

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia**

Cristopher Bryan da Silva Gomes

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS PvETRAMP 4 E PvETRAMP 11.2  
COMO CANDIDATOS VACINAIS PARA MALÁRIA VIVAX**

Belo Horizonte

2025

Cristopher Bryan da Silva Gomes

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS PvETRAMP 4 E PvETRAMP 11.2  
COMO CANDIDATOS VACINAIS PARA MALÁRIA VIVAX**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra. Caroline Furtado Junqueira

Coorientadora: Dra. Luna Barrôco de Lacerda.

Belo Horizonte  
2025

043

Gomes, Christopher Bryan da Silva.

Caracterização de ETRAMPs como candidatos vacinais para malária vivax [manuscrito] / Christopher Bryan da Silva Gomes. – 2025.

100 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Caroline Furtado Junqueira. Coorientadora: Dra. Luna Barrôco de Lacerda.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Malária Vivax. 3. Vacinas. 4. Linfócitos. I. Junqueira, Caroline Furtado. II. Lacerda, Luna Barrôco de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615




**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CRISTOPHER BRYAN DA SILVA GOMES.** Aos oito dias do mês de agosto de 2025 às 09:00 horas, reuniu-se no Auditório do BH-TEC da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Caracterização de ETRAMPs como candidatos vacinais para malária vivax", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Caroline Furtado Junqueira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (Centro de pesquisa René Rachou- FIOCRUZ), aprovado; Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Luna Barroco de Lacerda - Coorientadora (Centro de pesquisa René Rachou- FIOCRUZ), aprovado; Dra. Caroline Furtado Junqueira - Orientadora (Centro de pesquisa René Rachou- FIOCRUZ), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO


REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.


Belo Horizonte, 08 de agosto de 2025.

Documento assinado digitalmente  
 LIS RIBEIRO DO VALLE ANTONELLI  
 Data: 12/08/2025 22:01:16-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


**Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (FIOCRUZ)**

Documento assinado digitalmente  
 HELTON DA COSTA SANTIAGO  
 Data: 11/08/2025 13:31:57-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG)**

Documento assinado digitalmente  
 LUNA BARROCO DE LACERDA  
 Data: 11/08/2025 11:09:27-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dra. Luna Barroco de Lacerda - Coorientadora (FIOCRUZ)**

Documento assinado digitalmente  
 CAROLINE FURTADO JUNQUEIRA  
 Data: 13/08/2025 11:15:43-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dra. Caroline Furtado Junqueira - Orientadora (FIOCRUZ)**

Dedico, simples e de coração,  
esta história incompleta, mas findada.  
Dedico-a às pessoas que encontrei em minha jornada,  
àquelas que, no falar, no agir e no pensar, tocaram minha alma,  
arrancaram-me sorrisos ou fizeram-me chorar,  
sem jamais deixar-me desamparado, morgado ou minguido.

Dedico àqueles que me ergueram um altar,  
àqueles que, em atos visíveis ou não,  
ensinaram-me a sonhar, a viver e a amar.  
Dedico esta história a todos os silêncios e a todas as nossas conversas.

Pois mesmo que acabado, graças a vocês, saio novo e bem guiado  
por belas estrelas que foram — e são —  
meus melhores amigos, meus maiores irmãos, minha família...  
Parte do meu coração.

**Versos do autor.**

## **AGRADECIMENTOS**

Começo esses agradecimentos sentado no mesmo lugar, não sendo mais a mesma pessoa, em que tudo começou.

Não há palavras que representem a minha gratidão à todas as oportunidades que tive desde que entrei no mestrado, mas certamente as pessoas que encontrei pelo caminho, ou já estavam nele, ou mesmo as que o deixaram, merecem meu reconhecimento e adoração. Sem o apoio incondicional da minha família, representada em minha mãe e meu pai, teria sido impossível prosseguir, pois são eles parte do meu norte. E para citar a Velha Infância, tanto a música quanto o meu passado (cantando em uma apresentação de escola), sigo ainda iluminado pelo brilho dos seus olhos, guiando-me na escuridão.

Aos meus amigos, agradeço pelo companheirismo e apoio nos momentos difíceis e pela leveza em me ensinar a viver e a cortar no vôlei. Agradeço pelos conselhos dados em uma segunda-feira de manhã na sala de cultivo do IP, por me ampararem enquanto o mundo girava ou por me trazerem de volta ao chão depois de um longo delírio.

Agradeço imensamente ao Seminário Laveran & Deane e seus organizadores, o Dr. Cláudio Tadeu e a Dra. Maria de Fátima, pela oportunidade de construir e discutir ciência.

Agradeço a todos os membros da equipe do CTVacinas e do laboratório de Imunopatologia do René Rachou pelas discussões científicas, pelo carinho e respeito e por me permitirem presenciar grandes feitos feitos por grandes pessoas, em coração e ciência. Sem esse ambiente, estou certo que minha história seria diferente e menos feliz. Além disso, agradeço à equipe técnica das plataformas da FIOCRUZ Minas e do biotério de experimentação, vocês tornaram minha passagem, rápida, mais leve e segura.

Por fim, agradeço também às minhas orientadoras, tanto científicas, quanto de vida, a Dra. Caroline Junqueira e a Dra. Luna Lacerda. Pois, sem elas eu teria desistido antes de começar e teria desistido depois também. Em minhas crises e meus choros, em minhas dúvidas e loucuras, foram elas quem enxergaram em mim alguém que eu ainda desconheço e merece todo o sofrimento e esforço, mas confio, como sempre (mesmo que relutante), que deve ser verdade.

Muito obrigado.

## RESUMO

A malária é a doença parasitária mais letal do mundo, sendo causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles*. No Brasil, o *P. vivax* é a espécie predominante, concentrando-se principalmente na região Norte, onde gera impactos significativos na saúde pública. Apesar das diferentes estratégias utilizadas para o controle da doença, a Organização Mundial da Saúde reconhece a necessidade do desenvolvimento de vacinas como complemento às medidas já existentes. Assim, a partir de estudos do nosso grupo de pesquisa, foi caracterizado um novo mecanismo que considera o papel protetor de linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos na infecção de *P. vivax*, além da identificação dos peptídeos apresentados por MHC de classe I. Dentre os antígenos identificados, as proteínas PvETRAMP 4 e PvETRAMP 11.2 foram selecionadas para o presente trabalho. Ambas proteínas foram produzidas em sistema de expressão heteróloga em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade. Em sequência, animais C57BL/6 foram imunizados visando avaliar a imunogenicidade dos antígenos alvo, através do perfil de anticorpos específicos induzidos, bem como o perfil de populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Por fim, os animais foram desafiados com *P. yoelii*, um modelo que preferencialmente infecta reticulócitos similarmente ao *P. vivax*, buscando avaliar a capacidade protetora dos antígenos testados. Os resultados obtidos ao longo do projeto reforçam a capacidade imunogênica *in vivo*, utilizando camundongos C57BL/6, com proeminente resposta produtora de TNF e IFN- $\gamma$ , citocinas classicamente associadas à proteção contra a malária, por células T CD4<sup>+</sup> e por células T CD8<sup>+</sup>. Ademais, as proteínas foram capazes de induzir uma resposta robusta de anticorpos, cujo papel deve ser explorado em estudos futuros. Interessantemente, frente ao desafio heterólogo, em modelo murino infectado com *P. yoelii* 17XNL, apenas a proteína PvETRAMP 4 controlou a parasitemia, com redução na carga parasitária sanguínea a partir do décimo sétimo dia de infecção. Apesar dos achados serem promissores, estudos empregando parasitos transgênicos expressando as proteínas de interesse são necessários para comprovar a eficácia desses antígenos como candidatos vacinais.

Palavras-chave: malária, vacina, linfócitos, ETRAMP.

## ABSTRACT

Malaria is the deadliest parasitic disease in the world, caused by protozoa of the *Plasmodium* genus and transmitted by mosquitoes of the *Anopheles* genus. In Brazil, *P. vivax* is the predominant species, mainly concentrated in the Northern region, where it has a significant impact on public health. Despite the different strategies used to control the disease, the World Health Organization recognizes the need for vaccine development as a complement to existing measures. Based on studies by our research group, a new protective mechanism was characterized that considers the protective role of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in *P. vivax* infection, in addition to the identification of peptides presented by MHC class I. Among the identified antigens, the proteins PvETRAMP 4 and PvETRAMP 11.2 were selected for the present work. In the present work, both proteins were produced in a heterologous expression system in *E. coli* and purified by affinity chromatography. Next, C57BL/6 mice were immunized to assess the immunogenicity of the target antigens, by evaluating the antibody profile induced as well as the effector cellular response. Flow cytometry was used for immunophenotyping of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte populations. Finally, the animals were challenged with *P. yoelii* to evaluate the protective capacity of the tested antigens. The results obtained throughout the project reinforce the in vivo immunogenic capacity of the antigens in C57BL/6 mice, with a prominent TNF and IFN- $\gamma$  response—cytokines classically associated with malaria protection—by CD4<sup>+</sup> T cells, and a significant IFN- $\gamma$  response by CD8<sup>+</sup> T cells. Additionally, the proteins were able to induce a robust antibody response, the role of which should be further explored in future studies. Interestingly, upon heterologous challenge in a murine model infected with *P. yoelii* 17XNL, only the PvETRAMP 4 protein demonstrated the ability to control parasitemia, with a reduction in blood parasite load from the seventeenth day of infection. Despite the promising findings, the protection studies indicate that further efforts employing transgenic parasites expressing the proteins of interest are necessary to confirm the efficacy of these antigens as vaccine candidates.

Keywords: malaria, vaccine, lymphocytes, ETRAMP.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de incidência de casos de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> - 2022.....	14
Figura 2 - Estratificação de municípios segundo incidência parasitária anual (IPA) - 2022.....	15
Figura 3 - Ciclo biológico no hospedeiro vertebrado.....	20
Figura 4 - Sinapse imunológica entre células T CD8+ e iRetics.....	25
Figura 5 - Principais candidatos vacinais para malária.....	26
Figura 6 - Expressão de PfETRAMPs ao longo do ciclo eritrocítico.....	36
Figura 7 - Esquema de imunizações e coleta e processamento de amostra.....	48
Figura 8 - Estratégia de seleção de populações por citometria de fluxo para acompanhamento de parasitemia.....	50
Figura 9 - Estratégia de seleção de populações por citometria de fluxo para imunofenotipagem.....	52
Figura 10 - Teste de colônias para PvETRAMP 4 e para PvETRAMP 11.2.....	55
Figura 11 - Perfil de solubilidade da PvETRAMP 11.2 e da PvETRAMP 4.....	56
Figura 12 - Western Blot anti-His e gel espelho.....	58
Figura 13 - Distribuição de epítomos lineares para PvETRAMP 4.....	59
Figura 14 - Distribuição de epítomos lineares para PvETRAMP 11.2... ..	59
Figura 15 - Anticorpos totais do tipo IgG induzidos pela vacinação.....	60
Figura 16 - Anticorpos do tipo IgG1 induzidos pela vacinação.....	61
Figura 17 - Anticorpos do tipo IgG2c induzidos pela vacinação.....	62
Figura 18 - Epítomos preditos para MHC-I e MHC-II para PvETRAMP 4	63
Figura 19 - Epítomos preditos para MHC-I e MHC-II para PvETRAMP 11.2.....	64
Figura 20 - Perfil de ativação de células T CD4+.....	65
Figura 21 - Perfil de ativação de células T CD8+.....	66
Figura 22 - Perfil de produção de IFN- $\gamma$ por células T CD4+.....	67
Figura 23 - Perfil de produção de IFN- $\gamma$ por células T CD8+.....	68
Figura 24 - Perfil de produção de TNF por células T CD4+.....	69
Figura 25- Perfil de produção de TNF por células T CD8+.....	70
Figura 26 - Curva de parasitemia comparativa com PvETRAMP 4.....	71
Figura 27 - Curva de parasitemia comparativa com PvETRAMP 11.2. ..	72
Figura 28 - AUC para a parasitemia dos animais imunizados.....	73
Figura 29 - Análise de identidade da região N-terminal da PvETRAMP 4 com <i>P. yoelii</i> .....	74
Figura 30 - Análise da identidade da região N-terminal da PvETRAMP 11.2 com <i>P. yoelii</i> .....	75

Figura 31 - Avaliação da antigenicidade de pacientes frente às proteínas recombinantes por Western Blotting.....	76
--	----

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
1.1. Epidemiologia da malária.....	13
1.2. Ciclo biológico no hospedeiro vertebrado.....	16
1.3. Especificidades no ciclo biológico do Plasmodium vivax.....	20
1.4. Imunologia da malária.....	21
1.6. Vacinas antimaláricas.....	26
1.6.1. Vacinas para o estágio pré-eritrocíticos.....	26
1.6.2. Vacinas para o estágio eritrocítico.....	30
1.6.3. Vacinas de Bloqueio de Transmissão.....	33
1.6.4. Outras abordagens vacinais.....	34
1.7. Early Transcribed Membrane Proteins - ETRAMPs.....	35
1.8. Modelos murinos.....	38
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>40</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
3.1. Objetivos gerais.....	41
3.2. Objetivos específicos.....	41
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
4.1. Produção e purificação de proteínas recombinantes.....	42
4.1.1. Transformação em bactérias quimiocompetentes.....	42
4.1.2. Teste de colônias.....	42
4.1.3. Teste de solubilidade.....	43
4.1.4. Purificação de proteínas recombinantes.....	44
4.2. Eletroforese de proteínas e Western Blotting.....	45
4.3. Animais - Camundongos.....	46
4.4. Cepas de Plasmodium - P. yoelii 17XNL.....	47
4.5. Imunização.....	47
4.6. Infecção e desafio de animais.....	48
4.7. Acompanhamento da parasitemia.....	49
4.8. Imunofenotipagem e citometria de fluxo.....	50
4.9. Ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto.....	52
4.10. Análises de bioinformática.....	53
4.11. Análises estatísticas.....	54
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
5.1. Purificação dos antígenos recombinantes.....	55
5.2. Predição de epítopos lineares de células B.....	58
5.3. Resposta humoral induzida.....	60
5.3.1. Avaliação de IgG Total.....	60
5.4. Predição de epítopos para MHC-I/II para camundongos.....	62
5.5. Perfil de ativação celular.....	64

5.6. Perfil de produção de citocinas.....	66
5.6.1. Células produtoras de IFN- $\gamma$ .....	66
5.6.2. Células produtoras de TNF.....	68
5.7. Desafio e avaliação da proteção.....	70
5.8. Avaliação da homologia <i>P. vivax</i> / <i>P. yoelii</i> .....	74
5.9. Antigenicidade em humanos.....	75
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>84</b>

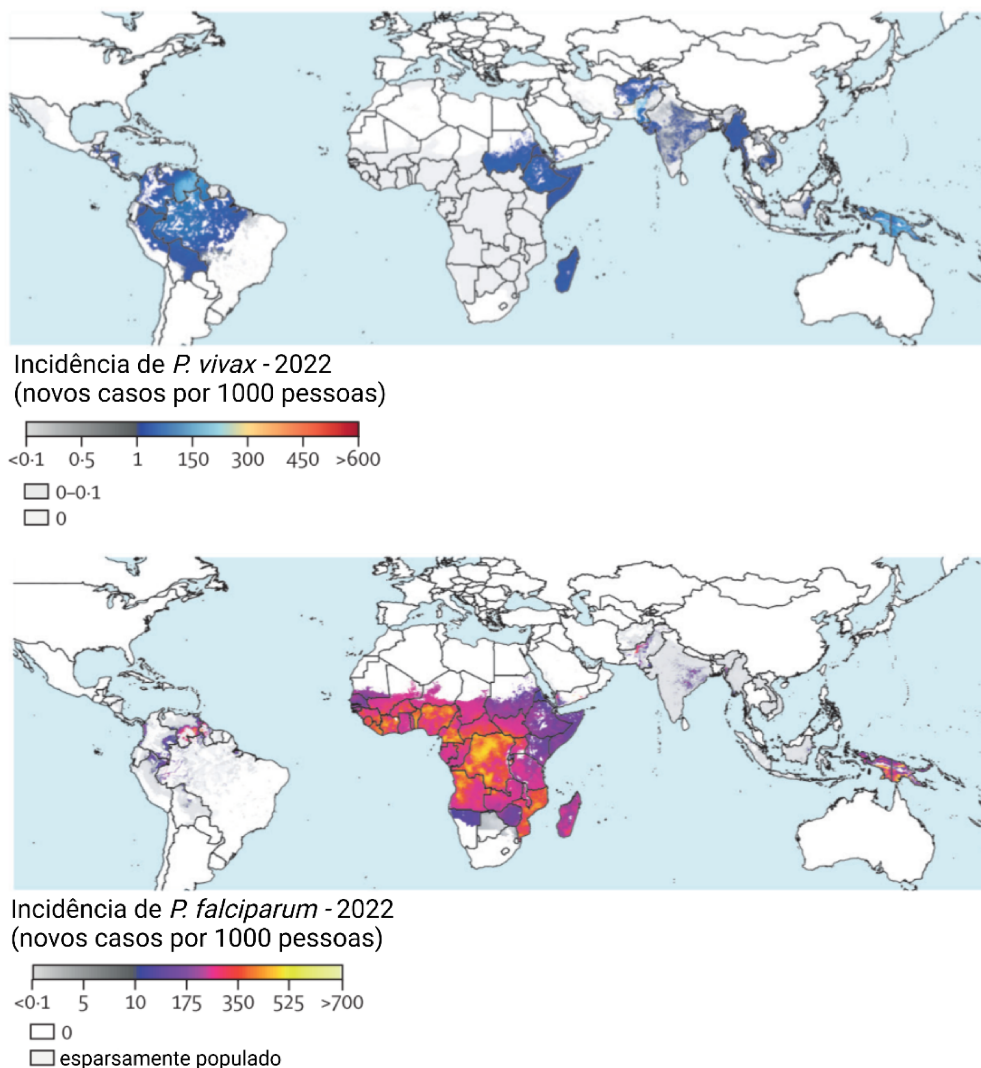
## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Epidemiologia da malária

Entre os anos 2000 a 2019, os casos de malária permaneceram relativamente estáveis, devido a uma combinação de esforços de combate, de controle e para o diagnóstico da doença, com margem aproximada de variação entre 227 milhões a 248 milhões de registros anuais, nos 108 países considerados endêmicos, no início do período, para a doença (WHO, 2024). Após este intervalo, com a emergência da crise sanitária em decorrência da COVID-19, da perturbação dos sistemas de saúde nacionais e da alteração nas dinâmicas populacionais em diversas regiões do globo, o número de casos de malária sofreu alterações consideráveis, culminando em um quadro geral de aumento do número de casos da doença (ROGERSON *et al.* 2020 & WHO, 2024). Ao término do ano de 2023, em um cenário marcado por 263 milhões de casos, um aumento expressivo de 11 milhões quando comparado ao ano anterior, e aproximadamente 597 mil mortes em decorrência da doença (WHO, 2024). Dentre os 83 países endêmicos, a maior parte dos casos está concentrada em áreas de moderada a alta transmissão, principalmente em países da África-Subsaariana (94%), com a espécie mais prevalente sendo o *Plasmodium falciparum* (WHO, 2024).

Nas Américas, no período entre 2000 a 2023, houve uma redução de aproximadamente 65,4% no número de casos, atingindo, no ano de 2023, a marca de 550 mil relatos da infecção. O número de óbitos associados à malária também apresentou queda significativa de 61,8%, chegando a 342 mortes neste ano. Dos casos registrados na região, mais de 75% estão concentrados na América do Sul, especialmente na bacia amazônica, com Brasil, República Bolivariana da Venezuela e Colômbia representando 76,8% do total regional (WHO, 2024). Um acúmulo de fatores, como a atividade extrativista, o garimpo, a presença de populações vulneráveis, a presença de indivíduos assintomáticos, a dificuldade de acesso a regiões remotas para implementação de medidas profiláticas ou intervenções terapêuticas e a ecologia do mosquito vetor, explica a alta concentração nestes locais, em que 72,1% dos casos são causados pelo *Plasmodium vivax* (MELO *et al.*, 2020 & WHO, 2024).

