma eficácia de 66%, sendo aplicado uma quarta dose após um ano para manter a eficácia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023).

Entretanto, tais vacinas têm como alvo apenas o *P. falciparum*, o mesmo alvo de muitas outras vacinas ainda sendo testadas. De acordo com o site “ClinicalTrials.gov”, no momento há cerca de 145 estudos ativos para desenvolver uma vacina contra o *P. falciparum*, apenas 11 estudos ativos para uma vacina contra o *P. vivax*.

Assim, poucas vacinas têm como alvo o *P. vivax* e a maioria se encontra em testes pré-clínicos. Poucos estudos passaram para a fase clínica, como exemplo: vacina utilizando a proteína PvDBP1I em fase I/IIa, proteína Pvs25 em fase I e proteína PvCSP em fase I/IIa, de acordo com o site “ClinicalTrials.gov”. Entretanto, esse atraso no desenvolvimento de uma vacina para esta espécie se deve, principalmente, ao equívoco de que a infecção causada pela *P. vivax* é relativamente benigna. Durante a última década, muitos estudos comprovaram que a infecção causada por *P. vivax* traz severas complicações clínicas e números consideráveis de óbito, sendo que alguns estudos que foram conduzidos na Índia e Papua Nova Guiné demonstraram uma forte associação entre a infecção causada por *P. vivax* e doença grave e morte (RAHIMI *et al.*, 2014).

A complexidade da invasão dos reticulócitos e a rápida evolução de novas variantes de抗ígenos garantem o desenvolvimento de vacinas com mais de um抗ígeno (ROCHA *et al.*, 2017; LAURENS, 2018). Pensando em aprimorar a eficácia das vacinas incluiu-se o desenvolvimento de novas formulações direcionadas a mais de um estágio da infecção e diferentes抗ígenos combinados.

Dentre os principais抗ígenos considerados para a formulação vacinal, a proteína CSP se destacou principalmente por estar presente em todas as espécies de *Plasmodium* e pela sua grande quantidade na superfície do parasita (RATHORE *et al.*, 2002). Além de atuar na invasão nos hepatócitos, possui uma alta imunogenicidade (EDILENE *et al.*, 2021) e é por essa razão que ela foi a primeira

proteína a ser usada em diferentes vacinas e ainda se configura a principal candidata para uma vacina pré-eritrocítica (YOUNG *et al.*, 1985).

A proteína CSP pode ser fragmentada em três regiões: região N-terminal, região central de repetição, e a região C-terminal (PLASSMEYER *et al.*, 2009). A região central de repetição da proteína CSP do *P. vivax* apresenta três alelos variantes e epítópos imunodominantes para células B (HERRINGTON *et al.*, 1987, NARDIN *et al.*, 2000). Os dois genótipos mais comuns são VK210 e VK247, além disso, um terceiro alelo conhecido como *P. vivax-like* também é encontrado (ROSENBERG *et al.*, 1989). No Brasil, a prevalência dessas três variantes é conhecida (ARRUDA *et al.*, 2007).

Uma vacina contra *P. vivax* está em fase de testes clínicos atualmente, chamada de VMP001, utilizando uma proteína quimérica contendo sequências repetidas de VK210 e VK247, além de incluir as partes N e C-terminais. Resultados mostraram que camundongos imunizados produziram anticorpos que reconhecem os dois alelos e levaram a aglutinação de esporozoítas vivos (YADAVA *et al.*, 2007). Um estudo prévio de nosso grupo avaliou a proteína recombinante PvCSP-A/*all-epitopes* contendo as regiões conservadas N e C-terminais, como também as três variantes da PvCSP fusionadas, expressa em *E. coli*. Foi comparado a imunogenicidade de regimes de imunização homólogo e heterólogo, em que se obteve altos títulos de anticorpos reconhecendo as três formas alélicas do antígeno PvCSP, como também reconheceram esporozoítas expressando as variantes VK210 e VK247 (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Outros estudos prévios de nosso grupo demonstraram a alta imunogenicidade ao usar proteínas recombinantes representando a fusão dos três alelos da proteína (VK210, VK247 e *P. vivax-like*) e a porção C-terminal conservada expressas em *Pichia pastoris*, oferecendo uma proteção parcial em modelos de malária murina contra esporozoítas híbridos Pb/Pv-CSP expressando as três variantes da proteína PvCSP (GIMENEZ *et al.*, 2017; GIMENEZ *et al.*, 2021). Esses resultados obtidos são consistentes com o estudo realizado por Camargo e colaboradores (2018) e o estudo realizado por Lima e colaboradores (2020), em que analisou uma formulação recombinante combinando as proteínas PvAMA-1 e PvCSP (contendo as três variantes, além do N e C-terminal), em que se confirma a relação entre altos títulos de anticorpos específicos para PvCSP e proteção parcial.

Entretanto, para o contínuo desenvolvimento da vacina que tem como alvo o *P. vivax*, tem-se que pensar em抗ígenos presentes nos estágios eritrocíticos, para serem futuramente combinados com uma formulação que utiliza PvCSP. Antígenos desse estágio que têm sido alvos de estudos envolvem PvDBP, PvMSP1 ou PvAMA1 e Pv25. A proteína de superfície do merozoíta-1 (MSP1) é encontrada em abundância na superfície de merozoítas e se constitui em potencial alvo (DOBRESCU *et al.*, 2020). Durante a invasão de merozoítas às células eritrocíticas, a região C-terminal de 42kDa de MSP1 é processada em dois polipeptídeos, MSP1<sub>33</sub> e MSP1<sub>19</sub> (PvMSP1<sub>19</sub>) (BLACKMAN; WHITTLE; HOLDER, 1991). É a extremidade C-terminal de MSP1 (MSP1<sub>19</sub>) que permanece ligada à superfície do merozoíta e auxilia na invasão do eritrócito (PERERA *et al.*, 1998).

Resultados da formulação contendo a proteína PvMSP1<sub>19</sub> mostraram altos títulos de anticorpos específicos para tal proteína, mas não suficientes para controlar a parasitemia inicial no camundongo. Entretanto, um controle da parasitemia tardio junto com uma resposta inflamatória balanceada protegeu os camundongos contra o óbito, sugerindo que a resposta contra PvMSP1<sub>19</sub> pode ajudar a imunidade montada posteriormente durante uma infecção (DOBRESCU *et al.*, 2020). Além disso, um estudo do nosso grupo demonstrou que soros de camundongos BALB/c e C57BL/6 (imunizados com uma proteína químérica PvAMA1<sub>66</sub>-MSP1<sub>19</sub>) foram capazes de reagir a proteínas nativas de esquizontes maduros de *P. vivax* isolados de indivíduos infectados (ROCHA *et al.*, 2017)

Pensando nos dados obtidos de estudos anteriores que corroboram o uso de抗ígenos de diferentes estágios do parasita, e que induzem uma boa resposta imunológica, além da importância de estudos de proteínas químéricas multi-estágios para o combate da malária, é importante o planejamento de novas formulações vacinais que contenham a fusão de diferentes抗ígenos de espécies de interesse de *Plasmodium* (ROCHA *et al.*, 2017). Uma nova proteína químérica foi produzida pela fusão de dois抗ígenos importantes, PvCSP e PvMSP1<sub>19</sub>, e é alvo do estudo em questão, sendo utilizada em formulações onde se busca estimar a resposta imunológica e colaborar para o desenvolvimento de uma vacina universal e eficaz contra o *P. vivax*.

Para avaliar a efetividade vacinal de uma nova formulação, testes específicos são necessários, tais como a avaliação dos diferentes subtipos de anticorpos induzidos e/ou a avidez dos anticorpos frente aos seus抗ígenos. Para potencializar

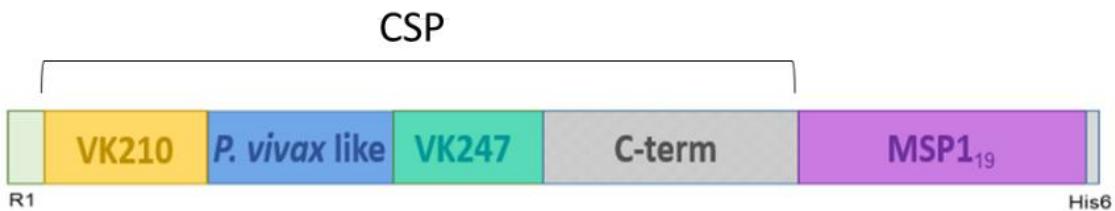
a resposta vacinal, diferentes adjuvantes vêm sendo testados (PASQUALE *et al.*, 2015) para acelerar e prolongar uma resposta imune específica, aprimorando a imunogenicidade de antígenos “fracos” (DIDIERLAURENT *et al.* 2016). Para uma boa resposta imunológica contra antígenos da fase pré-eritrocítica da malária é necessário a indução de uma resposta imune humoral e celular. Assim, adjuvantes podem ativar o sistema imune aumentando a resposta adaptativa da vacina (DIDIERLAURENT *et al.*, 2016). A utilização do adjuvante Poly (I:C) se mostrou efetiva na indução de potentes anticorpos e uma resposta Th1 em vacinas que continham o antígeno CSP (TEWARI, *et al.*, 2010), como também por ser um agonista de TLR3, seu uso ofereceu proteção parcial em camundongos imunizados com duas formulações baseadas em PvCSP contendo as três variantes (uma contendo também a região C-terminal e outra contendo as regiões N e C-terminal) e desafiados com esporozoítas Pb/Pv (LIMA *et al.*, 2020). Foi visto que camundongos vacinados com uma formulação contendo o adjuvante Poly(I:C) resultou em títulos de IgG altos e duradouros (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Em relação à avidez, estudos envolvendo a vacinação de camundongos com a proteína recombinante PvMSP1<sub>19</sub> de *P. vivax* fusionada ao epítopo PADRE (Pan-Allelic-DR-Epitope) e à flagelina de *Salmonella* (His<sub>6</sub>-FliC-PvMSP1<sub>19</sub>-PADRE) mostraram que os anticorpos anti-PvMSP1<sub>19</sub> induzidos pela imunização apresentaram um avidez superior do que aqueles induzidos na infecção de camundongos controle. Além disso, após 10 dias de infecção, a ligação ao antígeno é显著mente mais forte, podendo esse acréscimo ser necessário para uma atividade inibidora da invasão e, assim, conferir proteção (DOBRESCU *et al.*, 2020).

Um estudo envolvendo a vacinação de camundongos com a proteína recombinante PvCSP (em regime homólogo e heterólogo) apresentou uma avidez média de 42-58% dos anticorpos induzidos, podendo indicar uma avidez alta para a ligação antígeno-anticorpo (CAMARGO *et al.* 2018). Esse mesmo resultado é encontrado no trabalho de Moon *et al.* (2012), em que a mesma porcentagem de avidez foi capaz de aglutinar esporozoítas de *P. vivax*.

O presente estudo avaliou a avidez dos anticorpos induzidos por uma imunização vacinal com uma formulação contendo uma proteína quimérica (yPvCSP-MSP1<sub>19</sub>) composta pela fusão de dois antígenos de dois estágios de vida do *P. vivax* (**Figura 4**), constituída pelas regiões de repetição centrais da CSP fusionadas e a região C-terminal, antígeno da fase pré-eritrocítica do ciclo,

necessária para a invasão das células hepáticas (LÓPEZ *et al.* 2017), além da proteína MSP1<sub>19</sub>, antígeno da fase eritrocítica (HIRUNPETCHARAT *et al.* 1997).



**Figura 4 – Esquematização da estrutura da proteína quimérica yPvCSP-MSP1<sub>19</sub>.** Figura de elaboração própria

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho visa o desenvolvimento de diferentes formulações vacinais para a imunização de camundongos C57BL/6 e BALB/c em diferentes regimes (homólogo e heterólogo utilizando adenovírus recombinantes AdC68-PvCSP e AdHu5-PvMSP1<sub>19</sub>) e posterior avaliação da capacidade de indução e avidez de anticorpos IgG anti-*P.vivax*.