**Figura 1 - Mapa de incidência de casos de *P. vivax* e *P. falciparum* - 2022**

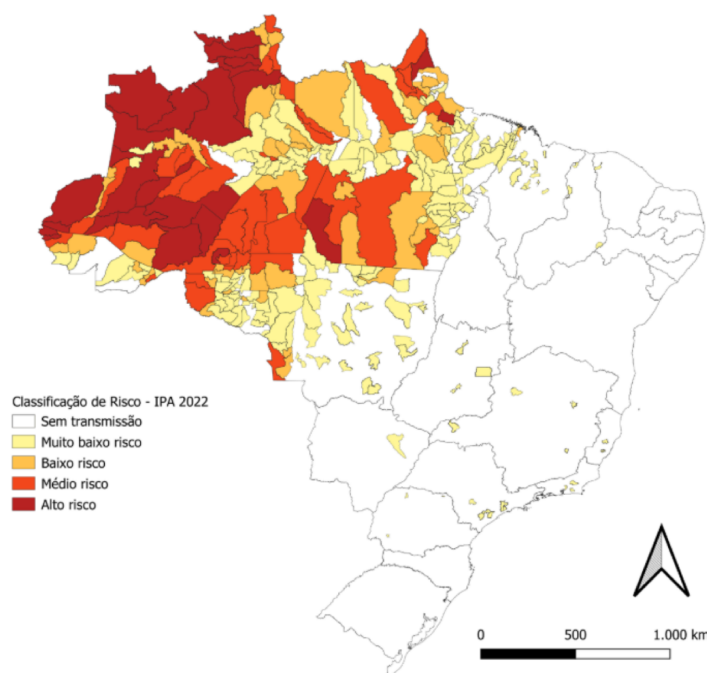


Adaptado de WEISS, D. J. *et al.* 2025. *The lancet*.

No Brasil, no ano de 2023, foram registrados cerca de 139.884 casos de malária, um aumento de 8,8% quando comparado com o ano anterior, com a região amazônica concentrando, de maneira heterogênea, 99,98% deste total. De acordo com o Ministério da Saúde, três Estados respondem por quase a totalidade dos casos, sendo estes o Amazonas (41,9%), o Roraima (24,6%) e o Pará (17%). Dentro dos territórios endêmicos para a doença no país, as áreas de preservação dos povos originários (40%), as áreas rurais (33,4%), apesar da baixa densidade demográfica associada, e as áreas de garimpo (14,6%), são de grande importância, uma vez que, conjuntamente, somam 88% dos casos relatados ao Sistema de Informação e à

Vigilância Epidemiológica-Malária (BRASIL, 2024a). Três espécies de *Plasmodium* estão associadas com os casos relatados, destas o *P. vivax* apresenta a maior prevalência, respondendo por 82,5% dos casos relatados, seguido por infecções causadas por *P. falciparum* ou infecções mistas com 17,3% do total e, por fim, infecções causadas pelo *P. malariae*, com 0,1% do número absoluto (BRASIL, 2024a). Conjuntamente, essas três espécies representam àquelas consideradas endêmicas em território nacional, de acordo com o Ministério da Saúde, no entanto, casos de *P. ovale* também podem ser notificados por importação, oriundos de indivíduos infectados em territórios estrangeiros (BRASIL, 2024b).

**Figura 2 - Estratificação de municípios segundo incidência parasitária anual (IPA) - 2022**



IPA — os municípios brasileiros são classificados em: muito baixo risco (IPA <1 caso/1.000 habitantes); baixo risco (IPA entre 1 e <10 casos/1.000 habitantes); médio risco (IPA entre 10 e <50 casos/1.000 habitantes); alto risco (IPA ≥50 casos/1.000 habitantes).  
 Fonte: Sivep-Malária/SVSA/MS, Sinan/SVSA/MS e E-SUS-VS. Excluídas lâminas de verificação de cura. Dados do Sivep-Malária atualizados em 19/8/2023. Dados do Sinan atualizados em 12/9/2023. Dados do E-SUS-VS atualizados em 9/8/2023.

Fonte: Boletim Epidemiológico - Volume 55, n1 (2023), Ministério da Saúde, BRASIL.

Atualmente, o país abriga cerca de 60 espécies de mosquitos vetores do gênero *Anopheles sp.*, sendo o *Nyssorhynchus darlingi* a espécie considerada de maior importância, principalmente na região norte do país, para a transmissão da malária humana em áreas urbanas e periurbanas, dado sua alta antropofilia e

endofilia (MEIRELES *et al.* 2022). Alterações ambientais, antropogênicas ou naturais, somadas aos padrões comportamentais humanos, podem favorecer outros vetores do gênero (de CASTRO *et al.* 2006; BARROS *et al.* 20011), como o reportado por Gomes e colaboradores, que analisaram, após um surto de malária no ano de 2019 no município de Conde (PB-Brasil), a prevalência de diferentes espécies do mosquito vetor.

## **1.2. Ciclo biológico no hospedeiro vertebrado**

O ciclo biológico do parasito no hospedeiro vertebrado tem início com a picada de um anofelino fêmea infectado. Durante o repasto sanguíneo, o mosquito vetor inocula na pele do hospedeiro os esporozoítos, estágio infectante do parasito. Essa forma, marcada por sua capacidade móvel dependente de reconhecimento do substrato, migra através do tecido e dos seus constituintes até atingir vasos linfáticos ou a corrente sanguínea, sendo, a partir desta, posteriormente carregada até o fígado, local de sua célula alvo, o hepatócito (FRISCHKNECHT F & MATUSCHEWSKI K, 2017).

Duas proteínas são consideradas importantes agentes durante a migração pelos tecidos do hospedeiro e a invasão do hepatócito, auxiliando na mobilidade do esporozoíto e no reconhecimento da célula alvo. Sendo estas proteínas, respectivamente, a proteína de adesão relacionada à trombospondina (thrombospondin-related adhesive protein - TRAP), também chamada de proteína de superfície do esporozoíto 2 (sporozoite surface protein 2 - SSP2), e a proteína de superfície circunsporozoíta (circumsporozoite surface protein - CSP) (Sultan, A. A. *et al.*, 1997; Cerami, C. *et al.* 1992 & Müller H. M. *et al.*, 1993).

A partir do estudo feito por Sultan e colaboradores do gene da proteína TRAP em *P. berghei* (NK65), os pesquisadores observaram que seu comprometimento impactava o deslocamento dos esporozoítos para a glândula salivar dos mosquitos vetores, bem como reduzia a infectividade desses esporozoítos no hospedeiro vertebrado em aproximadamente 100 vezes quando comparado com fenótipos selvagem (Sultan, A. A. *et al.*, 1997). Ademais, a TRAP auxilia na coordenação, conjuntamente com a polimerização e a despolimerização de filamentos de actina, da formação de sítios de adesão com o substrato, sendo que sua ausência impacta o movimento direcional, bem como a capacidade infectiva do parasito (MÜNTER, S. *et al.*, 2009).

Por sua vez, a proteína CSP é responsável por conferir especificidade de reconhecimento através da interação da porção C-terminal com proteoglicanos na porção basolateral do hepatócito (Cerami, C. *et al.* 1992 & ZHAO J. *et al.*, 2016). Após o reconhecimento dessas moléculas, a CSP é clivada, permitindo o parasito mudar para um estado mais invasivo (COPPI A. *et al.*, 2007)

Entretanto, o processo de invasão da célula final depende da migração de esporozoítos por outros hepatócitos bem como através de células de Kupffer, conforme demonstrado por estudos usando *P. berghei* e *P. yoelii*. Essas etapas de invasão anteriores ao endereçamento final são importantes para a ativação do esporozoíto, possibilitando o contato de moléculas, como cisteíno-proteases presentes nos lisossomos do hospedeiro, que favorecem a clivagem da proteína CSP, culminando na exocitose de componentes de suas organelas apicais, as roptrias e as micronemas, necessárias para a formação da junção móvel (MOTA, M. M., HAFALLA, J. C. R., & RODRIGUEZ, A. 2002 & BAER, K. *et al.*, 2007).

Durante o processo de formação do vacúolo parasitóforo, originado a partir da membrana da célula hospedeira, diferentes proteínas do protozoário são utilizadas na composição desse novo compartimento celular. Estas passam a desempenhar, então, a função de estabelecer o contato na interface parasito-hospedeiro, mediando o trânsito de nutrientes, produtos metabólicos e macromoléculas (Lindner, S. E., Miller, J. L., & Kappe, S. H. I. 2012). Dentre esses constituintes, membros da família de proteínas de membrana transcritas precocemente (Early Transcribed Membrane Proteins - ETRAMPs) têm sido demonstradas como fundamentais para o desenvolvimento parasitário em modelo murino de malária com *P. yoelii* (MacKellar, D. C. *et al.* 2011).

Ainda nas primeiras horas após a invasão, uma série de eventos serão desencadeados no hepatócito infectado, com deslocamento do parasito para região justaposta ao núcleo, seguida da associação entre vacúolo parasitóforo e retículo endoplasmático (Bano, N. *et al.* 2007), além de outras modificações metabólicas importantes na célula hospedeira, que permitirão o rápido desenvolvimento parasitário e a geração de milhares de células filhas durante o processo de multiplicação em sincício, chamado de esquizogonia hepática (Albuquerque, S. *et al.* 2009).

Em sequência, decorrido o período de incubação e formação das células filhas, os merozoítos são liberados em um processo que envolve a formação dos

chamados merossomos. Estas são estruturas vesiculares derivadas da célula infectada, conforme descrito por Graewe e colaboradores (GRAEWE, S. *et al.* 2011), são constituídas da membrana celular do hepatócito e dos merozoítos encapsulados. Uma vez liberados, os merossomos são carregados até a rede capilar dos pulmões, onde se rompem, permitindo a liberação dos merozoítos e o início do ciclo eritrocítico (BAER, K. *et al.*, 2007).

A invasão de células da linhagem eritrocítica pelo merozoítos ocorre em poucos instantes, em um processo de etapas sequenciais, dependentes do reconhecimento de ligantes no hospedeiro e na liberação de proteínas adesivas contidas nas roptrias e nos micronemas no polo apical do parasito. Nesse processo, a migração sob a superfície do eritrócito, uma espécie de rolamento, pelo merozoíto parece desempenhar um importante papel, no qual inicia-se o processo de deformação do eritrócito através de interações fracas e de baixa afinidade, como as mediadas pela proteína de superfície do merozoíto (Merozoite Surface Protein - MSP), dentre as quais a MSP-1 é a mais abundante.

Em sequência, a porção apical do merozoíto se une à membrana do hospedeiro (HART, M. N. *et al.*, 2023) por meio de proteínas adesivas concentradas na região, como membros da família de proteínas ligantes ou semelhante às ligantes de reticulócitos (Reticulocyte Binding/Binding-like Proteins - RBPs/RBLs), presentes em diferentes espécies, ou as proteínas ligantes ao Duffy (Duffy Binding Proteins - DBPs), presentes em *P. vivax*, em *P. ovale* e *P. cynomolgi*. Subsequentemente, o parasito se alinha perpendicular à superfície da célula vermelha e inicia a formação da junção móvel (WEISS, G. E. *et al.* 2015). Nessa etapa, a formação da junção móvel contará com outras proteínas, como o antígeno de membrana apical 1 (Apical Membrane Antigen 1), que interage com a proteína de roptria (Rhoptry Neck Protein 2 - RON2), permitindo a completa invasão da célula alvo (LAMARQUE, M. *et al.* 2011 & HART, M. N. *et al.*, 2023).

Nesse estágio da infecção da célula vermelha, é formada uma estrutura visível ao microscópio de luz com aparência similar a um anel, indicando a célula parasitária, e que posteriormente evolui para os chamados trofozoítos jovens e trofozoítos maduros, com mais núcleos. Estes trofozoítos podem aparentar formas compactas e, por vezes, amebóide, antes de atingirem um estágio de sincício, sem divisões celulares claras, a chamada forma de esquizonte, com um número ainda

maior de núcleos. Ao término, as células filhas serão formadas a partir de invaginações da membrana (CDC, 2024).

Durante o ciclo de esquizogonia sanguínea, a fase assexuada e sintomática da doença, células filhas serão formadas e liberadas em ciclos que podem variar a depender da espécie. Estes rompimentos de células da linhagem eritrocítica coincidem com os paroxismos maláricos, sendo marcados por liberação de citocinas inflamatórias e pirogênicas, como o TNF e a IL-1 $\beta$ , e padrões moleculares associados ao dano (Damage Associated Molecular Patterns - DAMPS) e padrões moleculares associados ao patógeno (Pathogen Associated Molecular Patterns - PAMPs) (GAZZINELLI *et al.* 2014 & HIRAKO *et al.*, 2018).

Paralelamente ao ciclo assexuado, ocorre a diferenciação de algumas células em gametócitos, formas sanguíneas sexuadas do parasito, que apresentam diferentes perfil transcricional e aspecto morfológico. Essas formas são, oportunamente, ingeridas por mosquitos vetores durante um novo repasto sanguíneo, dando continuidade ao ciclo do protozoário no hospedeiro invertebrado (BAKER, D. A. > 2010 & BANTUCHHAI, S., IMAD, H., & NGUITRAGOOL, W.. 2022).

**Figura 3 - Ciclo biológico no hospedeiro vertebrado**

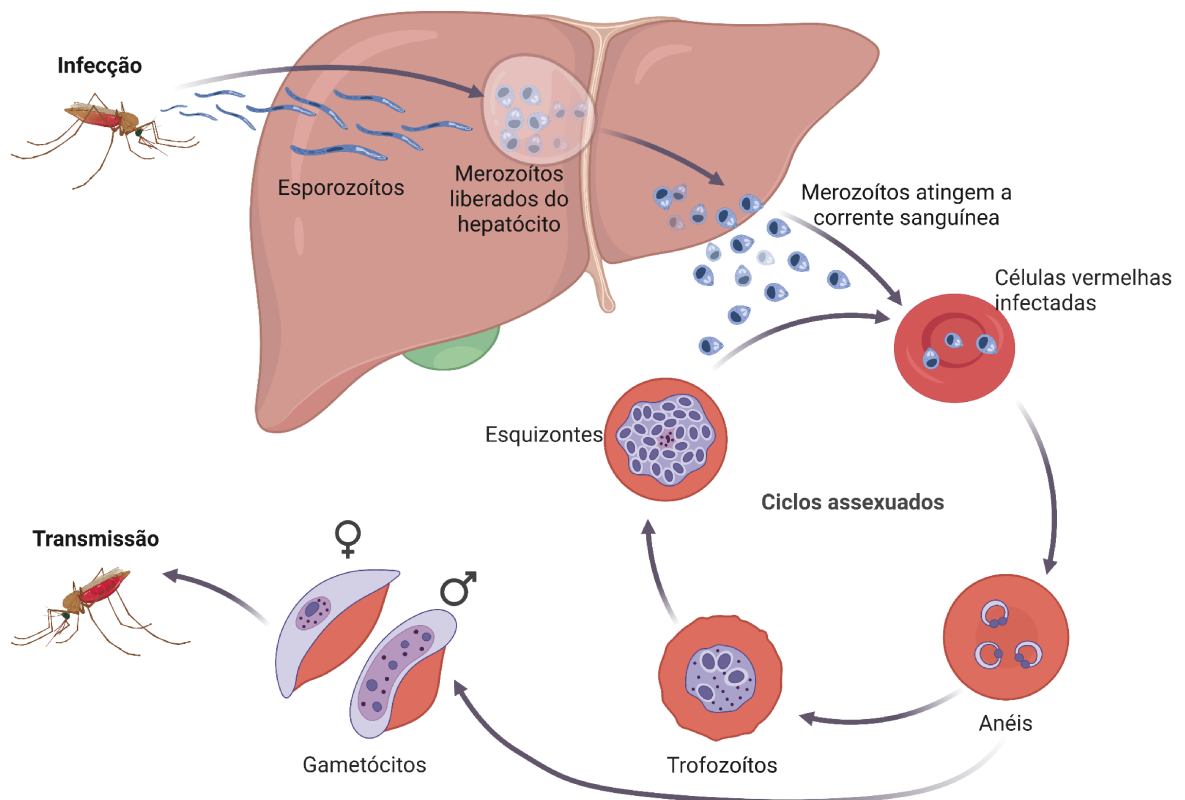


Figura adaptada de modelos disponíveis na plataforma Biorender (Criado com <https://BioRender.com>).

### 1.3. Especificidades no ciclo biológico do *Plasmodium vivax*

Apesar de compartilharem diversas características em seu ciclo biológico, o *P. vivax* diverge grandemente em aspectos genéticos da espécie *P. falciparum*, apresentando também peculiaridades próprias (SU, X. Z. *et al.*, 2019). Uma dessas características marcantes é a presença de formas latentes do parasito em hepatócitos, os hipnozoítos, responsáveis por causar recaídas da doença em períodos que podem variar entre cepas, com intervalos mais frequentes de até 10 meses (WHITE, N. J., & IMWONG, M. 2012). Esse aspecto da infecção é também compartilhado com outras espécies de plasmódio, o *P. ovale* e o *P. cynomolgi*.

Em relação ao estágio sanguíneo do parasito, a invasão de células da linhagem eritrocítica pelo *P. vivax* é fortemente dependente do reconhecimento do receptor de transferrina 1 (Transferrin Receptor 1 - TfR1), também conhecido como CD71, presente em reticulócitos, e seu ligante, a transferrina, pela PvRBP2b

(GRUSZCZYK, J. *et al.* 2018a). A ausência desse receptor, como em reticulócitos tratados *in vitro* com tripsina, leva à abolição da capacidade invasiva do *P. vivax*, assim, ditando sua especificidade (GRUSZCZYK, J. *et al.* 2018b)

Entretanto, outras moléculas também desempenham papel no processo de invasão da célula alvo, como o antígeno Duffy, um receptor de citocinas em células vermelhas (Duffy Antigen Receptor for Chemokines - DARC), reconhecido pela proteína ligante ao Duffy (Duffy-Binding Protein - DBP). Sua ausência, assim como o CD71, torna o reticulócito frequentemente refratário à infecção pelo *P. vivax*, um fenótipo comum em populações de origem africana (POPOVICI, J., ROESCH, C., & ROUGERON, V. 2020). Ademais, evidências sugerem outros alvos moleculares como receptores colaterais, como o receptor de complemento 1 (Complement Receptor 1 - CR1), um alvo que, quando reduzido na superfície do reticulócito, com DARC inalterado, impacta a eficiência da infecção (PRAJAPATI, S. K., *et al.* 2019).

Por fim, para o *P. vivax*, o surgimento dos gametócitos, entre 13 a 17 pós infecção (Ministério da Saúde - Brasil, 2019), na circulação periférica é, por vezes, concomitante ou mesmo prévio ao aparecimento de sintomas clínicos da doença, dificultando as medidas de controle epidemiológico (BANTUCHAI, S., IMAD, H., & NGUITRAGOOL, W. 2022).

#### **1.4. Imunologia da malária**

A resposta imunológica ao parasito, bem como sua patogênese, pode ser dividida entre os processos desencadeados pela fase pré-eritrocítica, sem sinais clínicos, e os processos desencadeados pela fase eritrocítica, classicamente associada com paroxismos cíclicos decorrentes da ativação imunológica e uma tempestade de citocinas.

##### **1.4.1. Imunologia do estágio pré-eritrocítico**

Partindo do inóculo de esporozoítos por uma fêmea de anofelino infectada, estas células podem permanecer próximas ao local do repasto na pele (~60%) ou migrarem até atingir vasos linfáticos (~15%) ou vasos sanguíneos (~25%), nesse caso, eventualmente, atingindo o hepatócito (AMINO, R. *et al.* 2006). Durante essas etapas, os esporozoítos são expostos a diversos mecanismos de defesa do hospedeiro que, conjuntamente com as características intrínsecas do parasito, serão determinantes no processo de interação patógeno-hospedeiro.

Em estudo sobre a ativação imune frente a injeção de esporozoítos na pele, os pesquisadores observaram que, durante as primeiras horas, próximo ao local do inóculo, ocorre um rápido recrutamento de neutrófilos, perdurando, em menores níveis, por até 24 horas, enquanto um fenômeno inverso se sucede com os monócitos. Decorrido este período, quando avaliado a resposta imune induzida no linfonodo drenante (dLN), ocorre um aumento na produção de CXCL9, CXCL10, IFN- $\gamma$  e granzima B, com sustentação da produção de CXCL9 e granzima B por até 72 horas, indicando um padrão de ativação inicial de células NK (granzima B e IFN- $\gamma$ ) e o estabelecimento de uma indução da resposta imune do tipo 1 (IFN- $\gamma$ , CXCL9 e CXCL10) (MAC-DANIEL, L *et al.* 2014). Entretanto, na presença de componentes da saliva dos mosquitos, ocorre a produção de IL-10 e modulação de respostas antígeno-específicas subsequentes, comprometendo a ativação de células T (MAC-DANIEL, L *et al.* 2014 & ARORA, G *et al.* 2023)

Concomitantemente a estes processos, estudos demonstram que outras células efetoras corroboram com a resposta imune ao estágio pré-eritrocítico. Como exemplo, as células  $\gamma\delta$  são cruciais no desenvolvimento da resposta imune adaptativa, através do reconhecimento rápido de moléculas do parasito, bem como apresentação de antígenos e estimulação de células T convencionais (BRANDES M, WILLIMANN K, MOSER B. 2005). Reforçando sua importância, em estudo utilizando esporozoítos atenuados de *P. berghei* ANKA para vacinação de camundongos C57BL/6, foi observado que a depleção de células  $\gamma\delta$  induzia 100% de susceptibilidade frente ao desafio homólogo, comparado com a proteção completa em animais controles (ZAIDI, I *et al.* 2017).

Uma vez no fígado, acredita-se que o processo de replicação do parasito desencadeia o reconhecimento por receptores de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP), como os sensores de RNA (MDA5, RIG-I e TLR-2). Através destes, as células estimuladas produzem interferons do tipo I (IFN-I), TNF e IL-6, culminando na ativação de mecanismos defesa contra o patógeno e recrutamento de outras células efetoras, como células NKs produtoras de IFN- $\gamma$  e células T, capazes de auxiliar no combate ao parasito intracelular e formação de uma resposta de anticorpos (POHL, K., & COCKBURN, I. A. 2022).

Por fim, os hepatócitos ainda são capazes de apresentar antígenos via antígeno leucocitário humano (HLA) de classe I, possibilitando o desenvolvimento de

uma resposta T CD8<sup>+</sup> citotóxica, com potencial para eliminar as células infectadas (KURUP, S. P., BUTLER, N. S., & HARTY, J. T. 2019).

### 1.5. Imunologia do estágio eritrocítico

Em relação à imunidade inata desencadeada pelo estágio sanguíneo do parasito, diferentes células estão envolvidas no reconhecimento de padrões moleculares, sejam PAMPs ou DAMPs, associados aos ciclos esquizogônicos do parasito. Três principais componentes estimulam a resposta inata, sendo estes as âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), a hemozoína e os ácidos nucleicos imunoestimuladores. O reconhecimento destas moléculas desencadeia a ativação de monócitos, células dendríticas e neutrófilos, culminando na modulação imunológica destas células e na produção de citocinas de maneira desregulada (uma tempestade de citocinas), como IFNs do tipo I, IL-6, TNF, IL-10 e IFN- $\gamma$ , dentre outras, associadas ao quadro sintomático da doença (GAZZINELLI *et al.* 2014 & ANTONELLI, L. R. *et al.* 2020).

No tocante à imunidade adaptativa, estudos demonstram que a exposição continuada por longos períodos de tempo ao parasito está associada com o desenvolvimento de uma resposta imune não esterilizante, mas capaz de conferir proteção clínica à doença (SCHOFIELD, L., & MUELLER, I. 2006). Um dos principais fatores associados à imunidade clínica é a presença de anticorpos direcionados ao estágio sanguíneo do parasito, como o observado por estudos clássicos de transferência de imunoglobulinas na década de 60. À época, os pesquisadores observaram redução na carga parasitária e melhora nos sintomas da malária falciparum em crianças, após injeções periódicas de gama globulinas purificadas de pacientes hiperimunes (COHEN, S., MCGREGOR, I. A., & CARRINGTON, S. 1961 & MCGREGOR I. A., CARRINGTON S. P., COHEN S. 1963).

Curiosamente, apesar da necessidade de exposição contínua para o desenvolvimento da resposta efetiva mediada por anticorpos, paralelamente ocorre a indução e a expansão de células B de memória atípicas, com resposta efetora disfuncional (BRADDOM, A. E., BATUGEDARA, G., BOL, S., & BUNNIK, E. M. 2020). Observações feitas por Weiss e colaboradores demonstram que indivíduos vivendo em áreas endêmicas e expostos ao *P. falciparum* apresentam uma expansão no número dessas células B, com uma tendência de aumento de acordo com a idade e, portanto, tempo de exposição (WEISS, G. E. *et al.* 2009). No entanto,

para o *P. vivax* achados demonstram que a exposição repetida ao parasito aumenta o compartimento de células B de memória clássicas, em um mecanismo dependente de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foliculares produtores de IL-21 (FIGUEIREDO, M. M. *et al.* 2017) Em relação aos linfócitos T, a exposição prolongada à malária também leva a alterações em seu fenótipo, com aumento da frequência de marcadores relacionados à inibição como TIM3, LAG3, PD-1 em células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, sendo, por exemplo, células T CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>TIM3<sup>+</sup> mais frequentes em pacientes sob alta exposição (CHAVES, Y. O *et al.* 2016 & MITCHELL, R. A. *et al.* 2024).

As células T CD4<sup>+</sup> desempenham um papel principal na montagem da resposta humoral evidenciado por estudos em pacientes gestantes infectadas com HIV. Concomitantemente a isso, a diminuição nos níveis de células T CD4<sup>+</sup> está associada com redução na resposta de anticorpos contra antígenos variantes de superfície (VSA) em eritrócitos infectados com *P. falciparum* (MOUNT, A. M. *et al.* 2004). Assim, os estudos que avaliam o bloqueio de marcadores de inibição, como PD-1 e LAG3, evidenciam a importância funcional dessas células na montagem de centros germinativos importantes para a eliminação do parasito em estágio sanguíneo (BUTLER, N. S. *et al.* 2012). Ademais, achados comprovam a diminuição da atividade de células T reguladoras, com expressão aumentada de PD-1, favorecendo um controle parasitário, mas aumentando os riscos a danos teciduais (COSTA. P. A. C. *et al.* 2018).

Outro importante aspecto da ativação imune frente ao estágio sanguíneo é a expansão de células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas (LUNDIE, R. J. *et al.* 2008). Uma vez que esses linfócitos reconhecem peptídeos associados ao HLA de classe I, seja na superfície de células infectadas ou na superfície de células apresentadoras de antígenos, seu papel na imunidade contra o estágio sanguíneo recebeu pouca importância, uma vez que eritrócitos maduros não possuem essas moléculas (KURUP, S. P., BUTLER, N. S., & HARTY, J. T. 2019). Assim, o papel de linfócitos T CD8<sup>+</sup> era majoritariamente associado à defesa contra o estágio pré-eritrocítico, tal como à patologia da doença no estágio sanguíneo. Entretanto, reticulócitos, células eritróides que passaram pelo processo de enucleação recente, sabidamente possuem a capacidade de apresentar antígenos em sua superfície via HLA de classe I e representam o principal alvo de merozoítos de *P. vivax* (Malleret, B. *et al.*

2015), dessa forma, sugerindo um possível mecanismo efetor anti-parasitário para essas células.

**Figura 4 - Sinapse imunológica entre células T CD8<sup>+</sup> e iRetics**

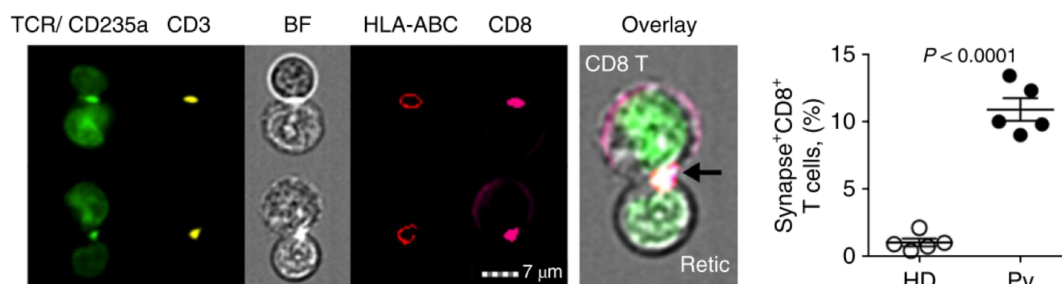


Figura adaptada de JUNQUEIRA *et al.* 2018. Nature Medicine. A imagem retrata a interação entre células marcadas com anticorpos específicos para TCR (do inglês, *T cell receptor*), CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, configurando assim um linfócito T CD8<sup>+</sup> interagindo com por meio de uma sinapse imunológica com uma célula marcada com CD235a (Glicoforina A, marcador de células da linhagem eritrocítica) e HLA-ABC (molécula principal no complexo de apresentação de antígenos de classe I). No gráfico é possível observar a frequência desses eventos (sinapse imunológica), comparando o reconhecimento de células saudáveis (interações fracas e tônicas), ou HD, com àquelas diretamente mediadas por processos imunes infecciosos, no caso a presença do parasito no interior do citoplasma de reticulócitos infectados (resposta específica e efetiva), nomeados como Pv.

Estudos recentes comprovam essa hipótese. Achados de Junqueira e colaboradores demonstraram que linfócitos T CD8<sup>+</sup> reconhecem peptídeos apresentados via HLA-I por reticulócitos infectados com *P. vivax* e desempenham função efetora frente ao engajamento do TCR, com eliminação do parasito intracelular através da secreção de granulinsina e granzima B (JUNQUEIRA, C. *et al.* 2018). Esse achado foi posteriormente explorado, através de uma imunopeptidômica, com isolamento do complexo peptídeo-HLA-I para análise por espectrometria de massa, demonstrando a presença de peptídeos derivados de proteínas conservadas entre diferentes espécies de *Plasmodium*. Essas proteínas apresentam-se como candidatos importantes, com teórica capacidade de induzir proteção contra o estágio sanguíneo do parasito. Dentre as proteínas encontradas na imunopeptidômica estão membros da família de ETRAMPs, reforçando seu potencial imunogênico e sua significância *in vivo* (BARBOSA, C., *et al.* 2025 - Res Sq [Preprint]), indicando novos caminhos para o desenvolvimento vacinal, historicamente limitado à indução de anticorpos.

## 1.6. Vacinas antimaláricas

As vacinas antimaláricas podem ser divididas em três grandes espectros de abordagens, incluindo as vacinas destinadas ao bloqueio da fase pré-eritrocítica, as vacinas destinadas a controlar/interrromper o ciclo eritrocítico da doença e as vacinas destinadas ao bloqueio/interrupção da transmissão vetorial (DRAPER, S. J *et al.* 2018). Os esforços para o desenvolvimento vacinal, no entanto, não são igualitários entre as diferentes espécies, sendo o *P. falciparum* a espécie de maior foco e estudo, seguida pelo *P. vivax*.

**Figura 5 - Principais candidatos vacinais para malária**

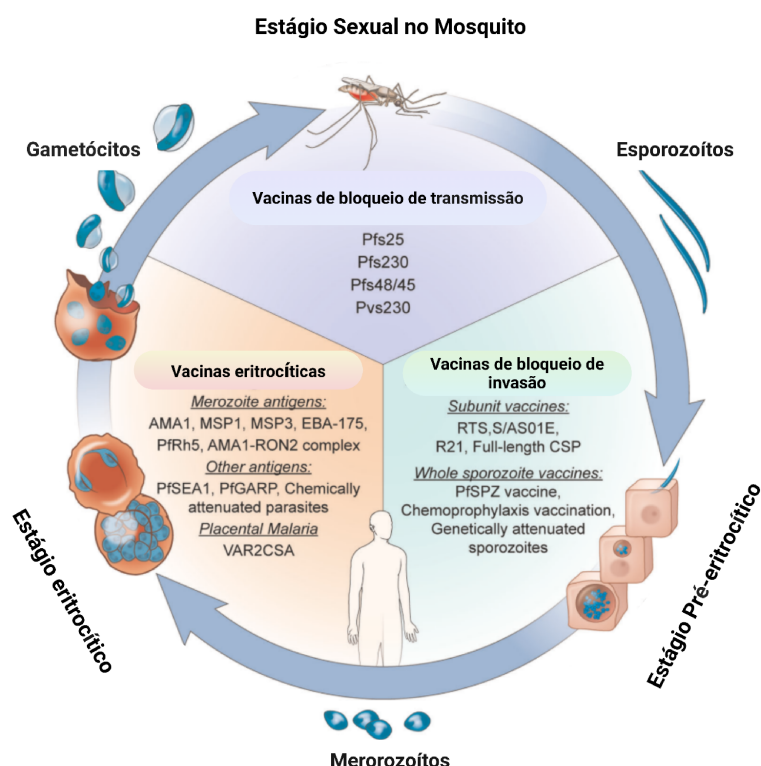


Figura adaptada de DUFFY, P. E. & GORRES, J. P. 2020. *npj Vaccines*.

### 1.6.1. Vacinas para o estágio pré-eritrocíticos

A busca por vacinas contra a fase pré-eritrocítica ganhou um de seus primeiros pontapés quando, em 1967, Nussenzweig e colaboradores optaram por testar a teoria de que esporozóitos rádio-atenuados, em oposição ao fracasso da

injeção de esporozoítos mortos, poderiam induzir alguma imunidade protetora em seus modelos de teste. Utilizando raios-X para obter a inativação de esporozoítos de *P. berghei*, os pesquisadores conseguiram, com altas doses de esporozoítos inativados (75.000/animal) induzir uma proteção média, restrita à fase pré-eritrocítica, de 63% após o desafio (NUSSENZWEIG, R.S *et al.* 1967). Nos anos seguintes, Clyde e colaboradores (CLYDE, D. F. *et al.*, 1973a & CLYDE, D. F. *et al.*, 1973b) demonstraram efeitos similares ao estudo de 1967, observando proteção esterilizante em um paciente humano, em ensaio de infecção humana controlada (do inglês, *controlled human infection model - CHIM*), imunizado com esporozoítos de *P. falciparum* rádio-atenuados, frente ao desafio homólogo. Em seus trabalhos, os pesquisadores também referem a especificidade da resposta, restrita ao estágio pré-eritrocítico, além de observar também a ausência de imunidade cruzada contra o desafio heterólogo usando *P. vivax*. Alguns anos depois, outros estudos foram feitos utilizando esporozoítos irradiados de *P. vivax*, sendo similarmente promissores em termos de indução de proteção esterilizante contra desafio homólogo estágio-específico, conforme revisado por Clyde (CLYDE, D. F. 1990). A partir deste e outros achados, a busca de uma vacina pré-eritrocítica foi alavancada, com esforços majoritariamente direcionados à indução de anticorpos contra proteínas de superfície dos esporozoítos, de forma a bloquear a invasão de hepatócitos ou facilitar o reconhecimento e eliminação do patógeno em tecidos periféricos; bem como a indução de uma resposta mediada por células T, capaz de reconhecer e eliminar as células infectadas (DUFFY, P. E., & GORRES, P. J., 2020).

Atualmente, diferentes grupos permanecem explorando o uso de esporozoítos de *P. falciparum* atenuados, em associação ou não com quimioprevenção, observando, em muitos casos, proteção esterilizante dependendo do regimento vacinal, incluindo número de doses e número de esporozoítos injetados nas imunizações. Dentre os achados importantes, Seder e colaboradores relatam um aumento (dose dependente) nos níveis de anticorpos dos indivíduos protegidos pela vacinação, bem como em níveis de células T $\gamma\delta$ , de células de memória (CD45RA CCR7) T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2. Os efeitos observados foram proeminentes na dose mais alta avaliada, de  $1,35 \times 10^5$  esporozoítos/dose, ainda que variáveis entre indivíduos imunizados e protegidos. Os pesquisadores também relatam maior produção de IFN- $\gamma$ , avaliado por meio de ELISpot, nos grupos vacinados com 5 doses a  $1,35 \times 10^5$  esporozoítos/dose (SEDER, R. A. *et al.*, 2013).

Similarmente, Mordüller e colaboradores em um ensaio clínico associado com quimioprevenção com cloroquina, também relatam achados similares, com proteção esterilizante sendo obtida com  $5,12 \times 10^4$ /dose, em regimento de 3 doses com 28 dias de intervalo, além de uma correlação dose dependente em níveis de anticorpos, de células de memória T CD4<sup>+</sup>, produtoras de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2, e células T CD8<sup>+</sup>, bem como um aumento na frequência de células T $\gamma\delta$  (MORDMÜLLER, B., *et al.*, 2017). Entretanto, apesar de uma abordagem promissora, com resultados importantes em cenários não endêmicos e inconsistências em cenários endêmicos, as dificuldades técnicas de produção, associadas ao alto custo de armazenamento e transporte dessas vacinas, corroboram com a baixa adesão global à plataforma (NUNES-CABAÇO, H., MOITA, D., & PRUDÊNCIO, M. 2022).

Outra abordagem para o desenvolvimento vacinal para a fase pré-eritrocítica envolve o uso de vacinas de subunidades, sendo o alvo mais estudado a proteína circunsporozoíta de superfície (do inglês, *circumsporozoite surface protein - CSP*), primeiramente sequenciada, a partir de um isolado brasileiro de *P. falciparum*, em 1984, por Dame e colaboradores (DAME *et al.* 1984). Como uma proteína funcionalmente associada com o processo de invasão de hepatócitos, seu bloqueio torna-se um alvo importante para a prevenção da infecção.

Assim, a partir de estudos anteriores, em 1987, surge a vacina RTS,S, composta por fragmentos da CSP de *P. falciparum* (NF54) contendo a porção final da região central (R), com 18 repetições de 4 aminoácidos (NANP), e a porção C-terminal da proteína, rica em epítomos de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (T). Ademais, a porção N-terminal do antígeno S (S) do vírus da hepatite B (HbV) foi fusionada às porções RT e expressas em um cassete em *Saccharomyces cerevisiae* contendo o antígeno S, levando à formação de estruturas análogas ao vírus HbV, constituídas pelo antígeno S associado espontaneamente com a quimera RTS, exposta em sua superfície (LAURENS M. B. 2019) Entre os anos de 2009 a 2014, a vacina RTS,S formulada com o adjuvante AS01, passou pelo ensaio clínico de fase III (NCT00866619), sendo testada em sete regiões africanas, em 15.459 indivíduos. Os achados demonstraram que a vacina com apenas três doses possui baixa eficiência em recém-nascidos para evitar malária clínica ou severa, aumentando com a quarta dose. Similarmente, a vacina em crianças entre 5-17 meses apresentou menor eficácia com apenas 3 doses, com eficácia inicial de 1,1%. Com mais um reforço, totalizando 4 doses, a vacina atingiu seu melhor desempenho, chegando a 36,3% de

eficácia contra malária clínica e 32,2% contra casos severos da doença (NADEEM A, *et al.*, 2022). Apesar de insatisfatórios comparados com a meta estabelecida pela OMS, uma eficácia de 75% contra malária clínica em áreas endêmicas, tais achados justificaram a recomendação, em outubro de 2021, da RTS,S/AS01 para a prevenção de malária falciparum em crianças vivendo em áreas de moderada a alta transmissão.

Considerando a necessidade de melhorar o desempenho vacinal e o sucesso significativo do candidato utilizado, novos estudos foram elaborados para otimizar a vacinação com a CSP. Culminando, em outubro de 2023, com uma nova recomendação pela OMS.

A segunda vacina aprovada para malária também é baseada na proteína CSP, a R21/Matrix-M, como uma estratégia complementar a RTS,S. Em seu estudo clínico de fase III, a vacina demonstrou uma eficácia em prevenir o primeiro episódio de malária clínica de 75% em cenários de transmissão sazonal e de 68% em cenários de transmissão estável ao longo de um período de observação de 12 meses. Quando avaliado a eficácia da R21 contra múltiplos episódios de malária, o estudo demonstrou uma eficácia de 72% (DATOO M. S., *et al.*, 2024), resultado extremamente importante considerando o risco de exposição constante de crianças à doença, pertencentes à faixa etária mais afetada por casos graves e letais (WHO, 2024). Dessa forma, a R21/Matrix-M atinge o objetivo inicial de otimizar a proteção conferida e reforça a importância da CSP no contexto da infecção e sua prevenção (ADERINTO, N. *et al.* 2024).

Por sua vez, para o *P. vivax* os esforços relacionados ao desenvolvimento de vacinas pré-eritrocíticas estão igualmente relacionados com a CSP. Entretanto, ao contrário do *P. falciparum*, que possui 22 alelos (PATEL, P. *et al.* 2017), o *P. vivax* apresenta três alelos, com duas variantes genótípicas mais frequentes, estas sendo a VK210 e a VK247 — que diferem em relação à sua região central repetitiva, impactando, por exemplo, a resposta imunológica e a infectividade em mosquitos vetores (SOARES I. F. *et al.*, 2020 & DA SILVA, A. N. M. *et al.*, 2006). Assim, a composição de uma vacina que tenha como alvo a CSP de *P. vivax* necessita considerar tais variantes.

Em estudo publicado por Camargo e colaboradores, duas diferentes quimeras protéicas, contendo porções da região repetitiva das três variantes, foram testadas, inicialmente, em modelo murino para avaliar a efetividade em evitar a infecção frente

ao desafio utilizando *P. berghei* ANKA transgênico expressando a PvCSP, seja variante VK210 ou VK247. Os achados demonstram significativa capacidade de produzir anticorpos específicos, com predominância de IgG1 indicando um padrão polarizado para resposta do tipo Th2, bem como provam a efetividade da vacina em retardar o aparecimento de parasitemia sanguínea em animais vacinados frente ao desafio (DE CAMARGO *et al.*, 2018). A partir desses achados, o desenvolvimento de uma vacina pré-eritrocítica abrangente para as diferentes variantes da PvCSP apresentou-se possível, sendo posteriormente explorado pelo grupo (GIMENEZ *et al.*, 2021).