Assim, destaca-se:

- Expressão e purificação das proteínas recombinantes bPvMSP1<sub>19</sub> e FliC-PvCSP-repeats a partir de bactérias *E. coli* para utilização nos ensaios imunoenzimáticos;
- Avaliação comparativa dos títulos e avidez de anticorpos IgG induzidos previamente por imunização de camundongos C57BL/6 e BALB/c com formulações contendo a proteína quimérica yPvCSPAll<sub>ct</sub>-PvMSP1<sub>19</sub> ou formulações contendo as proteínas yPvCSPAll<sub>ct</sub> e bPvMSP1<sub>19</sub> isoladas ou em combinação (mix) através de ensaios imunoenzimáticos.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Proteínas utilizadas

Durante a execução deste projeto, foram utilizadas sete proteínas diferentes, contemplando: proteína quimérica, proteína PvCSP e suas variantes (PvCSP-VK210, PvCSP-VK246, PvCSP-*P. vivax-like*), proteína PvMSP1<sub>19</sub> e proteína PvCSP-*No repeats* (englobando apenas as regiões N- e C-terminais). As proteínas quimérica, PvCSP e PvCSP-*No repeats* foram previamente disponibilizadas,

enquanto que as proteínas PvMSP1<sub>19</sub> e as variantes da proteína PvCSP foram expressas durante o desenvolvimento do projeto.

**Tabela 1 – Detalhamento das proteínas expressas para utilização nos protocolos de imunização e sensibilização das placas para ensaios de ELISA.**

Proteína	Sistema de Expressão	Massa Molecular
PvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	<i>Pichia pastoris</i>	~60 kDa
PvCSP	<i>Pichia pastoris</i>	50 kDa
*PvMSP1 <sub>19</sub>	<i>Escherichia coli</i>	18 kDa
*FliC-PvCSP-VK210	<i>Escherichia coli</i>	60-70 kDa
*FliC-PvCSP-VK247	<i>Escherichia coli</i>	60-70 kDa
*FliC-PvCSP- <i>P. vivax</i> -like	<i>Escherichia coli</i>	60-70 kDa
PvCSP-No repeats	<i>Escherichia coli</i>	~20 kDa

Proteínas utilizadas durante a execução do projeto. Aquelas representadas com “\*” foram expressas durante o projeto.

### 3.2. Protocolos de imunização

Os soros utilizados procederam de imunizações prévias de camundongos fêmeas C57BL/6 e BALB/c, (6 a 8 semanas) com formulações contendo a proteína quimérica yPvCSP-PvMSP1<sub>19</sub>, yPvCSP e bPvMSP1<sub>19</sub> isoladas ou em co-administração, na presença do adjuvante Poly(I:C), ou intercaladas com doses de vetores virais (AdC68-PvCSP e AdHu5-PvMSP1<sub>19</sub>) previamente gerados (dados não publicados), a cada 21 dias, por via subcutânea, conforme apresentado pelo esquema na **Figura 5**. O delineamento experimental está detalhado na **Tabela 2** para camundongos C57BL/6 e **Tabela 3** para camundongos BALB/c.

A esquematização da imunização e obtenção dos soros foram parte do projeto da pós-doutoranda Laura Cristina Lima Diniz, aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da FCF USP (CEUA/FCF 054.2021 – CEUA P614).



**Figura 5 - Cronograma das imunizações aplicadas em camundongos C57BL/6 e BALB/c com as formulações de interesse.** Figura de elaboração própria.

**Tabela 2 - Delineamento experimental em regimes *prime-boost* homólogo e heterólogo em camundongos C57BL/6 para avaliação dos títulos e avidez dos anticorpos IgG.**

Protocolo	Grupo	Abreviação	Prime	Boost 1	Boost 2
<b>Homólogo</b>	1	-	Poly (I:C)	Poly (I:C)	Poly (I:C)
	2	P/P/P yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>
	3	P/P/P yPvCSP	Poly (I:C) + yPvCSP	Poly (I:C) + yPvCSP	Poly (I:C) + yPvCSP
	4	P/P/P bPvMSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + bPvMSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + bPvMSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + bPvMSP1 <sub>19</sub>
	5	P/P/P yPvCSP + bPvMSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) yPvCSP + bPvMSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) yPvCSP + bPvMSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) yPvCSP + bPvMSP1 <sub>19</sub>
<b>Heterólogo</b>	1	-	Ad-βgal	Ad-βgal	Ad-βgal
	2	Ad/Ad/P yPvCSP	AdC68-PvCSP	AdC68-PvCSP	Poly (I:C) + yPvCSP
	3	Ad/Ad/P bPvMSP1 <sub>19</sub>	AdHu5-PvMSP1 <sub>19</sub>	AdHu5-PvMSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + bPvMSP1 <sub>19</sub>
	4	P/P/Ad bPvMSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + bPvMSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + bPvMSP1 <sub>19</sub>	AdHu5-PvMSP1 <sub>19</sub>
	5	Ad/Ad/P yPvCSP + bPvMSP1 <sub>19</sub>	AdC68-PvCSP + AdHu5-PvMSP1 <sub>19</sub>	AdC68-PvCSP + AdHu5-PvMSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + yPvCSP + bPvMSP1 <sub>19</sub>
	6	Ad/Ad/P yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	AdC68-PvCSP + AdHu5-PvMSP1 <sub>19</sub>	AdC68-PvCSP + AdHu5-PvMSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>
	7	P/P/Ad yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	AdC68-PvCSP + AdHu5-PvMSP1 <sub>19</sub>
	8	Ad/P/P yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	AdC68-PvCSP + AdHu5-PvMSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>

Protocolo de imunização com intervalo de 21 dias entre cada dose, com concentrações de Poly (I:C) de 50 µg/dose, yPvCSP, bPvMSP1<sub>19</sub> e yPvCSP-MSP1<sub>19</sub> de 10 µg/dose e de adenovírus Ad-βgal, AdC68-PvCSP, AdHu5-PvMSP1<sub>19</sub> de 10<sup>8</sup> UI/dose. P/P/P corresponde a aplicação de Proteína/Proteína/Proteína; Ad/Ad/P, Adenovírus/Adenovírus/Proteína; P/P/Ad, Proteína/Proteína/Adenovírus; e Ad/P/P, Adenovírus/Proteína/Proteína.

**Tabela 3 - Delineamento experimental em regimes *prime-boost* homólogo e heterólogo em camundongos BALB/c para avaliação dos títulos e avidez dos anticorpos IgG.**

Protocolo	Grupo	Abreviação	Prime	Boost 1	Boost 2
	1	-	Poly (I:C)	Poly (I:C)	Poly (I:C)
<b>Homólogo</b>	2	<b>P/P/P yPvCSP-MSP1<sub>19</sub></b>	Poly (I:C) + yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>
	3	<b>Ad/Ad/P bPvMSP1<sub>19</sub></b>	AdHu5-PvMSP1 <sub>19</sub>	AdHu5-PvMSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + bPvMSP1 <sub>19</sub>
<b>Heterólogo</b>	4	<b>Ad/Ad/P yPvCSP-MSP1<sub>19</sub></b>	AdC68-PvCSP + AdHu5-PvMSP1 <sub>19</sub>	AdC68-PvCSP + AdHu5-PvMSP1 <sub>19</sub>	Poly (I:C) + yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>

Protocolo de imunização com intervalo de 21 dias entre cada dose, com concentrações de Poly (I:C) de 50 µg/dose, yPvCSP, bPvMSP1<sub>19</sub> e yPvCSP-MSP1<sub>19</sub> de 10 µg/dose e de AdC68-PvCSP e AdHu5-PvMSP1<sub>19</sub> de 10<sup>8</sup> UI/dose. P/P/P corresponde a aplicação de Proteína/Proteína/Proteína; e Ad/Ad/P, Adenovírus/Adenovírus/Proteína.

### **3.3. Expressão das proteínas bPvMSP1<sub>19</sub>, FliC-PvCSP-VK210, FliC-PvCSP-VK247 e FliC-PvCSP-*P. vivax*-like em *Escherichia coli***

Para a realização dos ensaios de ELISA, proteínas recombinantes foram expressas em cepas de bactérias *E. coli* BL21 previamente transformadas com plasmídeos correspondentes e cultivadas em meio LB (Luria Broth, Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) contendo antibióticos, até a obtenção de DO<sub>600</sub> 0,6-0,8, quando a cultura foi induzida com 0,1 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG, Life Technologies Corporation USA Inc.). A cultura, então, foi incubada em agitação por 4 horas, as células foram recolhidas por centrifugação e ressuspensas em tampão de sonicação fosfato-cloreto [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM) (m/v), NaCl (300 mM) (m/v), 1 mg/mL de lisozima (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) e PMSF 1 mM (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc., pH=8,0)]. O homogenato recebeu 10 pulsos ultrassônicos de 60 segundos com intervalo de 60 segundos, utilizando 50% de amplitude, a fim de romper as células e liberar as proteínas (Digital Sonifier® Cell Disruptor, Branson Ultrasonics USA Corp., Danbury, CT). Após a sonicação, as células foram recolhidas por centrifugação, descartadas e o sobrenadante foi submetido a duas

cromatografias sequenciais, a primeira por afinidade em resina Ni Sepharose™ High Performance (GE Healthcare USA Inc.) equilibrada com o tampão fosfato-cloreto, e a segunda por troca iônica utilizando a Coluna HiTrap™QFF (GE Healthcare USA Inc.), acoplada ao sistema ÄKTA. As frações contendo a proteína recombinante foram então dialisadas contra tampão PBS.

### **3.4. Avaliação dos títulos e avidez de anticorpos IgG induzidos pelos diferentes protocolos de imunização**

A avaliação dos títulos de anticorpos IgG contra as proteínas utilizadas foi realizada por meio da sensibilização de placas de 96 poços modelo *high binding* costar 3590 (Corning, Sigma-Aldrich USA Co. LLC, St Louis, MO) com 200 ng das proteínas bPvMSP1<sub>19</sub>, yPvCSP ou cada uma de suas variantes (FliC-PvCSP-No repeats, VK210, VK247 ou *P. vivax-like*) em tampão carbonato-bicarbonato [Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,01 M), NaHCO<sub>3</sub> (0,03 M), (pH=9,6)]. As placas foram incubadas “overnight” em temperatura ambiente (T.A.) e posteriormente lavadas três vezes com PBS-Tween para, assim, ser adicionado 200 µL/poço de solução leite-PBS [leite desnatado (5%) (m/v) e PBS, (pH=7,4)], por duas horas a uma temperatura de 37°C, de modo a bloquear os sítios inespecíficos. Foi desprezada a solução de bloqueio e adicionado 50 µL/poço de cada um dos soros de camundongos diluídos a partir de 1:100 em PBS-leite, seguidos de uma incubação de uma hora a T.A. Após três lavagens com PBS-Tween, foi adicionado 50 µL/poço de anticorpo secundário de camundongo anti-IgG conjugado a peroxidase (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories USA Inc.) diluído 1:3.000 em PBS-leite, sendo novamente incubado por uma hora a T.A. Após três lavagens com PBS-Tween, seguiu-se a adição da solução de revelação, em que a reação enzimática ocorreu pela adição de 1 mg/mL de o-*p*-fenilenediamina (OPD, Sigma-Aldrich USA Co. LLC) e 0,1% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck KGaA DEU Inc.) diluídos em tampão fosfato-citrato [200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.), 218 mM C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.); pH=4,8-4,9, sendo por fim, adicionado 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.) para a interrupção da reação enzimática, e leitura das placas para a determinação das DO<sub>492</sub>. Os títulos específicos foram definidos como a maior diluição com uma DO<sub>492</sub> superior a 0,1, determinada em um leitor de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA).

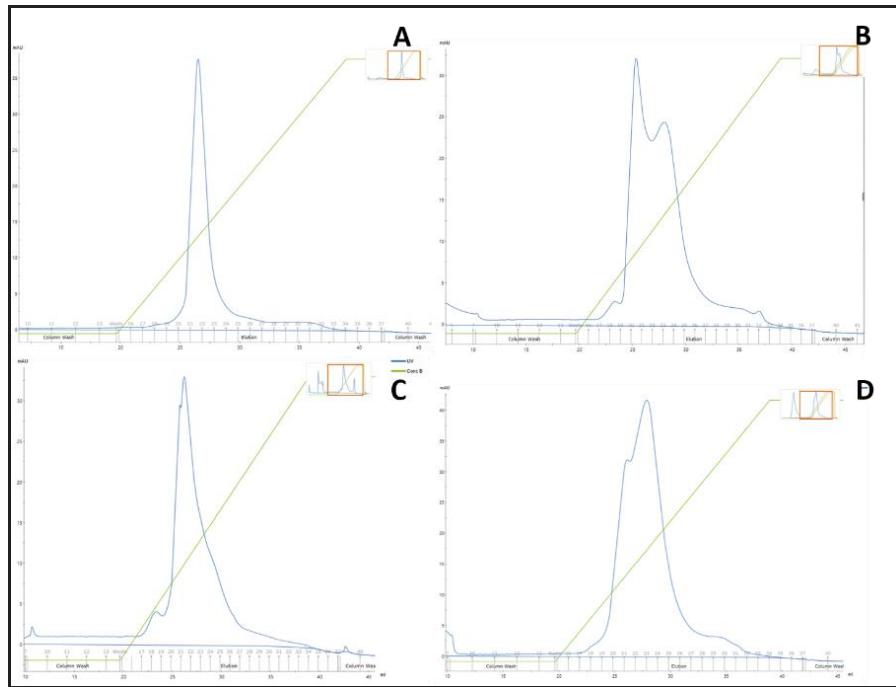
Para comparar a avidez dos anticorpos, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 200 ng de cada uma das proteínas recombinantes em tampão carbonato e seguiram o mesmo procedimento da avaliação dos títulos de anticorpos. Cada placa teste recebeu uma placa espelho, a qual foi submetida a tratamento desnaturante com solução de uréia 6M em PBS-T. A leitura das placas foi realizada em um leitor de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA) e a porcentagem de avidez foi definida como (D.O.<sub>492/630</sub> com tratamento) / (D.O.<sub>492/630</sub> sem tratamento) x 100% (DOBRESCU *et al.*, 2020).

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism para Windows, versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). As variáveis quantitativas paramétricas foram comparadas por teste t ou por One-way ANOVA com comparações múltiplas pelo teste de Bonferroni. Já as variáveis quantitativas não-paramétricas foram comparadas por teste de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas pelo teste Dunn's. O nível de significância considerado para determinar a diferença entre grupos de dados foi  $p<0,05$

#### 4. RESULTADOS

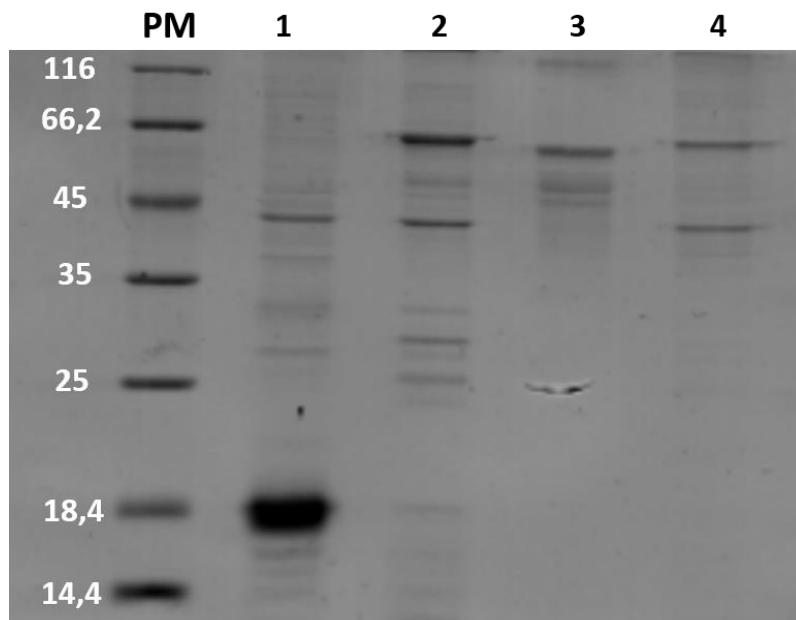
##### 4.1. Expressão das proteínas bPvMSP1<sub>19</sub>, FliC-PvCSP-VK210, FliC-PvCSP-VK247 e FliC-PvCSP-*P. vivax-like*

A expressão e purificação das proteínas foram bem-sucedidas e obtidas em rendimento/pureza de acordo com os padrões estabelecidos no laboratório, para posterior aplicação nos ensaios de ELISA. Os perfis de eluição das proteínas purificadas estão representados na **Figura 6**. O espectro U.V cromatográfico apresentou picos de absorbâncias satisfatórios, cujos maiores picos correspondem às frações das proteínas.



**Figura 6 – Perfil de eluição das proteínas por cromatografia de troca-iônica.** Gráficos de purificação por cromatografia de troca-iônica, em coluna HiTrap™QFF (GE Healthcare USA Inc.) acoplada ao sistema ÄKTA, das proteínas (A) bPvMSP1<sub>19</sub>, (B) FliC-PvCSP-VK247, (C) FliC-PvCSP-VK210 e (D) FliC-PvCSP-*P. vivax-like*.

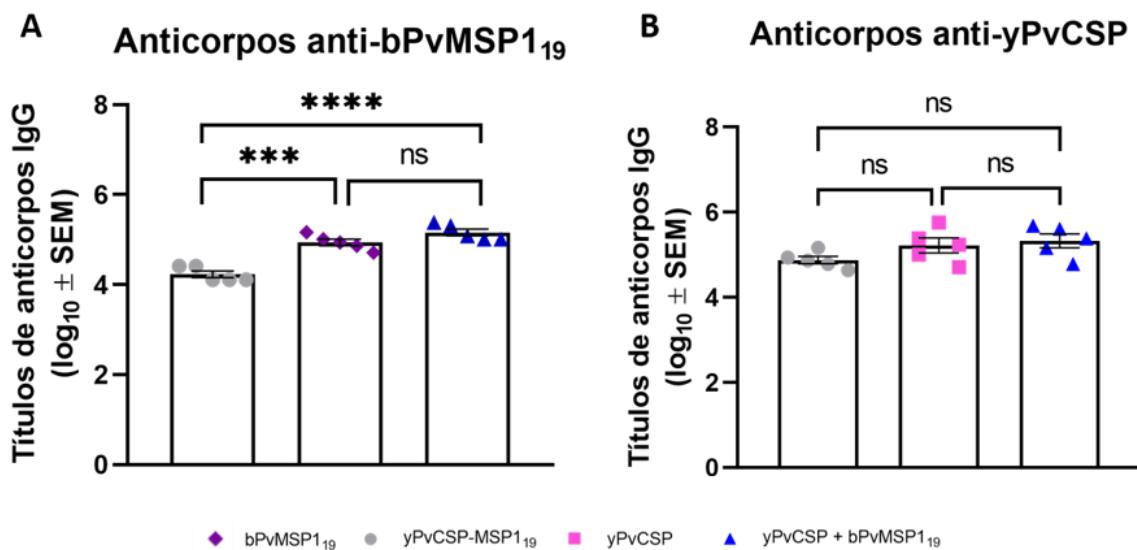
As frações coletadas durante a purificação correspondentes aos picos de eluição das proteínas foram analisadas em SDS-PAGE 12%, como demonstrado na **Figura 7**, no qual é possível observar as bandas correspondentes às proteínas expressas e seu grau de pureza.



**Figura 7 – Padrão de migração das proteínas recombinantes.** SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie, onde as canaletas representam: PM - Peso Molecular; 1 - bPvMSP1<sub>19</sub>; 2 - FliC-PvCSP-VK210; 3 - FliC-PvCSP-VK247; 4 - FliC-PvCSP-*P. vivax-like*.

#### 4.2. Avaliação da magnitude dos anticorpos induzidos pelos protocolos de imunização em regime *prime-boost* homólogo

Como demonstrado na **Figura 8A**, que a proteína quimérica foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos IgG anti-proteína bPvMSP1<sub>19</sub> ( $\log_{10}=4,23\pm0,21$ ). Entretanto, houve uma menor indução de anticorpos IgG quando essa formulação é comparada com os anticorpos produzidos pela formulação que contém a proteína individual bPvMSP1<sub>19</sub> ( $p<0,001$ ) ou as proteínas yPvCSP e bPvMSP1<sub>19</sub> em combinação ( $p<0,0001$ ) (valores de  $\log_{10}=4,93\pm0,24$  e  $\log_{10}=5,16\pm0,17$  respectivamente).

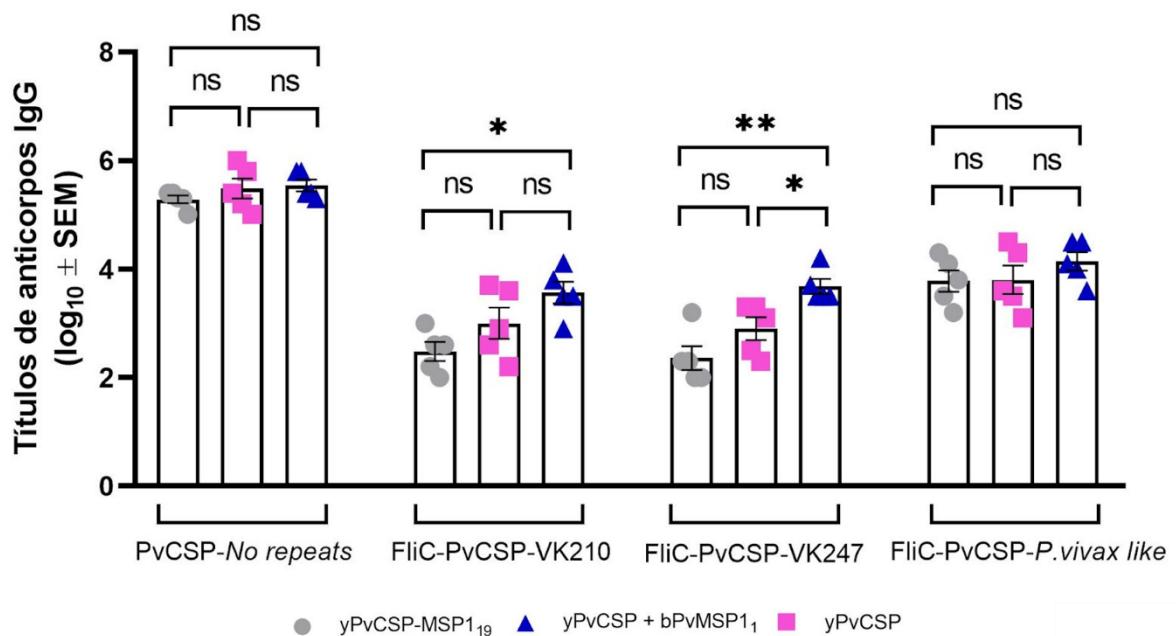


**Figura 8 - Resposta de anticorpos totais em soros de camundongos C57BL/6 imunizados em regime de *prime-boost* homólogo.** Os títulos de anticorpos IgG anti-bPvMSP1<sub>19</sub> (A) e anti-yPvCSP (B) foram analisadas por ELISA utilizando soro coletado 21 dias após a aplicação da terceira dose. Os resultados são expressos como média aritmética dos títulos de anticorpos de cada grupo experimental em  $\log_{10} \pm SEM$ . A análise foi realizada através do software (GraphPad Prism 8) utilizando o parâmetro One-Way ANOVA seguido por Tukey test para múltiplos eventos. As diferenças significativas estão destacadas por: \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ . As diferenças não significativas estão destacadas por ns ( $p>0,05$ ).