Considerando esses trabalhos, podemos compreender que alguns avanços foram feitos no tocante ao desenvolvimento vacinal para alvos pré-eritrocíticos, com especial enfoque na proteína CSP. No entanto, os resultados demonstram a ausência de uma resposta esterilizante para as vacinas aprovadas, além de uma limitação estágio-específica e cepa-específica, dado o alto polimorfismo das proteínas de *P. falciparum* (MANDEFRO, A. *et al.* 2025). Dessa forma, uma vez que a infecção seja bem sucedida, alcançando o estágio sanguíneo, a doença estará instaurada, indicando a necessidade de abordagens complementares à estratégia vacinal proposta. Em relação ao *P. vivax*, apesar das tentativas mencionadas, nenhuma atingiu sucesso em estudos clínicos, reforçando a importância da continuidade dos esforços de pesquisa e desenvolvimento para essa doença negligenciada.

### **1.6.2. Vacinas para o estágio eritrocítico**

Em relação às vacinas eritrocíticas, assim como as primeiras abordagens para o desenvolvimento de uma vacina para bloqueio de invasão, essas se iniciaram com estudos utilizando os parasitos em sua totalidade (SIDDIQUI W. A., 1977). À época, observou-se que a imunização de primatas *Aotus trivirgatus* com merozoítos da cepa FUP de *P. falciparum*, altamente virulenta para a espécie, conferia proteção parcial ao desafio homólogo sanguíneo, além de evitar a letalidade nos animais imunizados (n= 3). Tais achados propulsionam a busca por candidatos vacinais capazes oferecer proteção contra o estágio eritrocítico da infecção, culminando em estudos majoritariamente destinados ao *P. falciparum*, que buscaram avaliar a capacidade protetora de antígenos associados aos mecanismos clássicos de invasão das células da linhagem eritróide. Alguns dos principais antígenos

envolvidos nesta estratégia incluem as proteínas de superfície do merozoíto (*Merozoite Surface Proteins* - MSP), bem como o antígeno apical de membrana 1 (*Apical Membrane Antigen* - AMA1), ambos altamente polimórficos (DUFFY, P. E., 2022).

Dentre a família de MSPs, dois candidatos receberam mais atenção, sendo estes a MSP-1 e a MSP-3. Em estudo publicado por Miller e colaboradores, foi observado que a porção C-terminal da proteína MSP-1, referenciada no estudo como parte do bloco 17, apresentou alta homologia entre diferentes cepas de *P. falciparum*, bem como alta identidade com *P. yoelii*, uma espécie evolutivamente divergente (MILLER, L. H. *et al.*, 1993). Esta característica permitiu que diversas conclusões feitas através de estudos utilizando esse modelo murino fossem extrapoladas para *P. falciparum*. Achados, como os descritos em revisão por Michael F. Good, indicam que os anticorpos induzidos pela imunização com a MSP-1 apresentam capacidade de reduzir a carga parasitária, mas não eliminá-la, um aspecto intrinsecamente relacionado com altos títulos de imunoglobulinas no momento do desafio (GOOD, M. F., 2001).

Apesar de seu potencial vacinal, ensaios clínicos utilizando a PfMSP1 demonstraram baixo potencial protetor, que observaram alta imunogenicidade da MSP-1 entregues por ChAd63-MVA, sem, no entanto, nenhum efeito no controle da parasitemia sanguínea de pacientes não expostos desafiados com a cepa 3D7 de *P. falciparum* (SHEEHY, S. H. *et al.*, 2012). Similarmente aos achados com MSP1, a PfMSP3 conjugada à proteína rica em glutamato de *P. falciparum* (Glutamate-rich protein - GLURP) em ensaio clínico de fase 2b, demonstrou baixa eficácia, 13,8% em crianças de 3 a 5 anos, indicando que a exposição ao parasito e o desenvolvimento de uma resposta imune à infecção natural desempenham papel sinérgico com a vacinação em crianças mais velhas (DASSAH, S. *et al.*, 2021).

Além disso, a PfAMA1 também apresentou desempenho abaixo do desejado em ensaios clínicos. Os resultados demonstraram que a vacinação com esses antígenos não impactava o controle da parasitemia, corroborado por outro estudo clínico de fase I/IIa (SAGARA, I. *et al.*, 2009; DUNCAN, C. *et al.*, 2011).

Apesar do baixo sucesso dos antígenos de fase eritrocítica anteriores, a proteína homóloga aos ligantes de reticulócitos 5 (*reticulocyte-binding homologue 5* - RH5) vem se mostrando bem promissora. Ao avaliar *in vivo* a PfRH5, foi possível observar o potencial protetor quase esterilizante em macacos *Aotus nancymae*,

principalmente relacionado a uma resposta robusta de anticorpos com capacidade de oferecer proteção cruzada a diferentes cepas de *P. falciparum*, dado o baixo polimorfismo da proteína (DOUGLAS, A. D. *et al*, 2015). Em recente estudo de fase clínica IIb, foi observado uma eficácia vacinal de até 55% (IC 95% 20 a 75%) na prevenção de episódios de malária clínica em crianças expostas, em Burkina Faso, de 5 a 17 meses, durante um período de acompanhamento de 6 meses. Os achados ainda indicaram a presença de altos níveis de IgG, 14 dias após a última dose com alta capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de *P. falciparum* (NATAMA, H. M. *et al*. 2025).

Em relação aos candidatos vacinais destinados para *P. vivax*, similarmente aos esforços empregados para *P. falciparum*, historicamente estes têm sido pautados na busca por antígenos associados a processos de invasão, com PvAMA1 e PvMSP1 dentro do escopo de alguns estudos. Entretanto, de acordo com informações disponibilizadas pela OMS, apenas 3 vacinas eritrocíticas atingiram estágios clínicos, todas baseadas no antígeno PvDBP. Destas, duas permanecem ainda ativas.

Estas utilizam a porção II da proteína DBP (PvDBPII), essencial para a dimerização com o receptor DARC, da cepa Sal-1 de *P. vivax*. Os estudos clínicos de fase I e IIa em pacientes não expostos, imunizados utilizando a plataforma ChAd63-MVA ou a combinação com o adjuvante Matrix-M e desafiados com a cepa heteróloga PvW1, demonstraram, inicialmente, que os anticorpos induzidos pela vacinação possuíam capacidade moderadamente baixa de inibir a multiplicação *in vitro* do parasito. Os resultados apontaram efetividade de 29% contra *P. knowlesi* expressando a DBPII de PvW1, com resultados comparáveis com a DBPII de *P. knowlesi* Sal-1. Concordantemente, o desafio controlado dos pacientes culminou com a evolução em todos os grupos para o diagnóstico clínico de malária, com, no entanto, um atraso de aproximadamente 7 dias em pacientes imunizados com a PvDBPII associada ao adjuvante Matrix-M (HOU, M. M. *et al*. 2023).

Assim, os achados mencionados ressaltam as dificuldades para o desenvolvimento vacinal para o estágio eritrocítico, dado a complexidade das vias de invasão e a variabilidade antigênica. Dessa forma, estratégias pautadas apenas na resposta de anticorpos contra esses antígenos de superfície oferecem resultados insatisfatórios e estratégias complementares são necessárias.

### 1.6.3. Vacinas de Bloqueio de Transmissão

Essencialmente, o mecanismo de proteção para as vacinas de bloqueio de transmissão é mediado por anticorpos direcionados a proteínas de superfície das formas sexuadas ou fertilizadas, os gametócitos ou os zigotos e oocinetos, e buscam induzir a imunidade a nível populacional a fim de reduzir a transmissão (CHATURVERDI, N. *et al.* 2016). Atualmente, dentre os antígenos estudados para desenvolvimento vacinal, sendo explorados em ensaios clínicos, encontram-se a Pfs230 e a Pfs48/45, alvos pré-fertilização. Bem como a Pfs25, de *P. falciparum*, assim como a ortóloga em *P. vivax*, a Pvs25, como alvos pós- fertilização.

Em estudo com a Pfs230, uma proteína rica em cisteínas, foi demonstrado a importância da correta conformação para geração de anticorpos capazes de bloquear a transmissão para o mosquito (TACHIBANA, M. *et al.* 2019), sendo esse achado aplicável também para os outros membros da mesma família de proteínas, como a Pfs48/45. Em trabalho recente, formulando ambos os antígenos em vacinas únicas, demonstrou-se promissora capacidade de induzir anticorpos de bloqueio de transmissão, mais efetivos do que a vacinação com um ou outro antígeno, atingindo bloqueio completo em ensaios de alimentação de mosquitos por membranas (MFA) (SINGH, S. K *et al.* 2019).

Estudos clínicos usando esses antígenos, Pfs230 e Pfs48/45 associados à CSP (ProC6C), para *P. falciparum* demonstram manutenção dos achados anteriormente citados. Em avaliação clínica de fase I, indivíduos expostos imunizados com 100 µg da formulação apresentando alta capacidade de bloqueio da transmissão em MFA, atingindo >80% de eficácia em 13 dos 21 avaliados, com outros 5 apresentando de 54% a 79% de eficácia. Interessantemente, quando anticorpos específicos contra a quimera ProC6C foram depletados do soro de indivíduos altamente responsivos, com eficácia anterior de 98% nos ensaios de MFA, indicaram uma redução significativa na capacidade de bloqueio, atingindo 29% de eficácia. Assim, esse achado reforça a significância desses anticorpos específicos contra os antígenos alvo (TIONO, A. B *et al.* 2024).

Posteriormente, foram avaliadas a magnitude e a durabilidade dos anticorpos induzidos específicos para Pfs230 e Pfs48/45 pela vacinação com a ProC6C, sendo observado que, apesar de ainda presentes quatro meses após a última dose, ao longo do tempo a capacidade de bloqueio diminuiu. Os pesquisadores relatam que, comparando a eficiência por MFA dos anticorpos duas semanas após a última dose

(D70) e decorridos 4 meses (D180), há uma diminuição significativa na funcionalidade dos anticorpos induzidos, com 18 de 20 pacientes responsivos no D70 evoluindo para 7 no D180, resposta similar aos controles (NAGHIZADEH, M. *et al.* 2025).

Por sua vez, para *P. vivax*, similarmente às outras abordagens vacinais, estudos vêm sendo destinados para proteínas ortólogas de *P. falciparum*, sendo a Pvs25 a mais avançada até o momento. Entretanto, estudos clínicos prévios com esse antígeno demonstraram baixa imunogenicidade, com eficácia insatisfatória por MFA (MALKIN, E. M *et al.* 2005), bem como alta reatogenicidade frente a vacinação formulada com o adjuvante Montanide ISA 51, com descrição de leucopenia, artralgia, mialgia e eritema nodoso após a vacinação (WU, Y. *et al.* 2008). Assim, como previsto na época, estudos para melhorar a imunogenicidade e diminuir efeitos adversos deveriam ser desenvolvidos, culminando em trabalhos como o de Kunkeaw e colaboradores (2023).

Neste, os pesquisadores relatam aumento da resposta de anticorpos, em modelo murino, frente a formulação de mRNA associado a nanopartículas, quando comparado à proteína formulada com ISA 51. Outro importante achado é o aumento da meia vida desses anticorpos após a vacinação com mRNA, sendo preditos de serem 2,5 vezes mais duráveis que os induzidos pela vacinação proteica. Por fim, usando MFA os pesquisadores foram capazes de observar uma manutenção da eficácia no bloqueio da transmissão (>99%) com soro de animais imunizados (mRNA) 7 meses o reforço, enquanto que aqueles imunizados com o antígeno proteico apresentaram redução, atingindo 63% de eficiência (KUNKEAW, N *et al.* 2023).

#### **1.6.4. Outras abordagens vacinais**

Além das estratégias vacinais exemplificadas, outros caminhos para combater a patogenia e o parasito vem sendo abordados. Dentre estes, por exemplo, o candidato vacinal VAR2CSA, de *P. falciparum*, compõe um importante alvo para uma vacina para evitar a malária placentária. A PfVAR2CSA é um membro da família de proteínas expressas na superfície do eritrócito infectado por *P. falciparum* e está presente em todos os genomas do parasito, sendo responsável por mediar o sequestro das células infectadas no endotélio placentário através da interação com

sulfato de condroitina na superfície desses alvos (DUFFY, P. E., GORRES, J. P. HEALY, S. A. & FRIED, M. 2024).

Outra abordagem, conceitualmente inclusa nas vacinas de bloqueio de transmissão, foca no direcionamento de anticorpos contra antígenos de superfície do intestino de mosquitos vetores, sendo a alanil-aminopeptidase de anofelinos (AnAPN1) um dos candidatos mais promissores. Essa proteína, uma lectina, medeia a interação com o oocineto no intestino do mosquito, sendo seu bloqueio associado à inibição da infecção do hospedeiro invertebrado (TACHIBANA, M *et al.* 2025).

### 1.7. **Early Transcribed Membrane Proteins - ETRAMPs**

Entre os antígenos exclusivos de espécies de *Plasmodium*, encontram-se a família de proteínas de membrana transcritas precocemente (*Early Transcribed Membrane Proteins* - ETRAMPs). Inicialmente descritas a partir de estudos com *P. falciparum*, essas proteínas foram agrupadas dadas as suas características estruturais, com um peptídeo-sinal N-terminal, sucedido por uma região curta e catiônica, pelo menos um domínio transmembrana e uma região C-terminal variável, voltada para o citoplasma do hospedeiro (SPIELMANN, T., & BECK, H. P. 2000). Na época, três transcritos foram identificados no estágio inicial de desenvolvimento no eritrócito, forma de anel, infectado por *P. falciparum*. Posteriormente, os pesquisadores caracterizam outros três genes de expressão fortemente ligados à mesma fase (0-22 h pós infecção). Sendo encontradas também outras 8 ETRAMPs de expressão variável no estágio sanguíneo (SPIELMANN, T., FERGUSEN, D. J. P., & BECK, H.-P. 2003).

Também é relatado a localização próxima de membros dessa família de proteínas, como a PfETRAMP 2, PFETRAMP 4 e PfETRAMP 10.1, com a proteína exportada 1 (*Exported Protein 1* - EXP1), sabidamente associada com o vacúolo parasitóforo, uma membrana formada durante o processo de invasão, compondo microdomínios homo diméricos não randômicos. Assim, indicando uma provável função nessa interface de interação parasito-hospedeiro, composta pela membrana do vacúolo parasitóforo e suas proteínas associadas. Outro importante achado do grupo demonstra a presença dessas proteínas em vesículas citoplasmáticas nos eritrócitos infectados, novamente colocalizados com a PfEXP1, originadas do vacúolo parasitóforo (SPIELMANN, T., FERGUSEN, D. J. P., & BECK, H.-P. 2003 & SPIELMANN, T. *et al.* 2006).

**Figura 6 - Expressão de PfETRAMPs ao longo do ciclo eritrocítico**

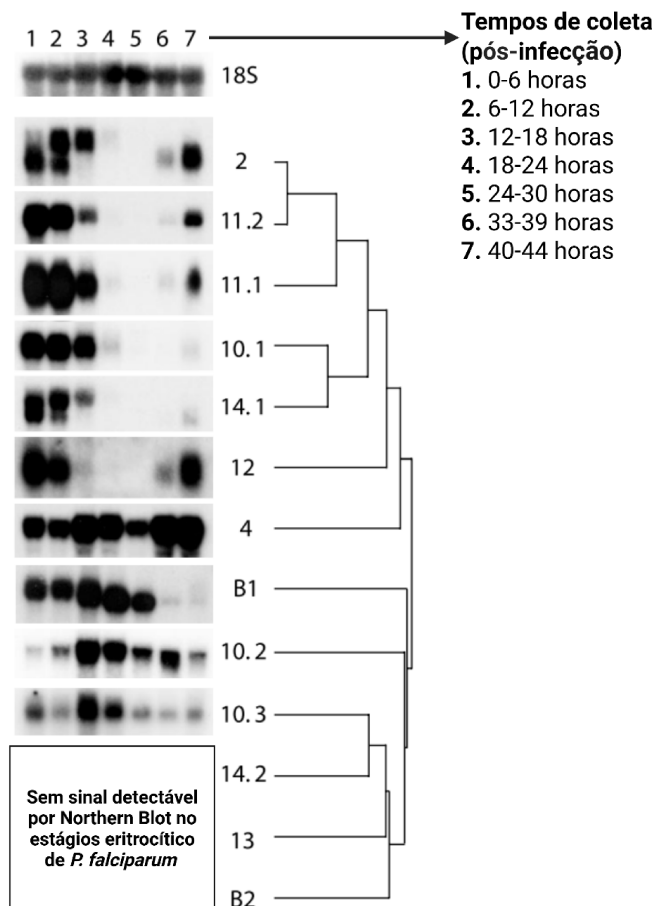


Figura adaptada de SPIELMANN, T., FERGUSEN, D. J. P., BECK, H.-P. 2003. A imagem demonstra, através da hibridização de sondas de RNA marcadas com mRNAs referentes a cada ETRAMP de *P. falciparum*, a presença de transcritos alvos ao longo do ciclo eritrocítico do parasito. Essa técnica de hibridização é chamada de *Northern Blotting*. Como controle, os pesquisadores utilizaram o transcrito ribossomal constitutivo do parasito, o mRNA codificante para a porção 18S do ribossomo.

Como componentes do vacúolo parasitóforo, essas proteínas podem desempenhar papéis relacionados, por exemplo, a aquisição de nutrientes e lipídeos, ao transporte e deslocamento de proteínas exportadas através de interações com o translocon (PTEX) e a formação de microvesículas originadas do vacúolo (SPIELMANN, T., MONTAGNA, G. N., HECHT, L., & MATUSCHEWSKI, K. 2012). Entretanto, dada a baixa homologia entre ortólogos e a, aparente,

redundância funcional entre ETRAMPs no mesmo organismo, os estudos para caracterizá-las funcionalmente enfrentam desafios.

Dentre esses estudos, dois alvos foram inicialmente explorados dado sua importância para o estabelecimento da infecção hepática. Estes alvos, nomeados como proteínas de expressão aumentada no esporozoíto infectante (*Up-regulated in infective sporozoite* - UIS), a UIS3 e a UIS4 pertencem à família de ETRAMPs, e demonstraram-se refratários à deleção em *P. berghei*. Além de terem sido descritos como altamente importantes para desenvolvimento do estágio hepático, cujo a perturbação implica em arraste ou encerramento do ciclo parasitário ainda no fígado (MUELLER, A.-K. *et al.* 2005a & MUELLER, A.-K., LABAIED, M., KAPPE, S. H. I., & MATUSCHEWSKI, K. 2005b). Posteriormente, a proteína UIS3 de *P. yoelii*, ortóloga da PbUIS3, foi descrita como capaz de interagir com a proteína hepática ligante a ácidos graxos (*Liver fatty-acid binding protein* - L-FABP), possivelmente apresentando papel na captação de lipídeos para o parasito *in vivo* (MIKOLAJCZAK, S. A. *et al.* 2007).

Além disso, MacKellar e colaboradores avaliaram o perfil de expressão e comprovaram, por meio de experimentos de depleção, a importância de duas das nove ETRAMPs não caracterizadas em *P. yoelii*, sendo os genes PY02667 e PY07506 refratários ao nocaute, com sua ausência comprometendo a progressão no ciclo parasitário. As demais sete proteínas caracterizadas pelo grupo aparentemente não desempenham funções críticas, ou desempenham funções redundantes, ao longo do ciclo parasitário (MACKELLAR, D. C. *et al.* 2011). De forma interessante, havia sido demonstrado que apesar de ortólogos, a proteína PyUIS4, essencial para o desenvolvimento hepático do parasito, não poderia ser substituída por seu ortólogo teórico em *P. falciparum*, a proteína PfETRAMP 10.3 (MACKELLAR, D. C. *et al.* 2010), reforçando a incongruência funcional desses alvos e evidenciando a dificuldade de transposição de conclusões experimentais em modelos murinos.

Similarmente aos estudos anteriormente descritos, Cheng e colaboradores, em estudo sobre uma das ETRAMP de *P. vivax*, descreve a localização próxima da PvETRAMP 11.2 com a PvEXP1 no vacúolo parasitóforo, além de identificarem sua presença em organelas apicais de merozoítos recém-formados. Neste mesmo estudo, os pesquisadores ainda avaliaram a reatividade de proteínas recombinantes frente ao soro de pacientes infectados com *P. vivax*, obtendo 76,8% de sensibilidade

(CHENG, Y. *et al.* 2015). Esses achados reforçam observações anteriores, além de indicarem sua significativa imunogenicidade *in vivo*.