Por outro lado, quando avaliado os títulos de anticorpos contra a proteína yPvCSP (**Figura 8B**), a proteína quimérica foi capaz de induzir títulos ainda maiores de anticorpos IgG, de  $\log_{10}=4,87\pm0,26$ . Nesse caso, não houve diferenças significativas ( $p>0,05$ ) dos anticorpos induzidos pelas diferentes formulações, diferente dos resultados observados contra a proteína bPvMSP1<sub>19</sub>, o que reforça a capacidade imunogênica da formulação sendo testada aqui.

Como ressaltado anteriormente, a porção correspondente a proteína CSP é constituída pela fusão dos três alelos (VK210, VK247 e *P. vivax-like*) e a região C-

terminal. Sendo assim, avaliamos os títulos de anticorpos IgG contra as variantes alélicas da proteína PvCSP, conforme demonstrado na **Figura 9**. De acordo com os títulos de anticorpos IgG obtidos por imunização com a proteína quimérica, observamos que as porções C-terminal (avaliada no ensaio de ELISA através da proteína PvCSP-*No repeats*) e PvCSP-*P. vivax-like* foram as que apresentaram maior indução de anticorpos ( $\log_{10}=5,28\pm0,16$  e  $\log_{10}=3,78\pm0,44$ , respectivamente). As outras duas variantes, PvCSP-VK210 e PvCSP-VK247, foram as que menos induziram anticorpos, com títulos de  $\log_{10}=2,48\pm0,39$  e  $\log_{10}=2,36\pm0,49$  respectivamente.



**Figura 9 - Resposta de anticorpos totais contra as variantes alélicas da proteína PvCSP em soros de camundongos C57BL/6 imunizados em regime *prime-boost* homólogo.** Os títulos de anticorpos IgG contra as proteínas PvCSP-*No repeats*, FliC-PvCSP-VK210, FliC-PvCSP-VK247 e FliC-PvCSP-*P. vivax like* foram analisadas por ELISA utilizando soros coletados 21 dias após a aplicação da terceira dose. Os resultados são expressos como média aritmética dos títulos de anticorpos de cada grupo experimental em  $\log_{10}\pm\text{SEM}$ . A análise foi realizada através do software (GraphPad Prism 8) utilizando o parâmetro *One-Way ANOVA* seguido por *Tukey test* para múltiplos eventos. As diferenças significativas estão destacadas por: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ . As diferenças não significativas estão destacadas por ns ( $p>0,05$ ).

Analizando os resultados dos anticorpos contra a porção C-terminal e contra PvCSP-*P. vivax-like*, não houve diferença significativa nos títulos induzidos pela proteína quimérica ou pelas proteínas yPvCSP e bPvMSP1<sub>19</sub> em combinação ( $p>0,05$ ).

Já para os resultados contra a variante PvCSP-VK210, a formulação contendo a proteína quimérica resultou em uma menor indução de anticorpos quando comparada com as proteínas em combinação ( $p<0,05$ ). Contra a proteína PvCSP-VK247, a formulação contendo a proteína quimérica induziu ainda menos anticorpos quando comparada com as proteínas em combinação ( $p<0,01$ ), além de também apresentar uma menor indução de anticorpos pela formulação contendo a proteína PvCSP isolada em comparação com as proteínas em combinação ( $p<0,05$ ).

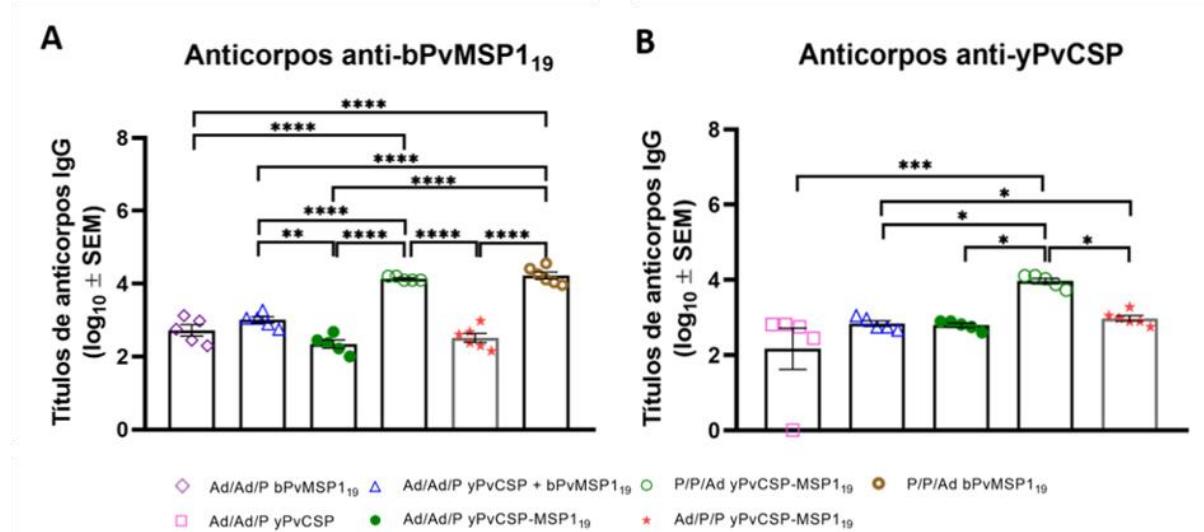
#### **4.3. Avaliação da magnitude dos anticorpos induzidos pelos protocolos de imunização *prime-boost* heterólogo**

Como demonstrado na **Figura 10A**, a proteína quimérica quando utilizada em protocolo P/P/Ad, foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos anti-bPvMSP1<sub>19</sub>, de  $\log_{10}=4,1\pm0,07$ , comparáveis aos títulos de anticorpos induzidos pela formulação contendo a proteína bPvMSP1<sub>19</sub> isolada em protocolo P/P/Ad, de  $\log_{10}=4,2\pm0,24$ . As formulações contendo a proteína bPvMSP1<sub>19</sub> isolada em protocolo Ad/Ad/P ( $p<0,0001$ ) e as proteínas yPvCSP e bPvMSP1<sub>19</sub> em combinação ( $p<0,0001$ ) induziram títulos de anticorpos menores ( $\log_{10}=2,72\pm0,35$  e  $\log_{10}=3,0\pm0,23$ , respectivamente).

Entretanto, a proteína quimérica em protocolos Ad/Ad/P e Ad/P/P induziu títulos menores de anticorpos de  $\log_{10}=2,34\pm0,24$  e  $\log_{10}=2,51\pm0,33$ , respectivamente, quando comparada com as proteínas bPvMSP1<sub>19</sub> isolada em protocolo P/P/Ad ( $p<0,0001$ ) e a proteína quimérica em protocolo P/P/Ad ( $p<0,0001$ ). A proteína quimérica em protocolo Ad/Ad/P também induziu títulos menores de anticorpos quando comparada com as proteínas bPvMSP1<sub>19</sub> e yPvCSP em combinação ( $p<0,01$ ).

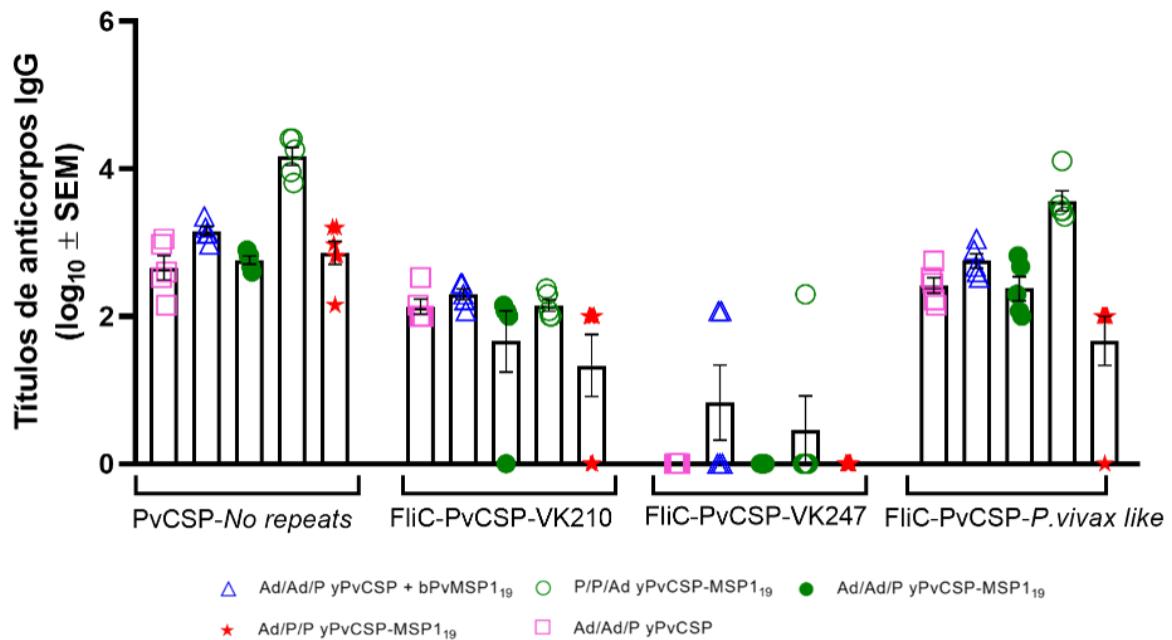
Com relação aos anticorpos contra a proteína yPvCSP (**Figura 10B**), a proteína quimérica, utilizada em um protocolo P/P/Ad, obteve altos títulos de anticorpos, com  $\log_{10}=3,9\pm0,16$ , quando comparada com os títulos de anticorpos induzidos pela formulação contendo a proteína yPvCSP isolada ( $p<0,001$ ), de  $\log_{10}=2,14\pm1,14$ , as proteínas yPvCSP e bPvMSP1<sub>19</sub> em combinação ( $p<0,05$ ), de  $\log_{10}=2,78\pm0,24$ , proteína quimérica em protocolo Ad/Ad/P ( $p<0,05$ ), de  $\log_{10}=2,73\pm0,15$  e a proteína quimérica em protocolo Ad/P/P ( $p<0,05$ ), de

$\log_{10}=2,97 \pm 0,29$  Entretanto, a formulação contendo a proteína quimérica em protocolo Ad/P/P apresentou títulos de anticorpos maiores que aqueles induzidos pela formulação contendo as proteínas em combinação ( $p<0,05$ ).



**Figura 10 - Resposta de anticorpos totais em soros de camundongos C57BL/6 imunizados em regime de *prime-boost* heterólogo.** Os títulos de anticorpos IgG anti-bPvMSP1<sub>19</sub> (A) e anti-yPvCSP (B) foram analisadas por ELISA utilizando soros coletados 21 dias após a aplicação da terceira dose. Os resultados são expressos como média aritmética dos títulos de anticorpos de cada grupo experimental em  $\log_{10} \pm SEM$ . A análise foi realizada através do software (GraphPad Prism 8) utilizando o parâmetro One-Way ANOVA seguido por Tukey test para múltiplos eventos. As diferenças significativas estão destacadas por: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ . Ad/Ad/P, Adenovírus/Adenovírus/Proteína; P/P/Ad, Proteína/Proteína/Adenovírus; e Ad/P/P, Adenovírus/Proteína/Proteína.

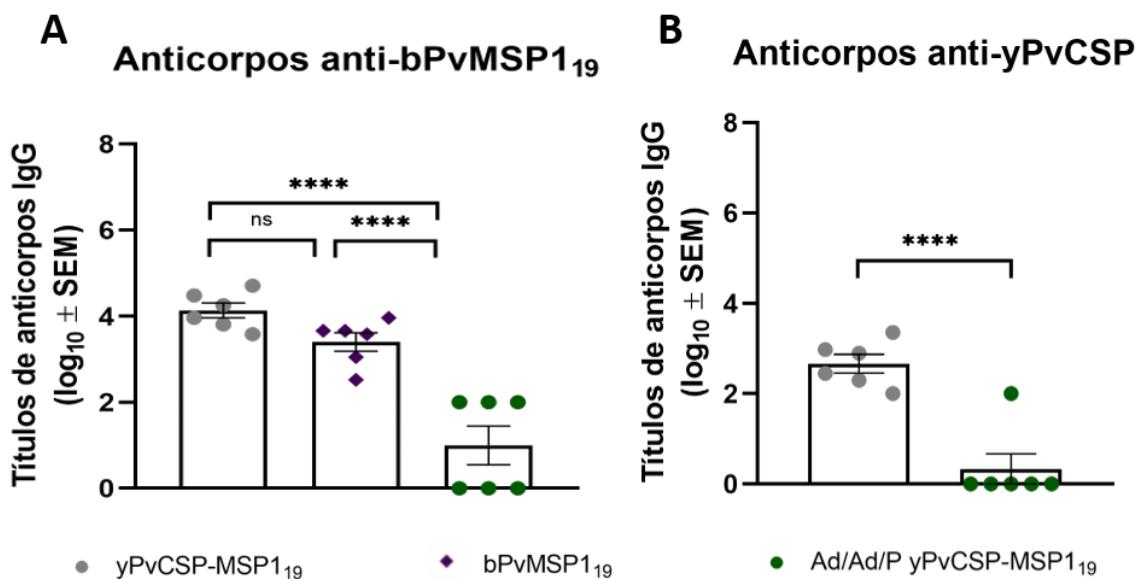
Em relação às variantes alélicas, os títulos de anticorpos IgG obtidos por imunização com a proteína quimérica em protocolo Ad/P/P, demonstraram que as porções C-terminal e PvCSP-*P. vivax-like* foram as que induziram maiores títulos de anticorpos ( $\log_{10}=2,86 \pm 0,39$  e  $\log_{10}=2,0 \pm 0,81$ , respectivamente). Em relação à imunização com a proteína quimérica em protocolo P/P/Ad e Ad/Ad/P, percebe-se que as porções C-terminal e PvCSP-*P. vivax-like* foram as que induziram maiores títulos de anticorpos ( $\log_{10}=4,2 \pm 0,37$  e  $\log_{10}=3,56 \pm 0,30$ , respectivamente), sendo para a formulação P/P/Ad e Ad/Ad/P obtidos os valores  $\log_{10}=2,76 \pm 0,13$  e  $\log_{10}=2,37 \pm 0,37$ , respectivamente (Figura 11).



**Figura 11 - Resposta de anticorpos totais contra as variantes alélicas da proteína PvCSP em soros de camundongos C57BL/6 imunizados em regime *prime-boost* heterólogo.** Os títulos de anticorpos IgG contra as proteínas PvCSP-No repeats, FliC-PvCSP-VK210, FliC-PvCSP-VK247 e FliC-PvCSP-*P. vivax* like foram analisadas por ELISA utilizando soros coletados 21 dias após a aplicação da terceira dose. Os resultados são expressos como média aritmética dos títulos de anticorpos de cada grupo experimental em  $\log_{10} \pm \text{SEM}$ . A análise foi realizada através do software (GraphPad Prism 8) utilizando o parâmetro One-Way ANOVA seguido por Tukey test para múltiplos eventos. As diferenças significativas estão destacadas por: \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001. Ad/Ad/P, Adenovírus/Adenovírus/Proteína.

#### 4.4. Avaliação da magnitude dos anticorpos induzidos pelos protocolos de imunização em regime *prime-boost* homólogo e heterólogo em camundongos BALB/c

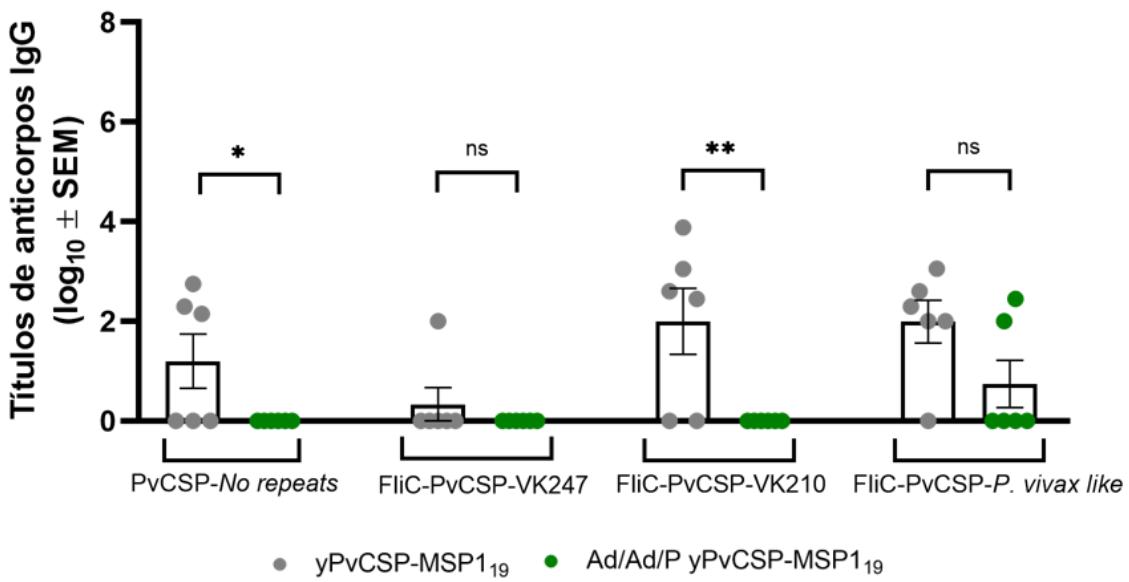
Os resultados obtidos em camundongos BALB/c demonstram que a proteína quimérica, quando utilizada em protocolo P/P/P, foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos IgG contra a proteína bPvMSP1<sub>19</sub>,  $\log_{10}=4,13 \pm 0,44$ . Entretanto, a proteína quimérica, quando utilizada em protocolo Ad/Ad/P, teve uma menor indução de anticorpos IgG, de  $\log_{10}<2,0$ , quando comparada com os anticorpos induzidos pela formulação que contém a proteína bPvMSP1<sub>19</sub> individual ( $p<0,001$ ) ou a proteína quimérica em formulação P/P/P ( $p<0,0001$ ) (valores de  $\log_{10}=3,40 \pm 0,54$  e  $\log_{10}=4,13 \pm 0,44$ , respectivamente) (Figura 12A).



**Figura 12 - Resposta de anticorpos totais em soros de camundongos BALB/c imunizados em regime de *prime-boost* homólogo e heterólogo.** Os títulos de anticorpos IgG anti-bPvMSP1<sub>19</sub> (A) e anti-yPvCSP (B) foram analisadas por ELISA utilizando soros coletados 21 dias após a aplicação da terceira dose. Os resultados são expressos como média aritmética dos títulos de anticorpos de cada grupo experimental em  $\log_{10} \pm SEM$ . A análise foi realizada através do software (GraphPad Prism 8) utilizando o parâmetro One-Way ANOVA seguido por Tukey test para múltiplos eventos. As diferenças significativas estão destacadas por: \*\*\*\*p<0,0001 e \*\*\*p<0,001. As diferenças não significativas estão destacadas por ns (p>0,05). Ad/Ad/P, Adenovírus/Adenovírus/Proteína.

Quando avaliamos os anticorpos contra a proteína yPvCSP (**Figura 12B**), a proteína quimérica, quando utilizada em protocolo P/P/P, foi capaz de induzir títulos significativos de anticorpos IgG, de  $\log_{10}=2,66 \pm 0,48$ . Entretanto, a proteína quimérica, quando utilizada em protocolo Ad/Ad/P, teve uma indução mínima de anticorpos IgG, de  $\log_{10}<2,0$ , quando comparada com os anticorpos induzidos pela formulação que contém a proteína quimérica em formulação P/P/P ( $p<0,0001$ ).

A **Figura 13**, demonstra os títulos de anticorpos IgG contra as variantes alélicas, obtidos após imunização com a proteína quimérica em um protocolo P/P/P. Os resultados revelam que as porções PvCSP-VK210 e PvCSP-*P. vivax*-like foram as que induziram maiores títulos de anticorpos ( $\log_{10}=2,0 \pm 1,55$  e  $\log_{10}=2,0 \pm 1,28$ , respectivamente). Enquanto que para a imunização com a proteína quimérica em um protocolo Ad/Ad/P, não foi expressiva para as variantes.



**Figura 13 - Resposta de anticorpos totais contra as variantes alélicas da proteína PvCSP em soros de camundongos BALB/c imunizados em regime *prime-boost* homólogo e heterólogo.** Os títulos de anticorpos IgG contra as proteínas PvCSP-No repeats, FliC-PvCSP-VK210, FliC-PvCSP-VK247 e FliC-PvCSP-*P. vivax* *like* foram analisadas por ELISA utilizando soros coletados 21 dias após a aplicação da terceira dose. Os resultados são expressos como média aritmética dos títulos de anticorpos de cada grupo experimental em  $\log_{10} \pm \text{SEM}$ . A análise foi realizada através do software (GraphPad Prism 8) utilizando o parâmetro One-Way ANOVA seguido por Tukey test para múltiplos eventos. As diferenças significativas estão destacadas por: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ . As diferenças não significativas estão destacadas por ns ( $p>0,05$ ). Ad/Ad/P, Adenovírus/Adenovírus/Proteína.

Para os resultados dos anticorpos contra PvCSP-VK247 e PvCSP-*P. vivax-like*, não houve diferenças significativas para as diferentes formulações testadas. Por outro lado, para as proteínas PvCSP-No repeats, PvCSP-VK247 e PvCSP-VK210, a resposta de anticorpos foi muito baixa utilizando a formulação Ad/Ad/P com a proteína quimérica. No que diz respeito a proteína PvCSP-No repeats e PvCSP-VK210, o protocolo P/P/P contendo a proteína quimérica apresentou títulos de anticorpos mais altos do que o protocolo Ad/Ad/P com a proteína quimérica ( $p<0,05$  e  $p<0,01$ ).

#### 4.5. Determinação da avidez dos anticorpos IgG induzidos pelas imunizações experimentais em protocolo *prime-boost* homólogo

A avidez dos anticorpos induzidos em uma imunização *prime-boost* homóloga, em sua maioria, resultou em torno de 70%, destacando-se a avidez de 94% dos anticorpos anti-PvMSP1<sub>19</sub> (a partir da imunização de camundongos utilizando-se as proteínas em combinação) e a avidez de 55% dos anticorpos anti-

PvCSP-*No repeats* (a partir da imunização de camundongos utilizando-se a proteína PvCSP).

Para as proteínas, como PvCSP e PvCSP-*No repeats*, a proteína quimérica não apresentou diferenças significativas quando comparada com as outras formulações aplicadas, apresentando uma avidez considerada alta.

A análise comparativa entre a avidez dos anticorpos obtidos a partir da formulação quimérica e dos outros grupos (**Tabela 4**), revela que os anticorpos anti-PvMSP1<sub>19</sub> induzidos pela formulação contendo a proteína quimérica apresentam avidez com valores altamente significativos ( $p<0,01$ ), quando comparados com os anticorpos induzidos pela formulação contendo as proteínas em combinação ( $p<0,05$ ).