Em estudo mais abrangente, Lee e colegas exploraram 6 dentre as 9 ETRAMPs codificadas em *P. vivax*. Seus achados apontaram que pacientes de área endêmica infectados com *P. vivax* possuíam altos níveis de IgG contra membros da família de ETRAMPs, sendo a PvETRAMP 4 e a PvETRAMP 11.2 altamente reativas (LEE, S. -K. *et al.* 2019). Assim, indicando que a exposição natural é capaz de induzir uma resposta imune robusta, corroborando a ideia de desenvolvimento vacinal utilizando esses candidatos. Ademais, para a PvETRAMP 11.2 foi feita a caracterização de seu polimorfismo em diferentes cepas de *P. vivax*, com 208 sequências avaliadas, demonstrando um baixo polimorfismo genético, com 11 variações alélicas, e três substituições de aminoácidos na região C-terminal (PERROTI, E. *et al.* 2023). Sendo o baixo polimorfismo uma característica importante para um candidato vacinal.

Por fim, foi demonstrado que a vacinação com a PfUIS3 associada ao Ch63-MVA conferiu proteção esterilizante em aproximadamente 31% dos animais imunizados e desafiados com esporozoítos de *P. berghei* transgênico, expressando a proteína alvo, além de retardar significativamente o aparecimento da parasitemia sanguínea. Sendo essa proteção mediada significativamente por células T CD8<sup>+</sup> (LONGLEY, R. J. *et al.* 2017).

### **1.8. Modelos murinos**

Dada a especificidade do processo de invasão dos protozoários do gênero *Plasmodium*, os parasitos humanos não podem infectar diretamente camundongos, exceto quando humanizados geneticamente, enquanto o contrário também não ocorre. Assim, ao longo dos anos diferentes cepas, naturalmente presentes nesses animais, foram estudadas e caracterizadas quanto a sua capacidade de mimetizar aspectos imunes e patológicos da infecção, representando ferramentas seguras e importantes no entendimento da doença. Dessa forma, para a avaliação da resposta imunológica frente a antígenos do estágio sanguíneo, quatro espécies de parasitos infectantes para murinos mostram relevância, sendo estes *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. chabaudi* e *P. vinckei*, cada uma ainda podendo ser dividida em outras cepas com virulência, tropismos e patologias únicas (OLATUNDE, A. C., CORNWALL, D. H., ROEDEL, M., & LAMB, T. J. 2022).

Dentre os diversos modelos murinos, a infecção por *P. yoelii*, em especial com a cepa não letal 17XNL, possui tropismo preferencial por reticulócitos, além de induzir uma resposta protetora mediada por células T CD8<sup>+</sup> (HOJO-SOUZA, N. S. *et al.* 2020). Portanto, devido às características imunobiológicas desta cepa, que se assemelham às características de *P. vivax*, esta é amplamente utilizada como um modelo murino comparativo ao *P. vivax*, fornecendo um valioso modelo para entendimento da resposta imunológica.

## 2. JUSTIFICATIVA

A malária permanece como uma doença parasitária de alto impacto para a saúde pública. Como preconizado pela OMS, o desenvolvimento de uma vacina contra diferentes espécies de *Plasmodium* é um importante avanço para a eliminação da doença (WHO, 2016). Apesar de décadas de pesquisa no desenvolvimento de vacinas contra a malária, apenas duas vacinas foram licenciadas contra a doença, a RTS,S/AS01 e a R21/Matrix-M. Ambas são destinadas contra o estágio pré-eritrocítico do *P. falciparum*, almejando bloquear a invasão dos hepatócitos por esporozoítos através de altos títulos de anticorpos específicos contra a proteína CSP (DATOO, M, S. *et al.*, 2022 & LAURENS, M. B., 2019). Por sua vez, para o *P. vivax* não há nenhuma abordagem vacinal licenciada para uso humano e os estudos desenvolvidos seguem trajetórias similares ao testado para *P. falciparum*, com enfoque na resposta humoral seja para a fase pré-eritrocítica ou para a fase eritrocítica.

Apesar do papel crucial de anticorpos na proteção contra *Plasmodium*, o papel de linfócitos na proteção contra a malária ainda é pouco caracterizado, principalmente quanto à identificação dos antígenos reconhecidos. Em um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa, foi caracterizado o papel protetor de linfócitos T CD8+ ao reconhecerem e eliminarem reticulócitos infectados por *P. vivax* (JUNQUEIRA, C. *et al.*, 2018). A partir de técnicas de proteômica, foi elucidado o imunopeptidoma de reticulócitos infectados por *P. vivax*, identificando os antígenos apresentados pelo HLA-I (BARBOSA, C., *et al.* 2025 - [Res Sq \[Preprint\]](#)). Dentre os antígenos identificados, dois membros da família de ETRAMP se destacaram quanto à frequência de apresentação por diferentes pacientes, independentemente dos alelos de HLA-I. Ademais, esses peptídeos identificados demonstraram capacidade de estimular células de pacientes infectados. Frente a estes dados promissores consideramos a avaliação das ETRAMPs como candidatos vacinais contra malária vivax para indução de uma resposta protetora contra a fase eritrocítica da doença.

Dessa forma, a caracterização de ETRAMPs de *P. vivax* como candidatos vacinais estão em consonância com os atuais esforços da área em identificar e caracterizar novos alvos vacinais contra a malária. Para isso, hipotetizamos que, empregando os antígenos selecionados, seja possível induzir uma resposta protetora e de longa duração contra a malária vivax, mediada pela função efetora de células T e células B.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos gerais

Caracterizar as proteínas PvETRAMP 4 e PvETRAMP 11.2 como candidatos vacinais contra o *Plasmodium vivax*, através da avaliação da resposta celular e humoral induzida pela vacinação em modelo murino, frente ao desafio heterólogo com *P. yoelii*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Expressar e purificar os antígenos recombinantes em modelo de expressão heteróloga em *Escherichia coli*;
- Analisar os epítomos para linfócitos T e linfócitos B por meio de ferramentas de bioinformática;
- Avaliar a resposta imunológica induzida pela imunização com as proteínas recombinantes e adjuvante (CTVad);
- Caracterizar o perfil de ativação celular e da resposta de anticorpos induzidas pela vacinação;
- Estudar os mecanismos de proteção induzidos pela vacinação, frente ao desafio heterólogo com *P. yoelii*;
- Avaliar a antigenicidade das proteínas recombinantes produzidas frente ao soro/plasma de pacientes infectados ou doadores saudáveis.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Produção e purificação de proteínas recombinantes

#### 4.1.1. Transformação em bactérias quimiocompetentes

Plasmídeos pET-24a(+) contendo o gene de resistência à canamicina associado ao gene de interesse, foram encomendados e produzidos pela empresa GenScript. Inicialmente, os plasmídeos foram inseridos em bactérias quimiocompetentes por meio de choque térmico. Brevemente, uma alíquota contendo 100 µL da bactéria competente *Escherichia coli*, cepa NiCo21 (DE3), acondicionada a -80°C, foi adicionada de noventa nanogramas do plasmídeo e incubada por quarenta e cinco minutos em gelo, após sutil agitação. Após este período, a alíquota foi submetida ao choque térmico, ao colocar o tubo com a suspensão em contato com um bloco térmico previamente aquecido, a 42°C, por um minuto e trinta segundos. Em seguida, a amostra foi novamente incubada em gelo, por quinze minutos, e então ressuspensa com 900 µL de meio de cultivo Luria-Bertani (LB) e alocada em um agitador de bancada (*shaker*) com controle de temperatura. As bactérias transformadas foram mantidas nessa etapa de recuperação por uma hora à temperatura de 37°C, com agitação de 180 rotações por minuto (rpm). Ao final do período, foi feita a semeadura da suspensão de bactérias em duas placas de meio sólido (LB ágar)/canamicina (50 µg/mL). As placas foram deixadas em estufa a 37°C por 18 a 20 horas e, após a incubação, armazenadas em geladeira, por no máximo 30 dias até o processamento dos demais testes.

#### 4.1.2. Teste de colônias

Após a transformação das bactérias quimiocompetentes com os plasmídeos de interesse contendo as sequências codificadoras das proteínas PvETRAMP 4 e PvETRAMP 11.2 foi realizado um teste de colônias. Esse consiste em, com base na morfologia esperada para *E. coli*, selecionar aleatoriamente seis colônias bacterianas isoladas e iniciar um cultivo de pequena escala. O pré inóculo é feito com a adição de uma colônia de bactérias a um pequeno volume de meio de cultivo, 5 mL, aditivado com canamicina para a concentração final de 50 µg/mL. Esse é então incubado por aproximadamente 18 horas sob agitação de 180 rpm e à temperatura de 37°C. Decorrido o tempo de crescimento, a densidade óptica, fator

correlacionado com número de bactérias presentes em suspensão, é aferida utilizando o comprimento de onda de 600 nanômetros (OD600) para garantir a qualidade e o crescimento do pré-inóculo a ser utilizado na próxima etapa. Em seguida, o inóculo é preparado através da diluição na proporção de 1:100 (ou 1%) do pré-inóculo em 10 mL de meio de cultivo, adicionado de canamicina para a concentração final de 50 µg/mL. A suspensão é incubada sob agitação de 180 rpm à temperatura de 37°C e seu crescimento é acompanhado em intervalos periódicos por aproximadamente 3 a 4 horas, ou até atingir a densidade óptica considerada ideal para indução, sendo essa entre 0.4 e 0.6, o equivalente ao início da fase de crescimento exponencial bacteriano. Neste ponto, três alíquotas de 1 mL cada são coletadas em tubos apropriados para congelamento, adicionadas com 25% de glicerol e armazenadas em freezer -80°C para futuros experimentos e manutenção do banco de células transformadas. Em seguida, 1 mL é coletado em eppendorf estéril e centrifugado, a 10.000 rpm por 10 minutos, com posterior remoção do sobrenadante e acondicionamento a -20°C, para análise da fração não-induzida em gel SDS-PAGE. O restante do cultivo é induzido utilizando isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) de forma a garantir uma concentração final equivalente a 0,5 mM. Após a adição do reagente, a suspensão bacteriana é novamente direcionada ao agitador e incubada a 37°C por aproximadamente três horas. Ao término do período de indução, a densidade óptica final do cultivo é aferida e uma alíquota de 1 mL é coletada e centrifugada, o sobrenadante descartado e o pellet bacteriano armazenado a -20°C, para análise da fração induzida em gel SDS-PAGE, comparando as alíquotas não-induzida e induzida respectiva a cada colônia.

#### **4.1.3. Teste de solubilidade**

Para o teste de solubilidade, inicialmente é realizado um pré-inóculo de 5 mL, a ser destinado para um cultivo maior, com uma alíquota previamente selecionada, através da avaliação do perfil de expressão em gel SDS-PAGE. A partir dessa suspensão cultivada por aproximadamente 16 a 18 horas, é feito um inóculo de 250 mL, seguindo a diluição previamente estabelecida de 1% do cultivo do pré-inóculo em meio de cultura aditivado de canamicina na concentração final de 50 µg/mL. O crescimento do inóculo é acompanhado por em média três horas, ou até atingir a

densidade óptica de indução (entre 0.4 e 0.6). Nessa etapa, a indução é feita utilizando IPTG para a concentração final em suspensão equivalente a 0,5 mM e ao término de um período de três horas os cultivos são centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet resultante é então direcionado para um processo de lise mecânica das células, por um equipamento apropriado (EmulsiFlex-C3).

Para a lise celular do cultivo bacteriano, primeiramente foi feita uma ressuspensão do pellet coletado em 40 mL de PBS comercial (GIBCO), com acréscimo dos inibidores de protease e um agente redutor. Sendo utilizado benzamidina (concentração final de 5 mM), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), na concentração final de 1 mM, e, por fim, ditioneitol (DTT), utilizado na concentração final de 5mM. Após o preparo adequado da suspensão, garantindo uma homogeneidade sem a presença de grumos ou agregados visíveis, a amostra foi direcionada ao reservatório do equipamento e processada seguindo o procedimento operacional padrão estabelecido para seu uso. Este indica a manutenção da pressão de lise entre 15.000 e 20.000 psi por um período de aproximadamente 10 minutos para cada 25 mL de amostra em fluxo no equipamento.

Ao término, a suspensão processada é direcionada para uma etapa de ultracentrifugação, ou clarificação, onde, centrifugada a 40.000 G por 30 minutos, as frações solúveis e insolúveis da proteína são separadas. As frações são coletadas, rotuladas e armazenadas para análise, sendo que o sobrenadante resultante da centrifugação é identificado como fração solúvel, enquanto o pellet como fração insolúvel.

#### **4.1.4. Purificação de proteínas recombinantes**

Uma vez definidos os melhores parâmetros para a produção e solubilização das proteínas, com 8M de ureia, foi realizado um cultivo maior, de 3 litros de meio de cultivo, para realizar a purificação dos antígenos recombinantes. Para isso, foram utilizados dois tampões, o tampão de ligação - A (50 mM de tampão fosfato pH= 8.0, 30 mM de imidazol e 500 mM de NaCl, com pH ajustado para 8.0) e o tampão de eluição - B ((50 mM de tampão fosfato pH= 8.0, 500 mM de imidazol e 500 mM de NaCl, com pH ajustado para 8.0), acrescidos de ureia na concentração definida.

Para ambas as proteínas, de caráter insolúvel, inicialmente o *pellet* bacteriano foi ressuspendido em PBS comercial (Gibco), adicionado de inibidores de protease nas concentrações supracitadas, para a lise bacteriana. Após o rompimento dessas células, a suspensão foi centrifugada a 40.000 G, por 30 minutos, 4°C e ao final o sobrenadante foi descartado. O *pellet* resultante, constituído principalmente de proteínas insolúveis em corpos de inclusão, foi lavado com 10 mL duas vezes, utilizando um tampão de lavagem (1M de ureia, 100 mM de Tris Base, 0,20 mM de EDTA, 10% de glicerol, 2% de Triton X-100, com pH ajustado para 7.0), com uma ultracentrifugação a cada etapa. Ao término, o *pellet* foi ressuspendido em tampão A contendo ureia e deixado em agitação constante a 4°C por uma noite, visando aumentar o rendimento através de uma melhor solubilização dessas proteínas. Por fim, decorrido esse período, a suspensão foi novamente centrifugada para remover agregados proteicos não visíveis e então o sobrenadante foi direcionado para a purificação. Todas as proteínas purificadas foram dialisadas para um tampão específico, passadas em uma coluna de troca iônica QXL (Cytiva) para remoção de LPS e posteriormente quantificadas pelo método de BCA *protein assay* (ThermoScientific).

Brevemente, para a quantificação, foi feita uma curva padrão em duplicata, considerando os pontos de 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,06 mg/mL e 0,0 mg/mL (branco). A curva foi diluída no tampão final da proteína, utilizando BSA comercial e o reagente para a quantificação. O preparo do reagente de trabalho envolve a diluição de uma parte de reagente B (contendo ácido bicinonínico), com 50 partes de reagente A (um tampão alcalino). Uma vez misturados, dispensa-se 25 µL das amostras e dos pontos da curva em duplicata, com adição subsequente de 200 µL do reagente de trabalho, seguindo para uma etapa de incubação por 30 minutos a 37°C, com posterior leitura a 562 nm. Assim, a partir da redução de  $Cu^{2+}$  para  $Cu^{1+}$  pelas proteínas em meio alcalino, ocorre a quelação do íon pelo ácido bicinonínico, formando uma coloração roxa proporcional à quantidade de proteína presente na amostra.

#### **4.2. Eletroforese de proteínas e Western Blotting**

Para as análises por SDS-PAGE e Western Blotting, foram inicialmente corridos géis SDS-PAGE com 15% de acrilamida-bis, a 150V por uma hora e quinze

minutos em tampão de corrida (estoque 10x contendo 250 mM de Tris Base; 2,5 M de Glicina; 1% de SDS, diluído em água ultrapura para uso a 1x). As alíquotas foram preparadas utilizando um tampão redutor e desnaturante e aquecidas a 95°C por cinco minutos.

O padrão molecular utilizado como marcador (BIO-RAD *Precision Plus Protein Dual Color*/ BIO-RAD *Precision Plus Kaleidoscope*/ *Unstained Standards*) foi aplicado com 8 µL em todas as condições. O processo foi performado utilizando 0,35 Ampere (A) por uma hora e dez minutos de transferência, com tampão adequado (estoque 10x contendo 250 mM de Tris Base; 2,5 M de Glicina, diluído em água ultrapura para uso a 1x).

Decorrido esse período, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com solução de TBS-Tween 0,05% com 5% de BSA por uma hora. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário, diluído (1:5000) em TBS-Tween 0,05% com 2,5% de BSA, com incubação por uma noite a 4°C. Após esse passo de incubação, a membrana foi lavada cinco vezes com TBS-Tween 0,05%, por cinco minutos cada lavagem, e, em seguida, foram adicionados os anticorpos secundários direcionados contra os anticorpos primários, sendo também diluídos (1:10.000) em TBS-Tween 0,05% com 2,5% de BS e incubados, por uma hora. Ao final, foram repetidas as etapas de lavagem com posterior revelação e leitura.

#### **4.3. Animais - Camundongos**

No presente estudo, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J. Essa linhagem possui um longo histórico de uso, datando, inicialmente, de seu isolamento na década de 1940 pelo laboratório Jackson (SONG *et al.*, 2017).

Os camundongos foram fornecidos pelo biotério central (BC) de criação da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e pelo biotério de criação do Instituto René Rachou (IRR-FIOCRUZ Minas), sendo as respectivas colônias originalmente adquiridas pelas partes envolvidas através da compra com o laboratório *Jackson* (The Jackson Laboratory, cepa #000664, informações adicionais disponíveis em: <https://www.jax.org/strain/000664>). Os animais, certificados como livres de patógenos específicos (SPF, do inglês *Specific Pathogen-Free*) pelos biotérios supracitados, foram adquiridos com 4 semanas de idade e acondicionados em

microisoladores, com ração e água *ad libitum*, bem como garantia de espaço para livre movimentação e enriquecimento ambiental periódico. Condições de temperatura, de umidade e ciclos de luminosidade foram rigorosamente controlados sob a vigilância do biotério de experimentação do IRR. A partir da sexta semana de idade demos início à experimentação, com a manipulação estrita destes em cabines de biossegurança de fluxo laminar. Os animais utilizados e os protocolos éticos de experimentação animal estão disponíveis e associados à licença **LW02/21**, com duração prevista, inicialmente, para 22/12/2024, com posterior extensão, por emenda, até a data limite de 22/12/2025.

#### **4.4. Cepas de Plasmodium - *P. yoelii* 17XNL**

A cepa de *P. yoelii* 17XNL:PyGFP, expressando a proteína fluorescente verde (GFP) constitutivamente, utilizada nos experimentos animais foi obtida através da BEI Resources, NIAID/NIH, no número de catálogo MRA-817. A sequência completa do genoma de *P. yoelii* subsp. *yoelii*, cepa 17XNL está disponível no GenBank: ASM308v2. (Ono, Tadakuma & Rodriguez 2007).

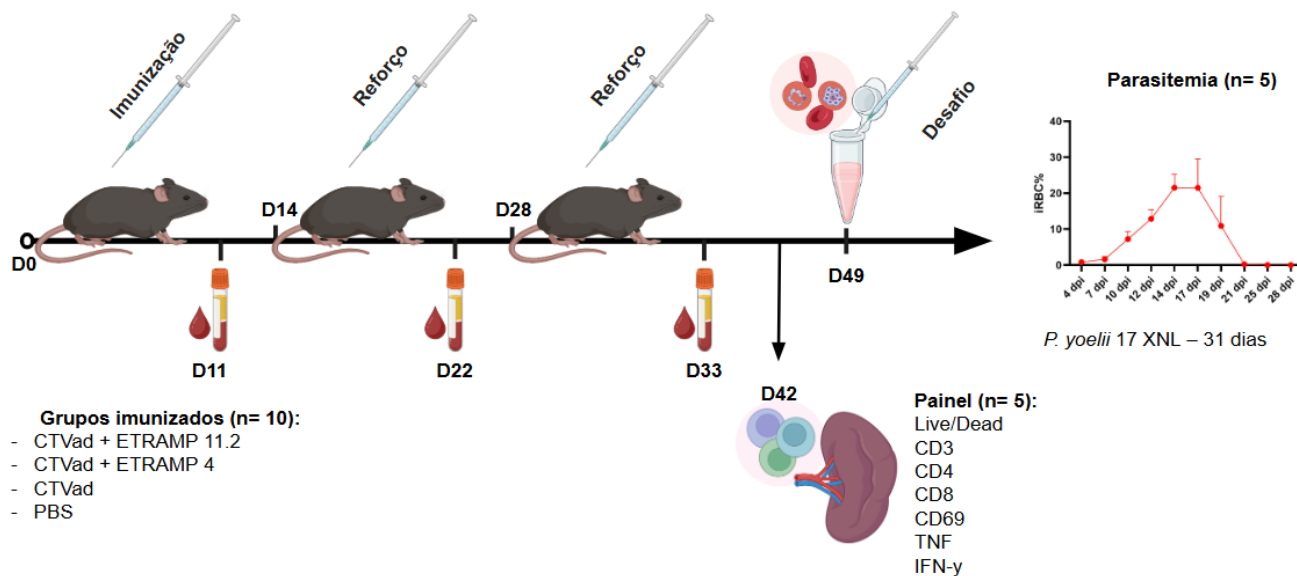
#### **4.5. Imunização**

As imunizações foram feitas utilizando as proteínas recombinantes produzidas após a remoção de LPS utilizando as colunas QXL (Cytiva). Para isso, animais fêmeas de C57BL/6 foram separadas em quatro grupos (n= 10), considerando a injeção de PBS, como controle de tampão salino, CTvad1, como controle de adjuvante, e as formulações vacinais, sejam as compostas por PvETRAMP 4 adicionada de CTvad1, seja PvETRAMP 11.2 adicionada de CTvad1. As formulações vacinais foram feitas seguindo o previamente estabelecido *in house*, considerando a proporção de 50% da formulação como adjuvante e 50% como proteína. Dessa forma, os volumes foram preparados de forma que cada animal recebesse 10 µg de proteína por dose, sendo o volume total aplicado de 100 µL, igualmente divididos entre cada pata traseira do animal via intramuscular.