**Tabela 4 - Análise comparativa da avidez dos anticorpos contra proteínas PvMSP1<sub>19</sub>, PvCSP em protocolo *prime-boost* homólogo em camundongos C57BL/6.**

Proteínas	Avidez (%)			
	yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	yPvCSP	bPvMSP1 <sub>19</sub>	yPvCSP+bPvMSP1 <sub>19</sub>
PvMSP1 <sub>19</sub>	84,5 ± 2,79	-	70,8 ± 8,17 **	94,6 ± 2,58 *
PvCSP	71,0 ± 7,98	61,3 ± 16,52	-	75,2 ± 10,22
PvCSP- <i>No repeats</i>	71,9 ± 13,64	55,9 ± 19,21	-	73,4 ± 11,23

A análise foi realizada através do software (GraphPad Prism 8) utilizando o parâmetro One-Way ANOVA seguido por Tukey test para múltiplos eventos. As diferenças significativas em comparação com a proteína quimérica estão destacadas por: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ .

#### **4.6. Determinação da avidez dos anticorpos IgG induzidos pelas imunizações experimentais em protocolo *prime-boost* heterólogo**

Os resultados de avidez, obtidos com a aplicação do protocolo *prime-boost* heterólogo, foram superiores ao encontrado no *prime-boost* homólogo, sendo a avidez na maioria dos grupos, em torno de 80%. Com destaque a avidez superior a 95% dos anticorpos anti-PvMSP1<sub>19</sub> produzidos pelo grupo de camundongos imunizados com a formulação contendo as proteínas em combinação, e uma avidez de 57% dos anticorpos anti-PvCSP-*No repeats* produzidos pelo grupo imunizado com a formulação contendo a proteína quimérica em um protocolo Ad/P/P (**Tabela 5**).

**Tabela 5 - Análise comparativa da avidez dos anticorpos contra proteínas PvMSP1<sub>19</sub>, PvCSP em protocolo *prime-boost* heterólogo em camundongos C57BL/6.**

Proteínas	Avidez (%)							
	Ad/Ad/P yPvCSP	P/P/Ad bPvMSP1 <sub>19</sub>	Ad/Ad/P bPvMSP1 <sub>19</sub>	Ad/Ad/P yPvCSP + bPvMSP1 <sub>19</sub>	Ad/Ad/P yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	P/P/Ad yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	Ad/P/P yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	Ad/P/P yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>
PvMSP1 <sub>19</sub>	-	84,3 ± 11,00	89,4 ± 11,65	96,7 ± 1,20	91,3 ± 4,20	82,0 ± 9,58	90,4 ± 5,61	
PvCSP	84,8 ± 8,00 ^^	-	-	87,4 ± 5,27 * / ^^^	78,2 ± 6,43 ^	71,5 ± 6,25	62,3 ± 10,51	
PvCSP-No repeats	75,2 ± 6,71	-	-	81,9 ± 9,54 ^	61,6 ± 14,95 **	89,9 ± 6,61 ^^	57,1 ± 15,40	

A dose contendo adenovírus está representada por "Ad" e a dose contendo proteína por "P". A análise foi realizada através do software (GraphPad Prism 8) utilizando o parâmetro One-Way ANOVA seguido por Tukey test para múltiplos eventos. As diferenças significativas em comparação com a proteína quimérica P/P/Ad yPvCSP-MSP1<sub>19</sub> estão destacadas por: \*p<0,05, \*\*p<0,01. As diferenças significativas em comparação com a proteína quimérica Ad/P/P yPvCSP-MSP1<sub>19</sub> estão destacadas por: ^p<0,05, ^^p<0,01, ^^^p<0,001. A análise para o grupo Ad/Ad/P yPvCSP-MSP1<sub>19</sub> não apresentou diferenças significativas. Ad/Ad/P, Adenovírus/Adenovírus/Proteína; P/P/Ad, Proteína/Proteína/Adenovírus; e Ad/P/P, Adenovírus/Proteína/Proteína.

A análise estatística da avidez dos anticorpos obtidos a partir da formulação com a proteína quimérica (P/P/Ad) e com os outros grupos revelou que os anticorpos anti-PvCSP induzidos pela formulação contendo a proteína quimérica apresentou uma avidez inferior quando comparada com os anticorpos induzidos pela formulação contendo as proteínas em combinação ( $p<0,05$ ). Já frente à porção C-terminal, a formulação contendo a proteína quimérica induziu anticorpos com uma avidez superior quando comparada com a outra formulação quimérica Ad/Ad/P ( $p<0,01$ ). Em relação à proteína PvMSP1<sub>19</sub>, não houve diferença significativa.

Como demonstrado na **Tabela 5**, comparando a formulação quimérica (Ad/P/P) com os outros grupos frente à proteína PvMSP1<sub>19</sub>, a proteína quimérica não apresentou diferenças significativas. Entretanto, contra a proteína PvCSP, a proteína quimérica induziu anticorpos com uma avidez inferior quando comparada aos anticorpos induzidos pelas formulações contendo a proteína yPvCSP isolada ( $p<0,001$ ) e as proteínas yPvCSP e bPvMSP1<sub>19</sub> em combinação ( $p<0,001$ ). Com relação, à porção C-terminal, a formulação contendo a proteína quimérica induziu anticorpos com uma avidez inferior quando comparada com os anticorpos induzidos pela formulação contendo as proteínas em combinação ( $p<0,05$ ) e em protocolo P/P/Ad ( $p<0,01$ ).

#### **4.7. Determinação da avidez dos anticorpos IgG induzidos pelas imunizações experimentais em protocolo *prime-boost* homólogo e heterólogo em camundongos BALB/c**

Os resultados de avidez de anticorpos, obtidos em imunização *prime-boost* homólogo e heterólogo de camundongos BALB/c, para a maioria dos grupos, foi de aproximadamente 60%, sendo a maior avidez de 77% para os anticorpos anti-PvMSP1<sub>19</sub>, produzidos por camundongos do grupo imunizado com a formulação contendo a proteína quimérica, e a menor avidez de 49% dos anticorpos anti-PvCSP produzidos por camundongos do grupo imunizado com a formulação contendo a proteína quimérica.

Nesse protocolo de imunização, a resposta imunológica dos camundongos imunizados com a formulação contendo a proteína quimérica utilizando-se o protocolo Ad/Ad/P foi mínima, e assim, desconsiderada na análise.

**Tabela 6 - Análise comparativa da avidez dos anticorpos contra proteínas PvMSP1<sub>19</sub>, PvCSP em protocolo *prime-boost* homólogo e heterólogo em camundongos BALB/c.**

Proteínas	Avidez (%)	
	yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	bPvMSP1 <sub>19</sub>
PvMSP1 <sub>19</sub>	77,8 ± 3,84	67,8 ± 14,06
PvCSP	49,3 ± 19,79	-
PvCSP-No repeats	62,5 ± 19,93	-

A análise foi realizada através do software (GraphPad Prism 8) utilizando o parâmetro *One-Way ANOVA* seguido por Tukey test para múltiplos eventos. Não houve diferenças significativas em comparação com a proteína químérica.

Em razão da resposta imunológica baixa dos camundongos BALB/c, a análise estatística (**Tabela 6**) apenas foi realizada em comparação com a proteína bPvMSP<sub>19</sub>, em que não se observou diferença significativa entre as duas formulações usadas.

#### **4.8. Determinação da avidez dos anticorpos IgG induzidos pelas imunizações experimentais em protocolo *prime-boost* homólogo, três meses após a terceira dose**

Os resultados de avidez, obtidos de anticorpos em imunização *prime-boost* homólogo (3 meses após a terceira dose), para a maioria dos grupos, foi de aproximadamente 80%. Pode-se destacar a avidez de 96% dos anticorpos anti-PvCSP e anti-PvMSP<sub>19</sub>, produzidos pelos animais do grupo imunizado com a formulação contendo a proteína químérica e as proteínas em combinação, respectivamente; e a menor avidez de 72% dos anticorpos anti-PvMSP<sub>19</sub> produzidos pelos animais do grupo imunizado com a formulação contendo a proteína PvMSP<sub>19</sub>.

Analizando estatisticamente a avidez dos anticorpos comparando a formulação químérica com os outros grupos, os anticorpos anti-PvMSP<sub>19</sub> induzidos pela formulação contendo a proteína químérica apresentam avidez com valores mais significativos do que os anticorpos induzidos pela formulação contendo a proteína bPvMSP<sub>19</sub> isolada ( $p<0,001$ ). Para as demais proteínas, como PvCSP e PvCSP-No repeats, a proteína químérica não apresentou diferenças significativas quando

comparada com as outras formulações aplicadas, apresentando uma avidez considerada alta (**Tabela 7**).

**Tabela 7 - Análise comparativa da avidez dos anticorpos contra proteínas PvMSP1<sub>19</sub>, PvCSP em protocolo *prime-boost* homólogo em camundongos C57BL/6, na terceira dose e três meses após a terceira dose.**

Proteínas	Avidez (%) - terceira dose			
	yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	yPvCSP	bPvMSP1 <sub>19</sub>	yPvCSP+bPvMSP1 <sub>19</sub>
PvMSP1 <sub>19</sub>	84,5 ± 2,79	-	70,8 ± 8,17 **	94,6 ± 2,58 *
PvCSP	71,0 ± 7,98	61,3 ± 16,52	-	75,2 ± 10,22
PvCSP-No repeats	71,9 ± 13,64	55,9 ± 19,21	-	73,4 ± 11,23

Proteínas	Avidez (%) - 3 meses após terceira dose			
	yPvCSP-MSP1 <sub>19</sub>	yPvCSP	bPvMSP1 <sub>19</sub>	yPvCSP+bPvMSP1 <sub>19</sub>
PvMSP1 <sub>19</sub>	92,9 ± 7,20	-	72,3 ± 7,88 ***	96,6 ± 2,09
PvCSP	96,4 ± 5,95	86,2 ± 13,48	-	80,9 ± 7,11
PvCSP-No repeats	75,7 ± 13,61	73,1 ± 17,31	-	84,0 ± 6,88

A análise foi realizada através do software (GraphPad Prism 8) utilizando o parâmetro *One-Way* ANOVA seguido por Tukey test para múltiplos eventos. As diferenças significativas em comparação com a proteína químérica (terceira dose) estão destacadas por: \*p<0,05, \*\*p<0,01. As diferenças significativas em comparação com a proteína químérica (3 meses após a terceira dose) estão destacadas por: \*\*\*p<0,001.

## 5. DISCUSSÃO

Como descrito anteriormente, a malária ainda é considerada um sério problema de saúde pública. Devido às dificuldades encontradas, como resistência a medicamentos e inseticidas, e as características biológicas do *P. vivax*, o desenvolvimento de uma formulação vacinal é de suma importância para sua erradicação. Dentro desse contexto, estudos contemplando formulações vacinais contendo mais de um antígeno de diferentes estágios do parasita vêm mostrando resultados significativos e comparáveis com os resultados encontrados durante esse projeto.

Nas imunizações em regime *prime-boost* homólogo, os títulos de anticorpos IgG anti-yPvCSP induzidos pela formulação contendo a proteína químérica yPvCSP-MSP1<sub>19</sub> foram de log<sub>10</sub>=4,87, o que são comparáveis com os títulos obtidos no trabalho de Lima e colaboradores (2020), em que utilizaram uma formulação

contendo as proteínas yPvCSP e PvAMA1 em um mix. A partir disso, pode-se demonstrar que a proteína yPvCSP manteve sua imunogenicidade quando fusionada com a bPvMSP1<sub>19</sub> para o presente estudo. Os títulos de anticorpos IgG anti-bPvMSP1<sub>19</sub> induzidos pela formulação contendo a proteína quimérica se aproximaram de  $\log_{10}=4,23$ , tendo resultados próximos aos obtidos pela avaliação da resposta imune por uma formulação contendo His6-MSP1<sub>19</sub>-PADRE (CUNHA *et al.*, 2001) que se aproximaram de  $\log_{10}=5$  após a terceira dose em camundongos C57BL/6. Outro estudo que avaliou uma formulação contendo as proteínas bPvMSP1<sub>19</sub> e PvAMA1 fusionadas, também apresentou resultados próximos de anticorpos IgG induzidos anti-bPvMSP1<sub>19</sub> (ROCHA *et al.*, 2017).

A aparente diminuição da indução de anticorpos IgG pela formulação em estudo contra a proteína bPvMSP1<sub>19</sub> pode ser explicada pela falta de equivalência estequiométrica entre as proteínas yPvCSP e bPvMSP1<sub>19</sub> nas formulações contendo a proteína quimérica yPvCSP-MSP1<sub>19</sub> e as proteínas yPvCSP e bPvMSP1<sub>19</sub> em combinação. Enquanto que a formulação quimérica apresenta 10 $\mu$ g da proteína quimérica, a segunda formulação apresenta 10 $\mu$ g de cada proteína em combinação.

As porcentagens de avidez dos anticorpos induzidos pela formulação contendo a proteína quimérica, no regime de imunização homólogo, ficaram em torno de 70-80% contra a maioria das proteínas testadas, sendo considerada uma avidez de intermediária a alta (SUÁREZ-MUTIS *et al.*, 2007). Estudos demonstram que anticorpos anti-VMP001 de soros de camundongos imunizados com vacinas de nanopartículas que mimetizam patógenos (VMP001-NPs - proteína quimérica contendo sequências repetidas de VK210 e VK247 conjugado a uma nanopartícula lipídica), 6 meses após a última dose, obtiveram uma avidez de aproximadamente 30%, sendo suficientemente alta para conseguir aglutinar esporozoítas vivos de *P. vivax* (MOON, *et al.*, 2012). O mesmo foi alcançado no trabalho de Camargo e colaboradores (2018) com anticorpos IgG induzidos contra a proteína yPvCSP com uma avidez de 42-58%, em um regime de imunização homólogo.

A utilização de adenovírus em regimes de imunização heterólogo é vista como uma estratégia de aumento da resposta humoral. Para a malária, o uso de tais vetores levou ao aumento das respostas imune humoral e celular a longo termo (PAULA *et al.*, 2014), associando com a proteção contra a infecção por *P. vivax* em diferentes estudos (SEDEGAH *et al.*, 2014; RAMPLING *et al.*, 2016).

Nas imunizações em regime *prime-boost* homólogo (P/P/P) em camundongos BALB/c, os títulos de anticorpos IgG anti-yPvCSP induzidos pela formulação contendo a proteína quimérica yPvCSP-MSP1<sub>19</sub> se aproximaram de  $\log_{10}=2,66$ . Por outro lado, no regime *prime-boost* heterólogo (Ad/Ad/P), os títulos de anticorpos IgG anti-yPvCSP induzidos pela formulação contendo a proteína quimérica yPvCSP-MSP1<sub>19</sub> foram de  $\log_{10}<2,0$ . Entretanto os títulos de anticorpos IgG anti-bPvMSP1<sub>19</sub> induzidos pela formulação contendo a proteína quimérica (em regime *prime-boost* homólogo) se aproximaram de  $\log_{10}=4,13$ , enquanto que em regime *prime-boost* heterólogo, os títulos de anticorpos IgG anti-bPvMSP1<sub>19</sub> foram de  $\log_{10}<2,0$ .

Comparando com o dados publicado por Camargo e colaboradores (2018), utilizando um regime de imunização heterólogo em camundongos BALB/c com formulações contendo adenovírus e a proteína recombinante yPvCSP em sistema Ad/P/P, onde os títulos de anticorpos obtidos se mostraram superiores, aproximadamente  $\log_{10}=6,0$ . A diminuição dos títulos pode ser explicada pela baixa reação imunológica que camundongos BALB/c apresentam frente à proteína PvCSP, o que é demonstrado pelos baixos títulos de anticorpos tanto frente à proteína quimérica quanto frente às variantes da proteína PvCSP.

Um resultado semelhante também pode ser visto no trabalho publicado por Lima e colaboradores (2020), na qual utilizou imunização de camundongos BALB/c com formulações contendo a proteína PvCSP-All<sub>FL</sub> (que contém as regiões N e C-terminal, além das três variantes VK210, VK247 e *P. vivax-like* unidas), obtendo títulos de anticorpos inferiores a  $\log_{10}=4,0$ . Já os títulos de anticorpos contra a proteína PvMSP1<sub>19</sub> se mostraram consistentes com os resultados obtidos no sistema de imunização heterólogo aplicado em camundongos C57BL/6.

Para regimes de imunização *prime-boost* heterólogo utilizando adenovírus em camundongos C57BL/6, há uma ausência de trabalhos publicados envolvendo proteínas de *P. vivax*, sendo o protocolo seguido nesse projeto uma iniciativa importante. Devido a essa escassez, comparou-se os resultados obtidos para os três regimes heterólogos aplicados.

Assim, para regimes de imunização *prime-boost* heterólogo utilizando adenovírus em camundongos C57BL/6, em um sistema de imunização Ad/P/P, os títulos de anticorpos anti-yPvCSP se aproximaram de  $\log_{10}=2,97$ , enquanto que os títulos de anticorpos anti-bPvMSP1<sub>19</sub> se aproximaram de  $\log_{10}=2,51$ . Esses resultados se assemelham com aqueles obtidos quando aplicado um sistema de

imunização Ad/Ad/P, em que os títulos de anticorpos anti-*yPvCSP* se aproximaram de  $\log_{10}=2,73$  e os títulos de anticorpos anti-*bPvMSP1<sub>19</sub>* se aproximaram de  $\log_{10}=2,34$ . Entretanto, quando comparados com o sistema de imunização P/P/Ad, os títulos de anticorpos anti-*yPvCSP* se aproximaram de  $\log_{10}=3,9$  e os títulos de anticorpos anti-*bPvMSP1<sub>19</sub>* se aproximaram de  $\log_{10}=4,1$ . A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que a utilização de uma ou duas doses iniciais contendo o adenovírus levou a uma menor indução de títulos totais de anticorpos do que a utilização de apenas uma aplicação de adenovírus como segundo *boost*.

Os valores de avidez dos anticorpos induzidos pela formulação contendo a proteína quimérica no sistema Ad/P/P variaram entre 50-90% contra as proteínas testadas, sendo considerada uma avidez intermediária a alta. A porcentagem obtida nesse sistema se assemelha a porcentagem de avidez obtida no sistema P/P/Ad, variando entre 70-90%, e no sistema Ad/Ad/P, variando entre 60-90%, considerado avidez intermediária a alta. Isso mostra que os três diferentes sistemas de imunização testados neste projeto conseguiram atingir um intervalo de porcentagem de avidez satisfatório.

Durante esse projeto, foi analisada a porcentagem de avidez obtida dos anticorpos induzidos pela formulação contendo a proteína quimérica, em um regime de imunização *prime-boost* homólogo, 3 meses após a terceira dose. Essa análise se deu devido estudos que demonstram que anticorpos anti-VMP001 de soros de camundongos imunizados com vacinas de nanopartículas que mimetizam patógenos (VMP001-NPs - proteína quimérica contendo sequências repetidas de VK210 e VK247 conjugado à uma nanopartícula lipídica), quando analisados em um período de tempo de 6 meses após a aplicação do segundo *boost*, obtiveram uma avidez de aproximadamente 30%, sendo suficientemente alta para aglutinar esporozoítas vivos de *P. vivax* (MOON *et al.*, 2012).

As porcentagens de avidez dos anticorpos induzidos pela formulação contendo a proteína quimérica, em um regime de imunização homólogo 3 meses após a terceira dose, variaram entre 80-90% contra a maioria das proteínas testadas, sendo considerada uma avidez alta (SUÁREZ-MUTIS *et al.*, 2007). Comparando os resultados obtidos com aqueles referentes à aplicação da terceira dose, em que as porcentagens de avidez dos anticorpos induzidos pela formulação contendo a proteína quimérica ficaram em torno de 50-80% contra a maioria das proteínas, observamos um aumento da avidez em decorrer do tempo após a

aplicação da última dose e que continuou suficientemente alta, o que sugeri a manutenção de uma possível proteção contra a infecção por *Plasmodium vivax*. Estudos realizados por Camargo e colaboradores (2018) utilizando-se de imunização de camundongos C57BL/6 com formulações contendo a proteína PvCSP-AllFL obtiveram resultados de avidez em torno de 40 a 60% para anticorpos frente às variantes da proteína PvCSP, considerada uma avidez alta e comparável com os resultados aqui obtidos.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que a utilização de uma proteína quimérica multi-estágio pode ser uma possibilidade viável para o desenvolvimento de uma formulação vacinal contra *Plasmodium vivax*, demonstrando que induziu altos títulos de anticorpos e valores de avidez frente a dois antígenos de diferentes estágios do ciclo de vida do parasita em ambos os regimes de imunização testados.

Os regimes de imunização hómologo e heretólogo aplicados em camundongos C57BL/6 apresentaram valores totais de títulos de anticorpos satisfatórios. Quando comparamos os dois, o regime homólogo (P/P/P) apresentou títulos superiores ao regime heterólogo (Ad/Ad/P, Ad/P/P e P/P/Ad), tanto frente a proteína yPvCSP (e nesse caso, principalmente frente as proteínas PvCSP-No repeats e PvCSP-*P. vivax* like) quanto bPvMSP<sub>19</sub>. Entretanto, os anticorpos induzidos utilizando o regime de imunização heterólogo mostraram porcentagens de avidez maiores. Ambos os resultados devem ser levados em consideração no desenvolvimento da formulação vacinal, já que um modelo ideal deve tanto induzir títulos de anticorpos IgG, quanto também apresentar uma avidez considerável, favorecendo, assim, a proteção.

Assim, pode-se concluir que a proteína quimérica yPvCSP-MSP<sub>19</sub> tem favorável capacidade imunogênica, sendo de suma importância a continuação de estudos baseados em imunizações em regime *prime-boost* homólogo e heterólogo para aplicação de uma possível futura vacina, como também é necessário a avaliação tanto de novos regimes de imunização quanto também da eficácia dos anticorpos induzidos em proteger os camundongos quando infectados com o *P. vivax*.

## REFERÊNCIAS

- ÂNGELO FERREIRA CHORA; MOTA, M. M.; PRUDÊNCIO, M. The reciprocal influence of the liver and blood stages of the malaria parasite's life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 52, n. 11, p. 711–715, 1 out. 2022.
- AUNG PYAE PHYO *et al.* Clinical impact of vivax malaria: A collection review. **PLOS Medicine**, v. 19, n. 1, p. e1003890–e1003890, 18 jan. 2022.
- ARRUDA, M. E. *et al.* Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 367–372, 10 maio 2007.
- BLACKMAN, M. J.; WHITTLE, H.; HOLDER, A. A. Processing of the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein-1: identification of a 33-kilodalton secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 35–44, 1 nov. 1991.
- CAMARGO, T. M. *et al.* Prime-boost vaccination with recombinant protein and adenovirus vector expressing *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (CSP) partially protects mice against *Pb/Pv* sporozoite challenge. **Scientific Reports**, 8, n. 1, p. 1118, 2018.
- COHEN, J. *et al.* From the circumsporozoite protein to the RTS, S/AS candidate vaccine. **Human Vaccines**, v. 6, n. 1, p. 90–96, jan. 2010.
- COMMONS, R. J. *et al.* Estimating the Proportion of *Plasmodium vivax* Recurrences Caused by Relapse: A Systematic Review and Meta-Analysis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 3, p. 1094–1099, 2020.
- COWMAN, A. F. *et al.* Malaria: Biology and Disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610–624, 1 out. 2016.
- CUNHA, M. G.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP119 expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine**, v. 20, n. 3-4, p. 385–396, nov. 2001.
- DE ALMEIDA, M. E. M. *et al.* Circumsporozoite surface protein-based malaria vaccines: A review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 63, n. October 2020, p. 1–9, 2021.
- DIDIERLAURENT, A. M. *et al.* Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 16, n. 1, p. 55–63, 2 ago. 2016.