Os animais foram imunizados seguindo um esquema vacinal de três doses intervaladas igualmente por 14 dias. Durante o período de imunizações foram coletadas amostras de sangue (n= 5) 11 dias após cada dose, totalizando três coletas. Ao término da última imunização, os animais foram novamente divididos intra-grupos, sendo direcionados para a eutanásia com 19 dias (n= 5), para coleta e

processamento do baço e marcação por citometria de fluxo, ou para a infecção (n= 5) com a cepa de *P. yoelii* 17XNL contendo a proteína GFP (PyGFP) após 21 dias.

**Figura 7 - Esquema de imunizações e coleta e processamento de amostra**



Animais foram vacinados com três doses em intervalos de 14 dias cada (D0, D14 e D28). A coleta de sangue dos animais imunizados (D11, D22 e D33) foi realizada com o grupo a ser desafiado com *P. yoelii* 17 XNL. Metade, não manipulada para coletas, dos animais foram eutanasiados e seus baços coletados para análise por citometria de fluxo (D42). Sete dias após (D49), os animais remanescentes foram desafiados e a parasitemia acompanhada por 31 dias. Figura adaptada de modelos disponíveis na plataforma Biorender (Criado com <https://BioRender.com>).

#### 4.6. Infecção e desafio de animais

Vinte e um dias antes do desafio, foi inicialmente descongelada uma alíquota de PyGFP e passada, através de injeção intraperitoneal de 100  $\mu$ L, em dois animais diferentes. A parasitemia foi acompanhada através de esfregaços sanguíneos, com sangue coletado por um pequeno corte na ponta da cauda, e corados com panóptico. A parasitemia foi quantificada por microscopia de luz. Sete dias após a infecção (d.p.i), com parasitemia de aproximadamente 3%, foi feita a primeira passagem em outros dois animais, por meio da coleta de algumas gotas do sangue na ponta da cauda e diluído em PBS para injeção intraperitoneal de 100  $\mu$ L por animal. No decorrer dos próximos 14 dias, duas outras passagens foram feitas antes da data do desafio.

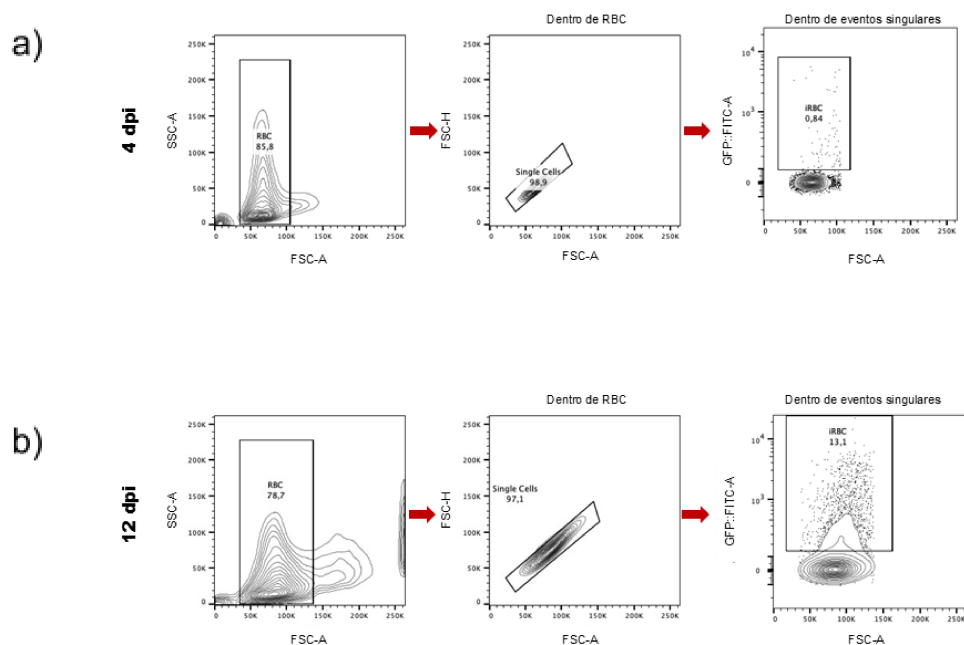
No dia do desafio, os animais da terceira passagem tiveram sua parasitemia aferida conforme supracitado. Para compor a solução de infecção, algumas gotas de sangue foram coletadas e diluídas em PBS, compondo uma suspensão estoque. Esta foi então quantificada quanto ao número de células vermelhas totais presentes em solução através da contagem em câmara de Neubauer. Após a quantificação do número de células, foi feita a correção para obter o número de células infectadas (iRBC) de acordo com a parasitemia do animal. Ao término, a suspensão estoque teve volume corrigido, caso necessário, de forma que atingisse  $10^6$  iRBC/mL, sendo injetados via intraperitoneal 100  $\mu$ L/animal, totalizando  $10^5$  iRBC/animal.

#### **4.7. Acompanhamento da parasitemia**

Após o desafio, a parasitemia dos animais foi acompanhada utilizando a citometria de fluxo, através do equipamento LSR Fortessa. Brevemente, em dias alternados foi feita a coleta de 10  $\mu$ L da ponta da cauda dos animais infectados, sendo que 5  $\mu$ L foram direcionados para a confecção de lâminas para coloração e armazenamento, enquanto os outros 5  $\mu$ L foram destinados a diluição em 195  $\mu$ L de FACS (PBS adicionado de 3% de soro fetal bovino). Imediatamente após as coletas, as alíquotas diluídas foram lidas em fluxo constante no citômetro e normalizadas quanto ao número de eventos adquiridos, sendo coletados dados de 100.000 eventos para avaliação dos parâmetros de FSC, SSC, e FITC/AlexaFluor 488. O acompanhamento das parasitemias foi feito ao longo de 31 dias corridos, dado a data do desafio.

Posteriormente, as análises feitas consideraram a remoção de eventos que indicassem a presença de debris celulares, ou populações fora do interesse, pela avaliação SSC-A x FSC-A, bem como a remoção de eventos não-únicos, pela comparação FSC-A x FSSC-H. Por fim, foi feita a seleção de eventos de interesse, considerados como células vermelhas infectadas (iRBCs), através dos parâmetros FSC-A x FITC-A/AlexaFluor 488 (Figura 8).

**Figura 8 - Estratégia de seleção de populações por citometria de fluxo para acompanhamento de parasitemia**



Animais vacinados com três doses foram desafiados 49 dias após o início do esquema vacinal com  $10^5$  iRBCs, *P. yoelii* 17XNL::PyGFP, e a parasitemia foi acompanhada por 31 dias através de citometria de fluxo. A figura representativa corresponde a dois tempos de análise diferentes de um animal vacinado com o adjuvante CTAd1, sendo exemplificado o perfil de células infectadas (iRBC) obtido após a citometria de fluxo com **a)** 4 dias pós-infecção (dpi) e **b)** está representado o perfil de iRBCs com 12 dpi. Estratégia de seleção de populações feita utilizando o programa FlowJo v10.0 (*BD Bioscience*).

#### 4.8. Imunofenotipagem e citometria de fluxo

Para a fenotipagem de células do sistema imune foram utilizados esplenócitos de animais imunizados. As coletas foram feitas após a injeção letal para a eutanásia dos animais 19 dias após a terceira dose, sendo os baços removidos e processados para o enriquecimento de esplenócitos com lise de hemácias, através do tampão ACK. Decorrido o processamento inicial, as células foram incubadas com os estímulos, sendo as proteínas separadamente associadas aos grupos vacinados e controles de imunização na concentração de  $10 \mu\text{g/mL}$ , ou os controles de estímulo, adicionados a todos os grupos, positivo, com PMA ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) e Ionomicina ( $500 \text{ ng/mL}$ ), ou negativo, meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após

a adição dos estímulos, as células foram deixadas em cultivo por aproximadamente 15 horas, antes da incubação com Brefeldina (*BD Bioscience*) e Monensina (*BD Bioscience*), seguindo as instruções do fabricante, por mais 5 horas, de forma a maximizar a marcação de citocinas intracelulares pelo seu acúmulo.

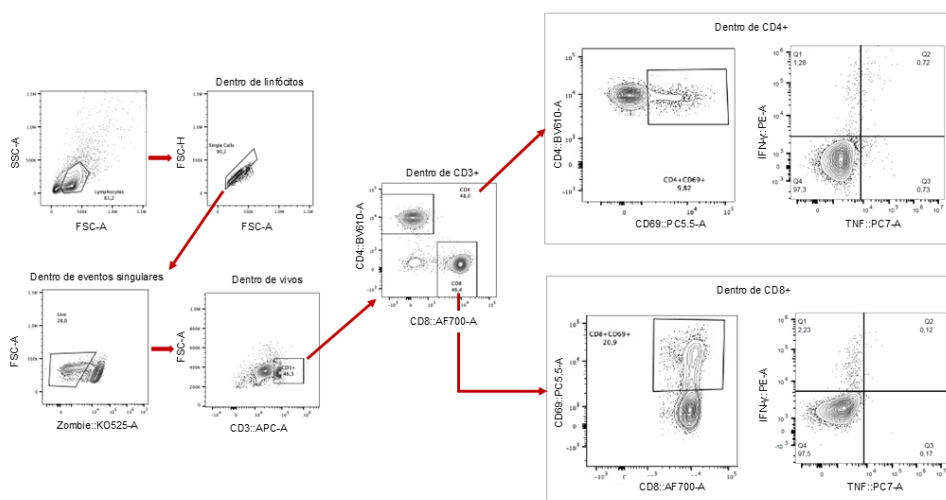
Decorrido essa etapa, as células foram centrifugadas, a 400G por 7 minutos e sob refrigeração, e lavadas com PBS 1x para remoção de componentes do meio de cultivo. Subsequentemente, foram marcadas com ZombieAqua, com incubação de 15 minutos a temperatura ambiente. Decorrido esse período as células foram novamente lavadas, com adição de um bloqueio, usando soro fetal bovino a 10% em PBS por 15 minutos, para minimizar interações inespecíficas e então lavadas para a adição da marcação para extracelular, sendo inclusos CD4, CD8a e CD69, com incubação por 30 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz. Após esta etapa, as células foram novamente lavadas e permeabilizadas utilizando o kit Cytofix/Cytoperm (*BD Bioscience*), seguindo as instruções do fabricante. Em sequência, após nova lavagem, foi adicionada a marcação intracelular contendo CD3, IFN- $\gamma$  e TNF diluídos no tampão de lavagem do kit Cytofix/Cytoperm, com incubação por meia hora a 4°C. Por fim, as células foram novamente lavadas e ressuspensas em FACS (PBS adicionado de 3% de SFB) para aquisição no citômetro de fluxo. Os parâmetros fluorescentes avaliados, bem como detalhes sobre os anticorpos utilizados, estão presentes na Tabela 1 e a estratégia de seleção de populações celulares presentes na Figura 9.

**Tabela 1 - Anticorpos para imunofenotipagem por citometria de fluxo**

Anticorpos	Fluorocromo	Clone	Catálogo	Fabricante	Diluição
CD3	APC	145-2C11	553066	BD Bioscience	1:100 (intra)
CD4	BV570	RM4-5	100541	Biologend	1:200
CD8	AlexaFLuor700	53-6.7	557959	BD Bioscience	1:200
CD69	PerCp Cy5.5	H1.2F3	551113	BD Bioscience	1:100
TNF	PE CY7	MP6-XT22	557644	BD Bioscience	1:200
IFN- $\gamma$	PE	XMG1-2	554412	BD Bioscience	1:200
ZombieAqua	AmCyan	N.A.	423102	Biologend	1:1000

Anticorpos utilizados no painel de imunofenotipagem por citometria de fluxo e seus respectivos fluorocromos. Detalhe ao ZombieAqua, um corante para viabilidade celular reativo com aminas.

**Figura 9 - Estratégia de seleção de populações por citometria de fluxo para imunofenotipagem**



Animais vacinados com três doses foram eutanasiados 42 dias após o início do esquema vacinal. Após esplenectomia, as células isoladas foram cultivadas por 18h na presença dos antígenos testados e a ativação celular, bem como a produção de citocinas, foi avaliada por citometria de fluxo. A figura representa um animal vacinado com o antígeno PvETRAMP 4 e estimulado com o antígeno PvETRAMP 4. Seleção de populações de esplenócitos feita utilizando o programa FlowJo v10.0 (*BD Bioscience*).

#### 4.9. Ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto

Na execução dos ensaios imunoenzimáticos indiretos para a detecção de anticorpos em soro/plasma de animais imunizados/infectados direcionados contra os antígenos recombinantes, foi utilizado o protocolo descrito por Hornbeck (HORNBECK, P. V. 2015), com algumas modificações feitas por nosso laboratório e adaptações para a detecção de subclasses de IgG.

Inicialmente, os antígenos recombinantes quantificados foram diluídos em tampão carbonato (contendo  $Na_2CO_3$  a 0,16%;  $NaHCO_3$  a 0,24%; pH = 9,4) e dispensados (100  $\mu$ L/poço) em placas de 96 poços para sensibilização à 4°C por uma noite, utilizando 100  $\mu$ g de proteína por poço. Após o período de sensibilização, as placas foram invertidas para dispensar a solução usada e batidas suavemente contra um estofado absorvente. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L da solução

de bloqueio (contendo PBS-Tween 20 a 0,05%; e albumina bovina – BSA a 5%) por duas horas à temperatura ambiente, repetindo o processo de inversão e remoção do excesso de líquido ao término dessa etapa. Posteriormente, foi adicionado o soro/plasma diluído 1% em PBS-Tween 0,05%, com BSA a 2%, para incubação por uma hora à 37°C.

Decorrido essa etapa, foram feitos cinco ciclos de lavagem utilizando uma solução de PBS-Tween<sup>[OBJ:OBJ]</sup>, antes da adição dos anticorpos secundários. Estes foram diluídos conforme previamente feito para o soro/plasma, seguindo a proporção de 1:5000, seja para a detecção de anticorpos IgG totais, para subclasse IgG1, ou para a subclasse de IgG2c. Após o preparo do volume adequado para cada placa, foram dispensados 100 µL/poço da suspensão e as placas foram incubadas por uma hora à 37°C. Decorrido essa etapa, as placas foram lavadas cinco vezes, seguindo o processo feito anteriormente, e então reveladas.

Para a revelação foram adicionados 100 µL do substrato TMB, com desenvolvimento da reação colorimétrica por aproximadamente 20 minutos em temperatura ambiente e em local escuro. Ao término, foram adicionados 100 µL de  $H_2SO_4$ <sup>[OBJ]</sup> 0,5M e a leitura efetuada a 450 nm.

#### **4.10. Análises de bioinformática**

Para as análises de bioinformática foram selecionadas as sequências integrais, em arquivo FASTA, das proteínas de interesse (Tabela 2) dos bancos de dados *PlasmoDB* de acordo com levantamento de MacKellar (2011). A plataforma BLAST foi utilizada para buscar sequências que apresentassem homologia em *P. falciparum*. Todas as sequências recuperadas foram alinhadas para comparar homologia utilizando o *software Ugene* v52.1 (disponível em [ugene.net](http://ugene.net)), através da ferramenta MUSCLE. O *software Ugene* v52.1 também foi utilizado para gerar as imagens referentes aos alinhamentos citados, bem como as imagens referentes à distribuição de epitopos ao longo da sequência dos antígenos alvo.

**Tabela 2 - Lista de proteínas de *P. yoelii* utilizadas para o alinhamento (Fonte: MacKellar *et al.* 2011)**

Espécie	Nome	NCBI	PlasmoDB	OrthoMCL	Uniprot
<i>P. yoelii</i>	7506	XM_723325	PY07506	OG4_50898	Q7R7S2
<i>P. yoelii</i>	6488	XM_722055	PY06488	OG4_85057	Q7RAL2
<i>P. yoelii</i>	5433	XM_720798	PY05433	OG4_85057	Q7RDI9
<i>P. yoelii</i>	4799	XM_720054	PY04799	OG4_60511	Q7RFA8
<i>P. yoelii</i>	3869	XM_718992	PY03869	OG4_64898	Q7RHW4
<i>P. yoelii</i>	3652	XM_718746	PY03652	-	Q7RIH1
<i>P. yoelii</i>	3365	XM_726274	PY03365	OG4_85057	Q7RJ98
<i>P. yoelii</i>	3011, UIS3	XM_725879	PY03011	OG4_48314	Q7RK90
<i>P. yoelii</i>	2667	XM_725486	PY02667	OG4_60733	Q7RL79
<i>P. yoelii</i>	205	XM_724753	PY00205	OG4_54905	Q7RSZ6
<i>P. yoelii</i>	0204, UIS4	XM_724752	PY00204	OG4_84497	Q7RSZ7

Para as predições de epitopos para MHC de classe I e II de murinos e HLA-I e II foi utilizada a plataforma *Immune Epitope Database* (IEDB - NetMHCpan 4.1), considerando o tamanho de ligação como 9 e 15 aminoácidos, respectivamente. Para a predição de epitopos lineares de células B foi utilizada a plataforma BepiPred v3.0.

#### 4.11. Análises estatísticas

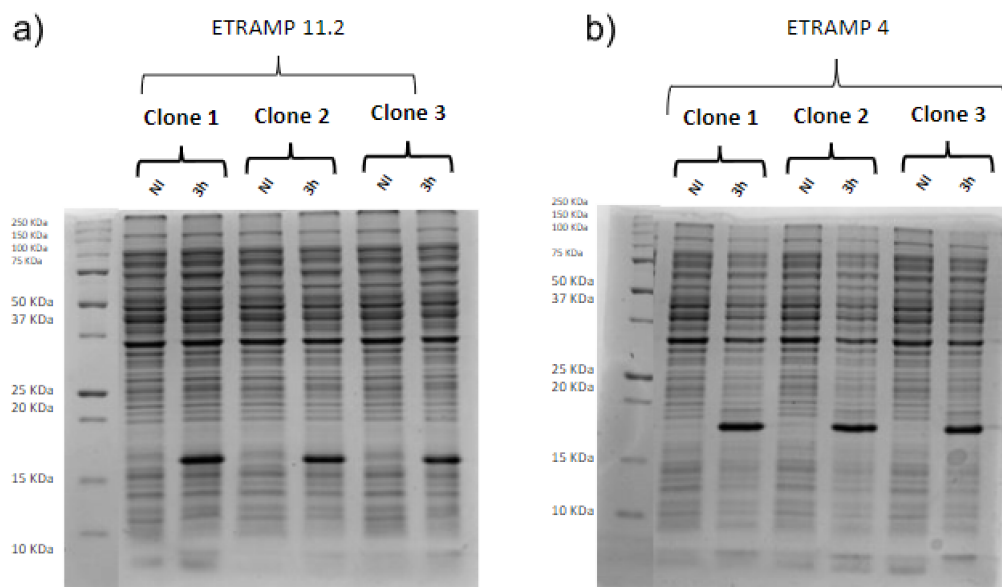
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software, Califórnia, USA). Todos os grupos analisados foram inicialmente testados quando a normalidade da curva Gaussiana, utilizando o teste de distribuição normal. Para as avaliações dos resultados de imunofenotipagem foram feitas inicialmente análises de variância utilizando o teste One-way ANOVA, com posterior comparação entre os grupos através do teste de Tukey. Para analisar os testes relacionados aos níveis de anticorpos e a curva de parasitemia, foi utilizado o teste Two-way ANOVA, com comparação múltipla entre os grupos feita por meio do teste de Tukey. Em relação às análises da curva de parasitemia, foram feitas também a avaliação área sob a curva (AUC), com posterior comparação individual entre dois grupos utilizando o Teste-t de Student paramétrico, não pareado.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Purificação dos antígenos recombinantes

Inicialmente, para a expressão dos antígenos recombinantes foi escolhida a cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3). As bactérias foram transformadas, seguindo o previamente descrito, e semeadas em meio de cultivo sólido (LB agar) seletivo, com canamicina a 50 µg/mL. Três colônias isoladas, ou clones, foram avaliadas quanto ao perfil de expressão induzida em um pequeno volume de cultivo em meio LB. A partir da avaliação por SDS-PAGE dos lisados totais antes, e após a indução da expressão proteica, foi possível identificar as bandas no extrato induzido referentes às proteínas PvETRAMP 4, entre os marcadores moleculares de 15 e 25 KDa (Figura 10a), e PvETRAMP 11.2, próxima à altura do marcador de 15 KDa (Figura 10b). Ao longo do crescimento bacteriano, no entanto, foi observado uma redução na OD600, indicando uma baixa na densidade celular, em até 50% comparado com o tempo não-induzido, provavelmente decorrente da toxicidade da proteína para a célula hospedeira.

**Figura 10 - Teste de colônias para PvETRAMP 4 e para PvETRAMP 11.2**

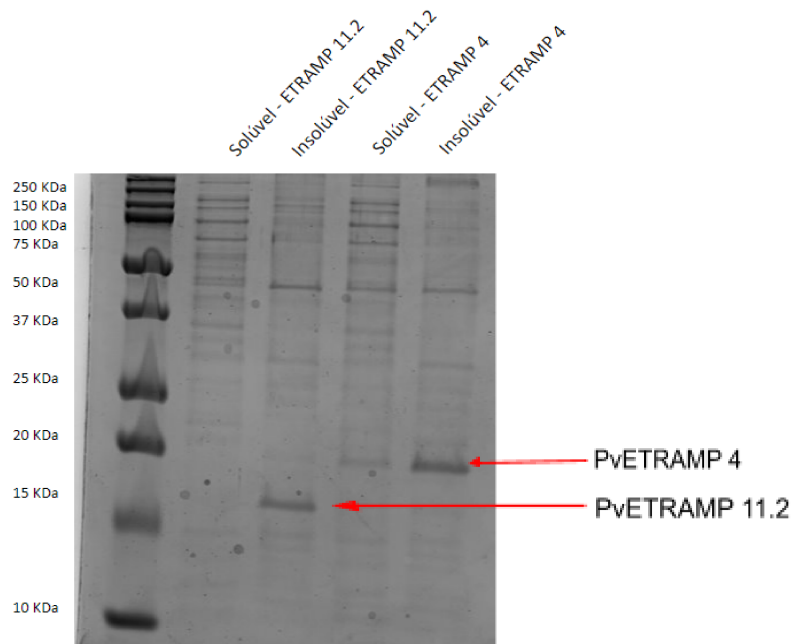


Géis SDS-PAGE feitos com o extrato total das bactérias cultivadas no teste de colônia. Após a transformação e cultivo de clones com crescimento em meio seletivo, foi feita a indução por 3 horas dos cultivos para posterior seleção e análise do clone com melhor expressão., aplicando amostras pareadas por clone nos tempos antes da indução com IPTG (NI) e 3 horas após a indução (3h).O peso molecular do antígeno PvETRAMP 11.2 é de 12,75 KDa, com corrida aparente próxima de 15

KDa; para a PvETRAMP 4 o peso molecular é de 16,63 KDa, com corrida aparente próxima de 20 KDa.

Subsequentemente, foram realizados testes de solubilidade para ambas as proteínas. Para isso, cultivos de 250 mL foram utilizados para a lise. Decorrido este processo, os sobrenadantes foram coletados e os pellets ressuspendidos em PBS até completa homogeneidade para então, serem corridos géis SDS-PAGE. Os resultados demonstram que ambas as proteínas possuem frações insolúveis, com a PvETRAMP 4 apresentando, minoritariamente, uma forma solúvel, enquanto a PvETRAMP 11.2 é majoritariamente insolúvel (Figura 11). Dessa forma, optamos por purificar ambas as proteínas da fração insolúvel, considerando o maior rendimento e a maior pureza, por se tratar de corpos de inclusão, como critérios de escolha.

**Figura 11 - Perfil de solubilidade da PvETRAMP 11.2 e da PvETRAMP 4**



Gel contendo as frações solúvel e insolúvel de cada proteína. Após cultivo e indução (3 horas) foi feita a lise celular e o extrato proteico total foi clarificado por ultracentrifugação para que as frações separadas fossem analisadas por SDS-PAGE 15% Bis-Acrilamida. Em ordem, as canaletas representam as frações solúvel e insolúvel da PvETRAMP 11.2, seguidas pelas frações solúvel e insolúvel da PvETRAMP 4. O peso molecular do antígeno PvETRAMP 11.2 é de 12,75 KDa, com corrida aparente próxima de 15 KDa; para a PvETRAMP 4 o peso molecular é de 16,63 KDa, com corrida aparente próxima de 20 KDa.

Para a purificação, foram feitos volumes maiores de cultivo, 3 litros, para maximizar os rendimentos. Após as etapas de clarificação do lisado e lavagem de

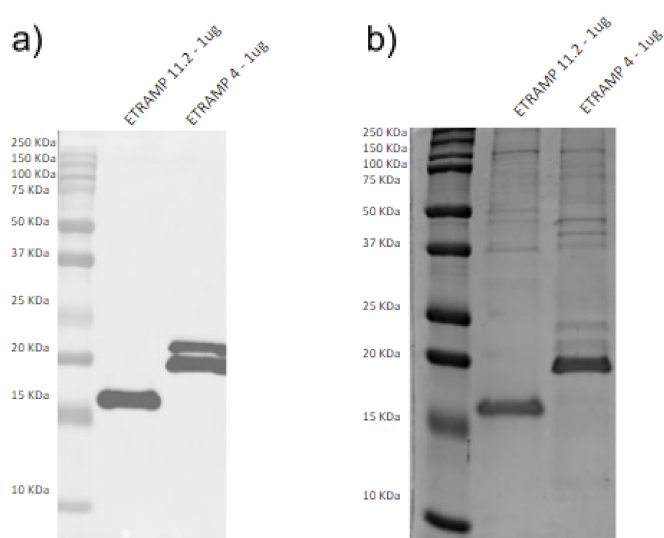
corpos de inclusão, as proteínas foram solubilizadas, sob agitação por uma noite a 4°C, no tampão de ligação e purificadas por afinidade, por meio de uma coluna HisTrap. Durante a eluição o cromatograma foi avaliado e as frações reunidas e dialisadas para um tampão compatível com a troca aniônica, para remoção de LPS por meio de uma coluna QXL.

Para isso, foram considerados os pontos isoelétricos de cada proteína considerando a cauda de histidina (PI PvETRAMP 4= 10,09; PI PvETRAMP 11.2= 10,3) de forma que o pH do tampão de ligação e do tampão de eluição atingisse, no mínimo, um ponto abaixo do PI, garantindo carga positiva para os antígenos. Dessa forma, foram coletadas as frações não ligadas à coluna, enquanto o LPS (PI aproximado de 2) permaneceu retido. Ao término, o volume coletado foi novamente dialisado (tampão contendo 10% de glicerol, 500 mM de NaCl, 20 mM de tampão fosfato de sódio pH= 7,8, 1M de ureia) e quantificadas utilizando *Pierce BCA Protein Assay Kit* (ThermoFischer Scientific). Posteriormente, as amostras foram analisadas por eletroforese e Western Blotting para confirmar a identidade das proteínas (Figura 12),

Durante as diálises, ambas as proteínas precipitaram em algum nível, levando a uma perda considerável. A quantificação apontou um rendimento final para a PvETRAMP 4 o rendimento final foi de 740 µg/L, com uma concentração de 320 mg/mL. Enquanto para a PvETRAMP 11.2 o rendimento foi de 320 µg/L, com uma concentração de 120 mg/mL.

O perfil eletroforético observado (Figura 12b) indica a presença minoritária de contaminantes de *Escherichia coli*, confirmados pela não reatividade em Western Blot específico para a cauda de histidina (His Tag), presente apenas nas proteínas recombinantes (figura 12a). Além disso, a mobilidade eletroforética dos antígenos alvos apresentou um perfil diferente do predito com base em seu peso molecular, sendo essa observação provavelmente decorrente da alta concentração de cargas positivas nas proteínas (SPIELMANN *et al.*, 2003).

**Figura 12 - Western Blot anti-His e gel espelho**



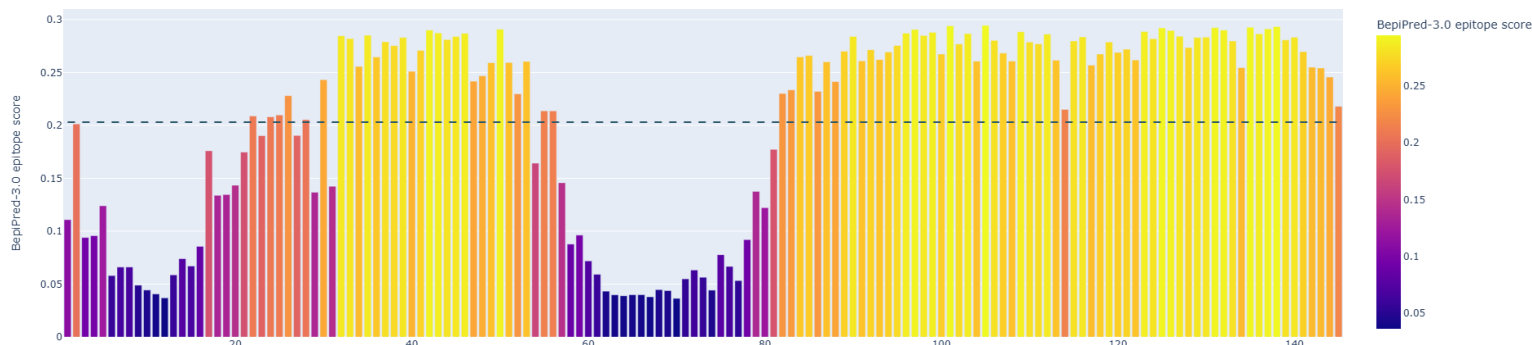
As proteínas purificadas foram corridas a 1 µg/canaleta em géis SDS-PAGE 15% Bis-Acrilamida para avaliação do perfil de pureza e análise por *Western Blot* anti-Histidina. Em **a)** um *Western Blot* para a detecção da cauda de histidina (His Tag), utilizando o anticorpo secundário Anti-His diluído 1:5000. Em **b)** gel SDS-PAGE, 15% Acrilamida-BIS, corado com Comassie Blue, contendo 1 µg das alíquotas purificadas, tanto para o antígeno PvETRAMP 11.2, quanto para o antígeno PvETRAMP 4. O peso molecular do antígeno PvETRAMP 11.2 é de 12,75 KDa, com corrida aparente próxima de 15 KDa; para a PvETRAMP 4 o peso molecular é de 16,63 KDa, com corrida aparente próxima de 20 KDa.

## 5.2. Predição de epítopos lineares de células B

Para a predição de epítopos lineares de células B, foi utilizada a plataforma BepiPred v3.0 (disponível em: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-3.0/>), sendo selecionado o ponto de corte de 0,20301 para a PvETRAMP 4 e 0,20551 para a PvETRAMP 11.2, considerando a exclusão de epítopos com predição inespecífica em regiões transmembranas e não acessíveis. Epítopos com pontuação superior a esse valor são significativamente mais prováveis de serem reais epítopos.

Interessantemente, para ambas as proteínas a região inicial da porção N-terminal, marcadas por uma densidade maior de epítopos preditos para células T murinas, apresentaram baixa densidade de possíveis epítopos lineares de células B, respectivamente entre os intervalos de 1-35 aminoácidos para a PvETRAMP 4 (Figura 13) é de 1-30 para a PvETRAMP 11.2 (Figura 14).

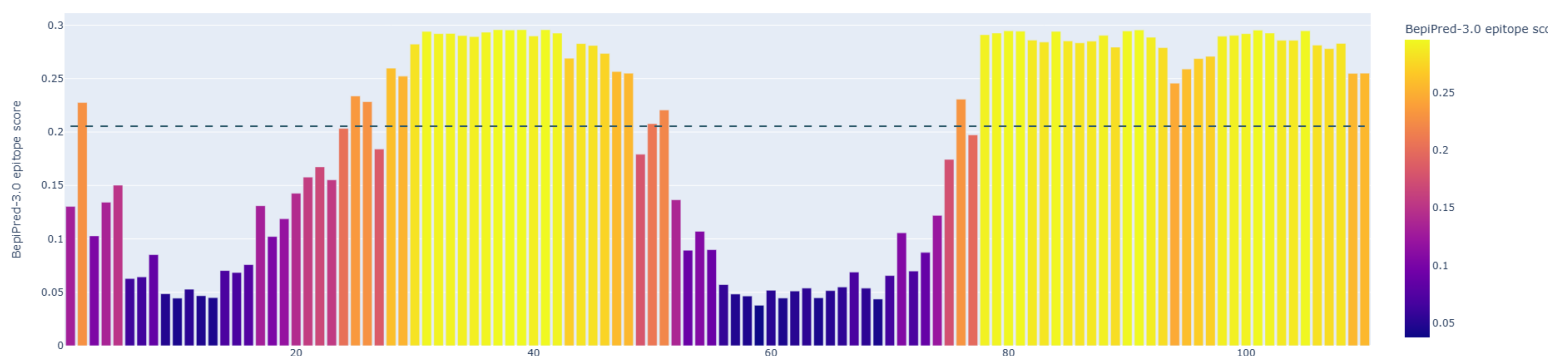
**Figura 13 - Distribuição de epítomos lineares para PvETRAMP 4**



Distribuição de possíveis epítomos lineares de células B. A pontuação de cada resíduo de aminoácido está representada em escala de cores ao longo dos 145 aminoácidos da proteína, sendo aqueles acima da linha tracejada (0,20301) considerados possivelmente verdadeiros epítomos lineares preditos para a proteína PvETRAMP 4. A predição foi feita utilizando a plataforma digital BepiPred v3.0 (disponível em: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-3.0/>).

Por outro lado, em ambos os casos, a partir da posição Y80 na PvETRAMP 4 (Figura 13) e Q80 na PvETRAMP 11.2 (Figura 14), é possível observar uma alta densidade de possíveis epítomos lineares de células B, que coincidem com baixa densidade de epítomos preditos para células T murinas (Figura 18 e Figura 19).

**Figura 14 - Distribuição de epítomos lineares para PvETRAMP 11.2**



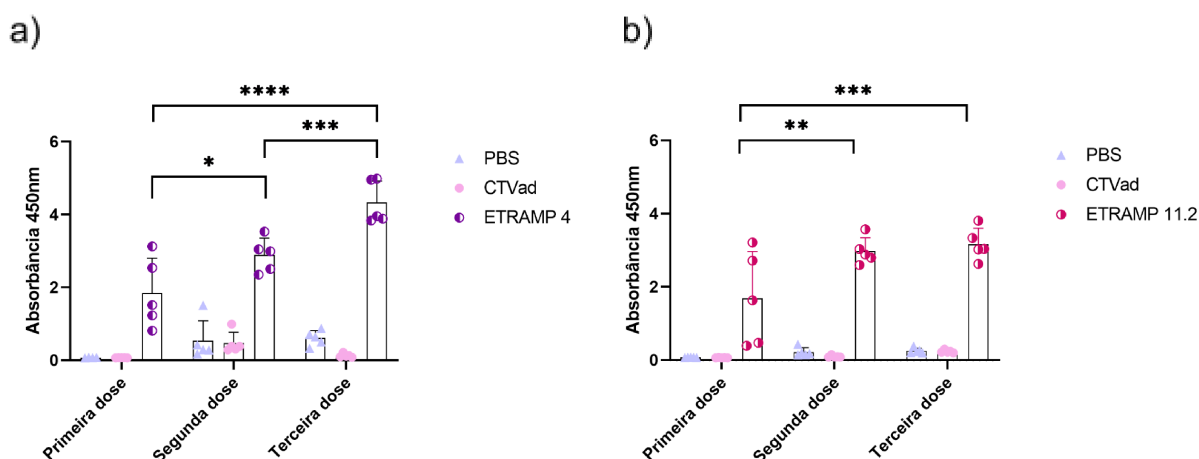
Distribuição de possíveis epítomos lineares de células B. A pontuação de cada resíduo de aminoácido está representada em escala de cores ao longo dos 110 aminoácidos da proteína, sendo aqueles acima da linha tracejada (0,20551) considerados possivelmente verdadeiros epítomos lineares preditos para a proteína PvETRAMP 11.2. A predição foi feita utilizando a plataforma digital BepiPred v3.0 (disponível em: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-3.0/>).

### 5.3. Resposta humoral induzida

#### 5.3.1. Avaliação de IgG Total

Onze dias após cada imunização foram realizadas coletas de sangue para avaliação dos níveis de anticorpos presentes no soro/plasma dos animais. Os resultados demonstram que, já na primeira dose, são detectáveis níveis significativos de anticorpos específicos contra as PvETRAMPs do tipo IgG, quando comparados com os controles, seja PBS ou CTVad. Para a PvETRAMP 4 (Figura 15a), é possível observar um aumento progressivo nos níveis totais de anticorpos IgG da primeira para a segunda dose e, posteriormente, da segunda para a terceira dose.

**Figura 15 - Anticorpos totais do tipo IgG induzidos pela vacinação**



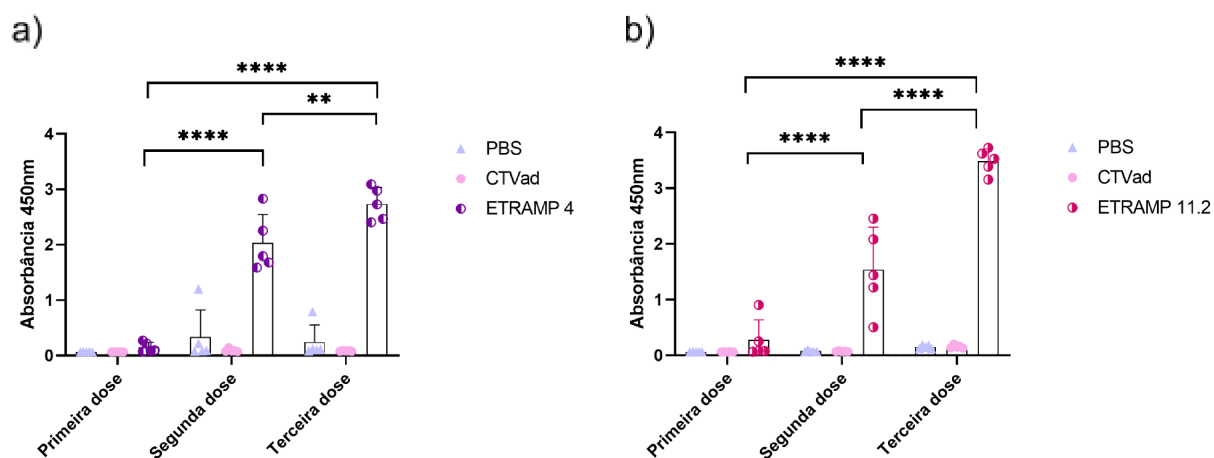
Amostras de plasma (n= 5) foram coletadas onze dias após cada dose e armazenadas a -20°C até o processamento simultâneo de todos os tempos. O perfil de anticorpos da subclasse IgG específicos para os antígenos está representado em **a)** para a PvETRAMP 4, em **b)** para a PvETRAMP 11.2. As análises estatísticas foram feitas utilizando Two-Way ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. \*valor-p  $\leq 0,05$ ; \*\*valor-p  $\leq 0,01$ ; \*\*\*valor-p  $\leq 0,001$ ; \*\*\*\* valor-p  $\leq 0,0001$ .

Para a PvETRAMP 11.2 esse aumento sucessivo após as imunizações só é perceptível entre a primeira e a segunda dose, atingindo a saturação da resposta a partir desse ponto (Figura 15b).

### 5.3.2. Avaliação das subclasses IgG1 e IgG2c

Em relação aos níveis de IgG1, foi possível observar um aumento significativo após a segunda dose, com subsequente aumento onze dias decorrido o segundo reforço para ambas as proteínas (Figura 16a e 16b). Classicamente, a resposta de anticorpos pode ser correlacionada diretamente com o perfil de células T CD4<sup>+</sup> auxiliares estimuladas pela vacinação. Estudos descrevem que a atuação da citocina IL-4, bem como da citocina IL-10, desempenham papel na troca de isotipos levando indução de anticorpos IgG1 em camundongos (PAN-HAMMARSTRÖM, Q., ZHAO, Y., & HAMMARSTRÖM, L., 2007 & FIRACATIVE, C. *et al.* 2018). Assim, a presença de níveis significativos de anticorpos IgG1 indicam a atuação de células T CD4<sup>+</sup> auxiliares com padrão de ativação do tipo 2, uma resposta Th2.