DINI, S. *et al.* The risk of morbidity and mortality following recurrent malaria in Papua, Indonesia: a retrospective cohort study. **BMC Medicine**, v. 18, n. 1, 20 fev. 2020.

DOBRESCU, I. *et al.* Protective Immunity in Mice Immunized with *P. vivax* MSP1<sub>19</sub>-Based Formulations and Challenged with *P. berghei* Expressing PvMSP1<sub>19</sub>. **Frontiers in immunology**, v. 11, n. 28, 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.00028

EDILENE, M. *et al.* Circumsporozoite Surface Protein-based malaria vaccines: a review. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 63, 1 jan. 2021.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, 20 maio 2016.

FUCHS, A. Malária: região Amazônica concentra 99% dos casos no Brasil. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/malaria-regiao-amazonica-concentra-99-dos-casos-no-brasil>>. Acesso em: 30 agosto 2023.

GIMENEZ, A. M. *et al.* Vaccine Containing the Three Allelic Variants of the *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Antigen Induces Protection in Mice after Challenge with a Transgenic Rodent Malaria Parasite. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 1275, 11 out. 2017.

GIMENEZ, A. M. *et al.* A universal vaccine candidate against *Plasmodium vivax* malaria confers protective immunity against the three PvCSP alleles. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 9 set. 2021.

GUERRA, C. A.; SNOW, R. W.; HAY, S. I. Mapping the global extent of malaria in 2005. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 8, p. 353–358, ago. 2006.

HERRINGTON, D. A. *et al.* Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. **Nature**, v. 328, n. 6127, p. 257–259, 1 jul. 1987.

HIRUNPETCHARAT, C. *et al.* Absolute Requirement for an Active Immune Response Involving B Cells and Th Cells in Immunity to *Plasmodium yoelii* Passively Acquired with Antibodies to the 19-kDa Carboxyl-Terminal Fragment of Merozoite Surface Protein-1. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 12, p. 7309–7314, 15 jun. 1999.

HOFFMAN, S. L. *et al.* Protection of Humans against Malaria by Immunization with Radiation-Attenuated *Plasmodium falciparum* Sporozoites. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 8, p. 1155–1164, 15 abr. 2002.

LAURENS, M. B. The Promise of a Malaria Vaccine—Are We Closer? **Annual Review of Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 273–292, 8 set. 2018.

LIMA, L. C. *et al.* A Multistage Formulation Based on Full-Length CSP and AMA-1 Ectodomain of *Plasmodium vivax* Induces High Antibody Titers and T-cells and Partially Protects Mice Challenged with a Transgenic *Plasmodium berghei* Parasite. **Microorganisms**, v. 17, n. 8(6), p. 916, 2020.

LÓPEZ, C. *et al.* What Is Known about the Immune Response Induced by *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidates? **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 126, 13 fev. 2017.

LORENZ, V.; PANAGIOTIS KARANIS. Malaria vaccines: looking back and lessons learnt. **Asian pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. 74–78, 1 fev. 2011.

LOVER, A. A. *et al.* Malaria Elimination: Time to Target *all* Species. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 1, p. 17–23, 5 jul. 2018.

MOON, J. J. *et al.* Antigen-Displaying Lipid-Enveloped PLGA Nanoparticles as Delivery Agents for a *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31472, 6 fev. 2012.

NARDIN, E. *et al.* Synthetic Malaria Peptide Vaccine Elicits High Levels of Antibodies in Vaccinees of Defined HLA Genotypes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 5, p. 1486–1496, 1 nov. 2000.

NOGUEIRA, Fátima; ROSARIO, Virgílio Estólio do. Métodos para avaliação da atividade antimarialária nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v.1, n.3, p.109-124, set. 2010. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232010000300015>.

OUATTARA, A.; LAURENS, M. B. Vaccines against malaria. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 60, n. 6, p. 930–6, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Estratégia técnica mundial para o paludismo 2016-2030. 2015. 30p. Disponível em: <https://bit.ly/3zuotUK>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Malaria fact sheet 2023. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/malaria?gclid=Cj0KCQjw0IGnBhDUARIsAMwFDLmB7ypNKE-8\\_bIPuRLX9QMcGEH7EUgwY2zoCoyML0vILRAFK-ecSQcaAm4oEALw\\_wcB](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/malaria?gclid=Cj0KCQjw0IGnBhDUARIsAMwFDLmB7ypNKE-8_bIPuRLX9QMcGEH7EUgwY2zoCoyML0vILRAFK-ecSQcaAm4oEALw_wcB)>. Acesso em: 1 set. 2023.

PASQUALE, A. *et al.* Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. **Vaccines**, v. 3, n. 2, p. 320–343, 16 abr. 2015.

PATH'S MALARIA VACCINE INITIATIVE. **Need for a vaccine**. Disponível em: <<https://www.malaria vaccine.org/malaria-and-vaccines/need-vaccine>>. Acesso em: 2 set. 2023.

- PAULA, A. *et al.* Long-lasting humoral and cellular immune responses elicited by immunization with recombinant chimeras of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Vaccine*, 1 abr. 2014.
- PERERA, K. L. R. L. *et al.* Baculovirus Merozoite Surface Protein 1 C-Terminal Recombinant Antigens Are Highly Protective in a Natural Primate Model for Human *Plasmodium vivax* Malaria. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1500–1506, abr. 1998.
- PHILLIPS, M. A. *et al.* Malaria. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, 3 ago. 2017.
- PLASSMEYER, M. L. *et al.* Structure of the *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein, a Leading Malaria Vaccine Candidate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 39, p. 26951–26963, 1 set. 2009.
- PRICE, R. N. *et al.* Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 10, p. 982–991, out. 2014.
- RAHIMI, B. *et al.* Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 481, 8 dez. 2014.
- RAMPLING, T. *et al.* Safety and High Level Efficacy of the Combination Malaria Vaccine Regimen of RTS,S/AS01BWith Chimpanzee Adenovirus 63 and Modified Vaccinia Ankara Vectored Vaccines Expressing ME-TRAP. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 5, p. 772–781, 15 jun. 2016.
- RATHORE, D. *et al.* Binding and Invasion of Liver Cells by *Plasmodium falciparum* Sporozoites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 9, p. 7092–7098, 1 mar. 2002.
- ROCHA, M. V. *et al.* Generation, characterization and immunogenicity of a novel chimeric recombinant protein based on *Plasmodium vivax* AMA-1 and MSP119. **Vaccine**, v. 35, n. 18, p. 2463–2472, 25 abr. 2017.
- ROSENBERG, R. *et al.* Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Science**, v. 245, n. 4921, p. 973–976, 1 set. 1989.
- RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP. Efficacy and Safety of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine during 18 Months after Vaccination: A Phase 3 Randomized, Controlled Trial in Children and Young Infants at 11 African Sites. **PLoS Medicine**, v. 11, n. 7, p. e1001685, 29 jul. 2014.
- SAID JONGO *et al.* Safety and Immunogenicity of Radiation-Attenuated PfSPZ Vaccine in Equatoguinean Infants, Children, and Adults. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 1, p. 138–146, 5 jul. 2023.

SATO, S. Plasmodium—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 40, n. 1, 7 jan. 2021.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde**. 5. ed. Distrito Federal: Ministério da Saúde, 2021. v. Volume único p. 839

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dia mundial de luta contra a malária. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 15, 23 abr. 2021.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. **Boletim Epidemiológico**, v. 53, n. 17, 6 maio 2022a.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 31 de 2022; Malária na região extra-amazônica do Brasil: série histórica de 2010 a 2021; e Informes gerais. **Boletim Epidemiológico**, v. 53, n. 30, 29 ago. 2022b.

SEDEGAH, M. *et al.* Sterile Immunity to Malaria after DNA Prime/Adenovirus Boost Immunization Is Associated with Effector Memory CD8+T Cells Targeting AMA1 Class I Epitopes. **PLOS ONE**, v. 9, n. 9, p. e106241–e106241, 11 set. 2014.

SUÁREZ-MUTIS, M. C. *et al.* Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic Plasmodium vivax infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 3, p. 159–164, 1 jun. 2007.

SRIVASTAVA, A. *et al.* Host Reticulocytes Provide Metabolic Reservoirs That Can Be Exploited by Malaria Parasites. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 6, p. e1004882–e1004882, 4 jun. 2015.

TEIXEIRA *et al.* Immunogenicity of a Prime-Boost Vaccine Containing the Circumsporozoite Proteins of Plasmodium vivax in Rodents. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 2, p. 793–807, 1 fev. 2014.

TEWARI, K. *et al.* Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4+ T cell responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein (CSP) and αDEC-CSP in non human primates. **Vaccine**, v. 28, n. 45, p. 7256–7266, 21 set. 2010.

WATERS, A. P. Epigenetic Roulette in Blood Stream Plasmodium: Gambling on Sex. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 2, p. e1005353–e1005353, 11 fev. 2016.

WHO. **World Malaria Report 2015**. Geneva: World Health Organization; 2015. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>.

WHO. **World malaria report 2020**. Geneva: World Health Organization; 2020.

WHO. **World Malaria Report 2022**. Geneva: World Health Organization; 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO recommends R21/Matrix-M vaccine for malaria prevention in updated advice on immunization**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/02-10-2023-who-recommends-r21-matrix-m-vaccine-for-malaria-prevention-in-updated-advice-on-immunization>>. Acesso em: 9 out. 2023.

YADAVA, A. *et al.* A Novel Chimeric *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein Induces Biologically Functional Antibodies That Recognize both VK210 and VK247 Sporozoites. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 3, p. 1177–1185, mar. 2007.

YANG, F. *et al.* Evaluation of two sexual-stage antigens as bivalent transmission-blocking vaccines in rodent malaria. **Parasites and Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2021. doi:10.1186/s13071-021-04743-0.

YOUNG, J. *et al.* Expression of *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Proteins in *Escherichia coli* for Potential Use in a Human Malaria Vaccine. **Science**, v. 228, n. 4702, p. 958–962, 24 maio 1985.

## ANEXOS

### Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP).



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 054.2021 – CEUA 614

São Paulo, 03 de setembro de 2021.

Prezado (a) Senhor (a),

Informo que foi APROVADO na Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), nesta data, a alteração solicitada para o projeto de pesquisa "Estabelecimento de protocolos para a avaliação funcional de anticorpos anti-esporozoítas de *Plasmodium vivax* gerados pela vacinação experimental utilizando vírus e/ou proteínas recombinantes" da pesquisadora Laura Cristina Lima Diniz, sob a orientação da Profa. Dra. Irene da Silva Soares (Protocolo CEUA nº 614), conforme constante no documento apresentado:

- Prorrogação do prazo de vigência do Projeto para: novembro/2022

Atenciosamente,

*Irene Satiko Kikuchi*  
 Profa. Dra. Irene Satiko Kikuchi  
 Coordenadora do CEUA/FCF/USP

Ilma. Sra.  
 Pesquisadora: Laura Cristina Lima Diniz  
 Coordenadora: Profa. Dra. Irene da Silva Soares  
 FBC/FCF/USP

Camila Verholeak

---

Camila Verholeak Maffetano  
15/10/2023

Irene Soares

---

Irene da Silva Soares  
15/10/2023