**Figura 16 - Anticorpos do tipo IgG1 induzidos pela vacinação**

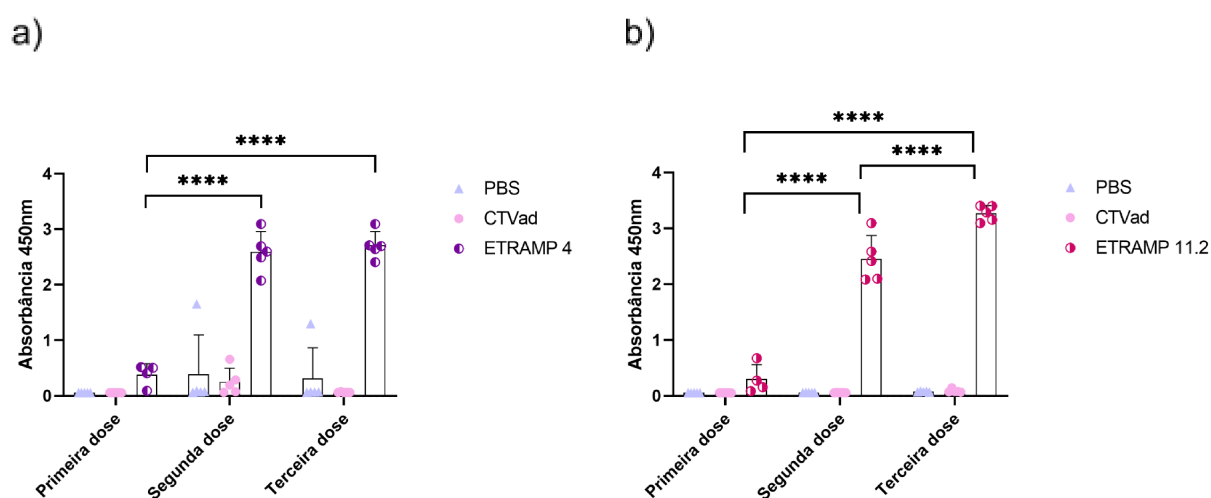


Amostras de plasma (n= 5) foram coletadas onze dias após cada dose e armazenadas a -20°C até o processamento simultâneo de todos os tempos. O perfil de anticorpos da subclasse IgG1 específicos para os antígenos está representado em **a)** para a PvETRAMP 4, em **b)** para a PvETRAMP 11.2. As análises estatísticas foram feitas utilizando Two-Way ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. \*valor-p  $\leq 0.05$ ; \*\*valor-p  $\leq 0,01$ ; \*\*\*valor-p  $\leq 0,001$ ; \*\*\*\* valor-p  $\leq 0,0001$ .

Em relação aos níveis de IgG2c expressos por animais imunizados, foi observado um fenômeno similar ao descrito anteriormente para IgG1. Após a segunda dose, foi notado um aumento expressivo na presença de anticorpos da subclasse IgG2c (Figura 17a e 17b), com subsequente aumento após a terceira

dose sendo descrito para a PvETRAMP 11.2, enquanto para a PvETRAMP 4 os níveis permaneceram constantes. Considerando esse padrão de resposta de anticorpos, é possível inferir que há uma resposta marcada por células T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1, com produção característica de IFN- $\gamma$ , subjacente (NAZERI, S. *et al.* 2020).

**Figura 17 - Anticorpos do tipo IgG2c induzidos pela vacinação**



Amostras de plasma foram coletadas onze dias após cada dose e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processamento simultâneo de todos os tempos. O perfil de anticorpos da subclasse IgG2c específicos para os antígenos está representado em **a)** para a PvETRAMP 4, em **b)** para a PvETRAMP 11.2. As análises estatísticas foram feitas utilizando Two-Way ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. \*valor-p  $\leq 0,05$ ; \*\*valor-p  $\leq 0,01$ ; \*\*\*valor-p  $\leq 0,001$ ; \*\*\*\* valor-p  $\leq 0,0001$ .

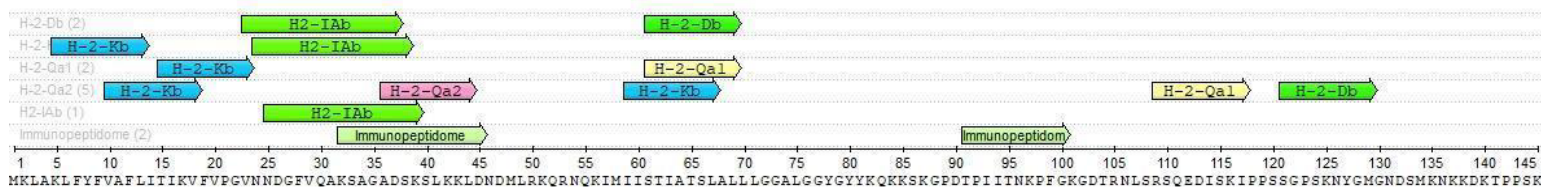
#### 5.4. Predição de epítopos para MHC-I/II para camundongos

Para a predição de epítopos de MHC de classe I e classe II foi considerado o modelo de experimentação animal C57BL/6 para seleção dos alelos na plataforma IEDB. Foram considerados os peptídeos ranqueados entre os 0,7% de maior afinidade considerando o *score* combinado da predição, indicando maior potencial de serem epítopos de MHC reais. Idealmente, possíveis ligantes de alta afinidade encontram-se ranqueados entre 0,1-2% (FEI, C., XU, S. & WANG, X., 2022), com pontuações de até 10% podendo ser consideradas como possíveis ligantes intermediários.

No caso da PvETRAMP 4 (Figura 18) foi observado uma concentração de possíveis epítopos na região N-terminal da proteína, com destaque para a

sobreposição de epítomos com ligação ao MHC-II, H-2-IAb, e MHC-I não convencional, H-2-Qa2, com um dos peptídeos (32-45) originalmente encontrado através da análise imunopeptidômica de peptídeos associados aos MHC-I de reticulócitos infectados de *P. vivax* (evidenciado na Figura 18 por “*Immunopeptidome*”). Além disso, para o alelo H-2-Kb, MHC-I, foram encontrados três peptídeos sobreponíveis concentrados, novamente, na região N-terminal. Assim, apontando essa região como possivelmente mais imunogênica, comparado com o restante da proteína (45-145) que apresentou baixa concentração de epítomos para células T.

**Figura 18 - Epítomos preditos para MHC-I e MHC-II para PvETRAMP 4**

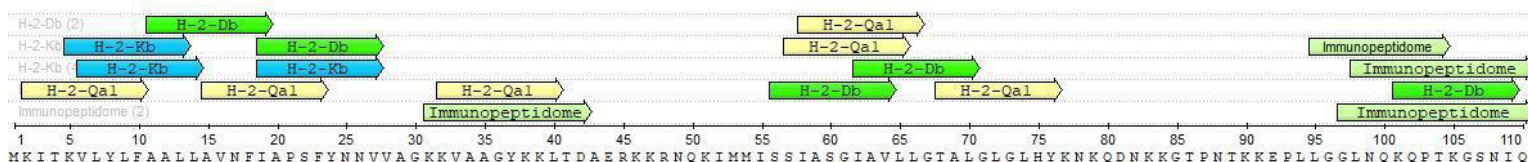


Distribuição dos epítomos mais bem ranqueados para MHC de classe I e classe II de camundongos para a proteína PvETRAMP 4. Os peptídeos aceitos foram nomeados de acordo com seu respectivo MHC de afinidade foi predita. Além disso, peptídeos descritos por Barbosa e colaboradores (BARBOSA, C., *et al.* 2025 - *Res Sq [Preprint]*) estão representados na sequência, nomeados como “*Immunopeptidome*”.

Para a PvETRAMP 11.2, observou-se tendência similar aa PvETRAMP 4, com concentração de epítomos na região N-terminal da proteína (Figura 19), com destaque para a sobreposição de epítomos de MHC-I, H-2-Kb, na região de 4-27 aminoácidos iniciais. Interessantemente, esta mesma região também apresenta possíveis epítomos do MHC-I não-clássico H-2-Qa1. Além disso, um peptídeo (32-40) predito como ligante ao H-2-Qa1 foi coincidente ao peptídeo (31-42) encontrado na imunopeptidômica. Ademais, entre o intervalo de 56-76 aminoácidos, outra região apresenta concentração de epítomos de MHC-I, H-2-Db, e classe I não-convencional, H-2-Qa1, sendo essa região possivelmente mais imunogênica em camundongos C57BL/6 quando comparada com a mesma porção na PvETRAMP 4 (Figura 18). Por fim, considerando o ponto de corte estabelecido, com afinidade desejável ranqueada como  $<0,7$ , nenhum epítomo para MHC-II, que atingisse esse

critério, foi encontrado para a PvETRAMP 11.2, sendo o de maior afinidade o peptídeo MISSIASGI (50-64) predito como ligante de H2-IAb, com pontuação de 7,3.

**Figura 19 - Epítomos preditos para MHC-I e MHC-II para PvETRAMP 11.2**



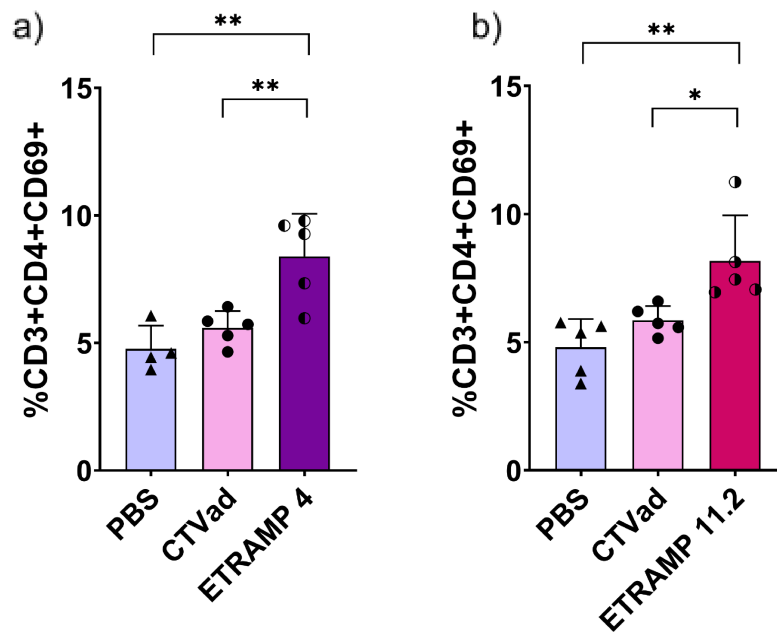
Distribuição dos epítomos mais bem ranqueados para MHC de classe I e classe II de camundongos para a proteína PvETRAMP 11.2. Os peptídeos aceitos foram nomeados de acordo com seu respectivo MHC de afinidade foi predita. Além disso, peptídeos descritos por Barbosa e colaboradores (BARBOSA, C., *et al.* 2025 - *Res Sq [Preprint]*) estão representados na sequência, nomeados como "Immunopeptidome".

### 5.5. Perfil de ativação celular

Para a avaliação do perfil de ativação celular por citometria de fluxo, foram, inicialmente, separadas populações de células de possível origem linfóide com base nos parâmetros físicos de granularidade (SSC-A) e de tamanho celular (FSC-A). Em sequência, foram selecionados eventos únicos, através da exclusão de eventos cujos parâmetros FSC-A e FSC-H não apresentassem uma tendência linear. Então, a partir desse grupo celular, denominado *single cells*, seguimos para a seleção através dos marcadores fluorescentes para seleção simultânea de eventos correspondentes a células vivas (*Zombie*-) e células de origem linfóide (CD3<sup>+</sup>), com posterior separação entre células T CD4<sup>+</sup> e ativadas, CD69<sup>+</sup>, e células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>.

Assim, os resultados mostram que ambas as proteínas, tanto PvETRAMP 4, quanto PvETRAMP 11.2, são capazes de induzir a ativação de células T CD4<sup>+</sup>, com aumento significativo na frequência dessas populações quando comparadas com os grupos imunizados apenas com adjuvante ou com PBS (Figura 20a e 20b).

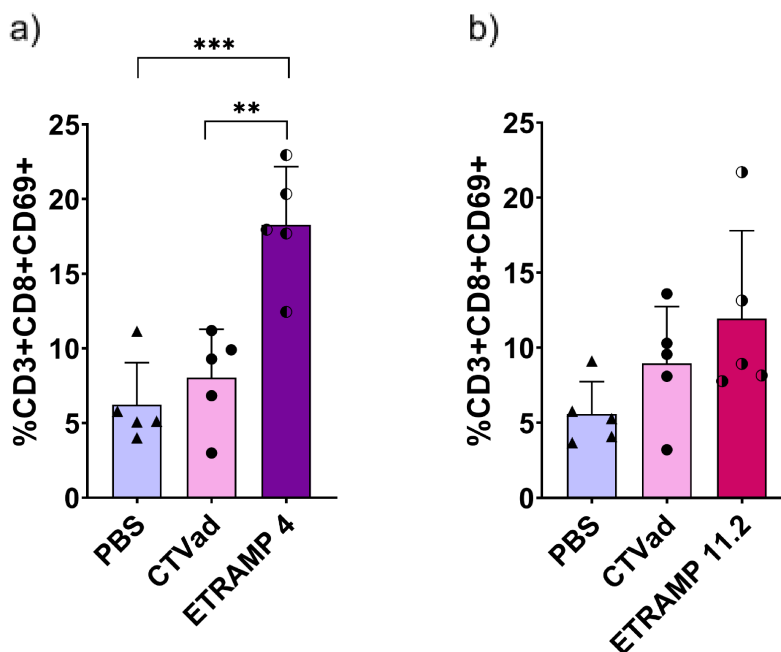
**Figura 20 - Perfil de ativação de células T CD4<sup>+</sup>**



Animais vacinados com três doses (n= 5) foram eutanasiados 42 dias após o início do protocolo vacinal para avaliação do perfil ativação de células T CD4<sup>+</sup> por imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os esplenócitos foram cultivados e estimulados por 18h na presença dos antígenos testados. O perfil de grupos estimulados com os antígenos está representado **a)** para PvETRAMP 4, em **b)** para a PvETRAMP 11.2. As análises estatísticas foram feitas utilizando One-Way ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. \*valor-p ≤0.05; \*\*valor-p ≤0,01; \*\*\*valor-p ≤0,001; \*\*\*\* valor-p ≤0,0001.

Entretanto, quanto a capacidade de ativação de células T CD8<sup>+</sup>, apenas a proteína PvETRAMP 4 demonstrou efetividade em induzir positivamente o fenótipo avaliado (Figura 21a). Para a proteína PvETRAMP 11.2 é possível notar discreto aumento global no grupo, decorrente da presença de dois animais responsivos, mas sem significância estatística dado a alta dispersão entre as replicatas biológicas (Figura 21b).

**Figura 21 - Perfil de ativação de células T CD8<sup>+</sup>**



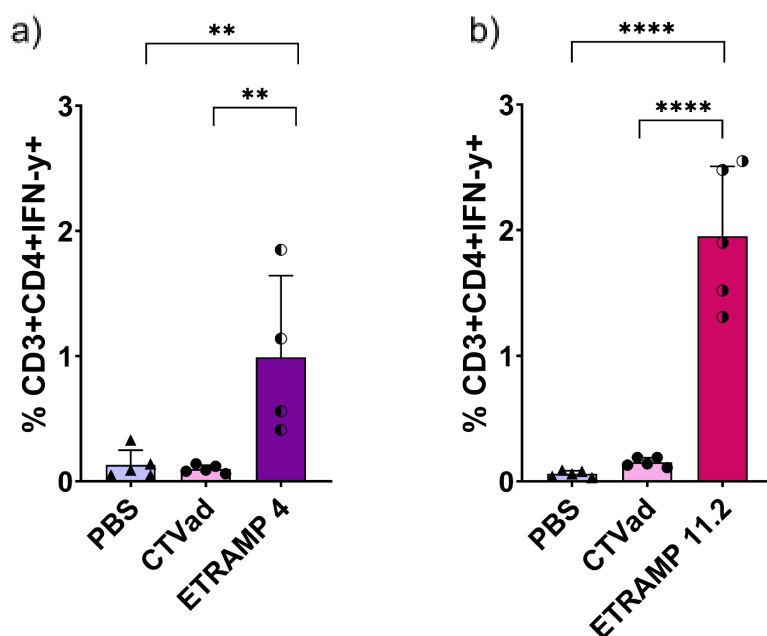
Animais vacinados com três doses (n= 5) foram eutanasiados 42 dias após o início do protocolo vacinal para avaliação do perfil ativação de células T CD8<sup>+</sup> por imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os esplenócitos foram cultivados e estimulados por 18h na presença dos antígenos testados. O perfil de grupos estimulados com os antígenos está representado **a)** para PvETRAMP 4, em **b)** para a PvETRAMP 11.2. As análises estatísticas foram feitas utilizando One-Way ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. \*valor-p  $\leq 0,05$ ; \*\*valor-p  $\leq 0,01$ ; \*\*\*valor-p  $\leq 0,001$ ; \*\*\*\* valor-p  $\leq 0,0001$ .

## 5.6. Perfil de produção de citocinas

### 5.6.1. Células produtoras de IFN- $\gamma$

Para avaliação do perfil de células produtoras de IFN- $\gamma$  foram feitas seleções entre populações distintas de células T, seja T CD4<sup>+</sup>, ou T CD8<sup>+</sup>. Considerando, inicialmente, a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 22a e 22b), foi possível perceber que a imunização aumentou significativamente a frequência de células antígeno-específicas produtoras de IFN- $\gamma$ , frente ao estímulo com as proteínas recombinantes. Enquanto que, os grupos controles, imunizados tanto com PBS, quanto com CTVad, permaneceram não responsivos à presença dos antígenos durante o período de estímulo, indicando assim a ausência de resposta específica montada durante a vacinação, bem como a ausência de resposta inespecífica.

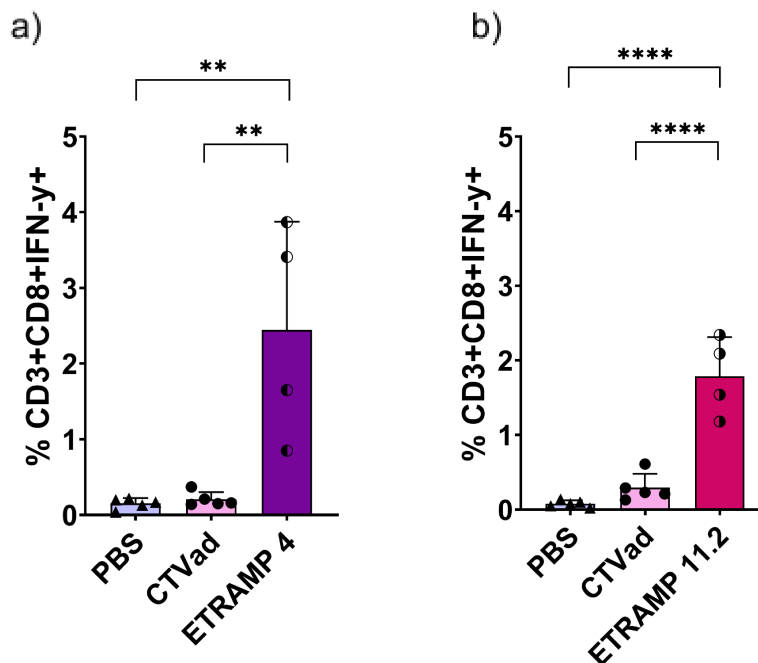
**Figura 22 - Perfil de produção de IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup>**



Animais vacinados com três doses (n= 5) foram eutanasiados 42 dias após o início do protocolo vacinal para avaliação do perfil de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  por imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os esplenócitos foram cultivados e estimulados por 18h na presença dos antígenos testados, previamente à adição de brefeldina e monensina. O perfil de grupos estimulados com os antígenos está representado **a)** para PvETRAPM 4, em **b)** para a PvETRAPM 11.2. As análises estatísticas foram feitas utilizando One-Way ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. \*valor-p  $\leq 0,05$ ; \*\*valor-p  $\leq 0,01$ ; \*\*\*valor-p  $\leq 0,001$ ; \*\*\*\* valor-p  $\leq 0,0001$ .

Por sua vez, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresentaram resposta similar frente ao estímulo com os antígenos recombinantes (Figura 23a e 23b), mais uma vez reforçando a presença de células antígeno-específicas induzidas pela vacina. Sendo que a população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> dos grupos controles permaneceu irresponsivos frente reestímulo com as proteínas recombinantes.

**Figura 23 - Perfil de produção de IFN- $\gamma$  por células T CD8<sup>+</sup>**

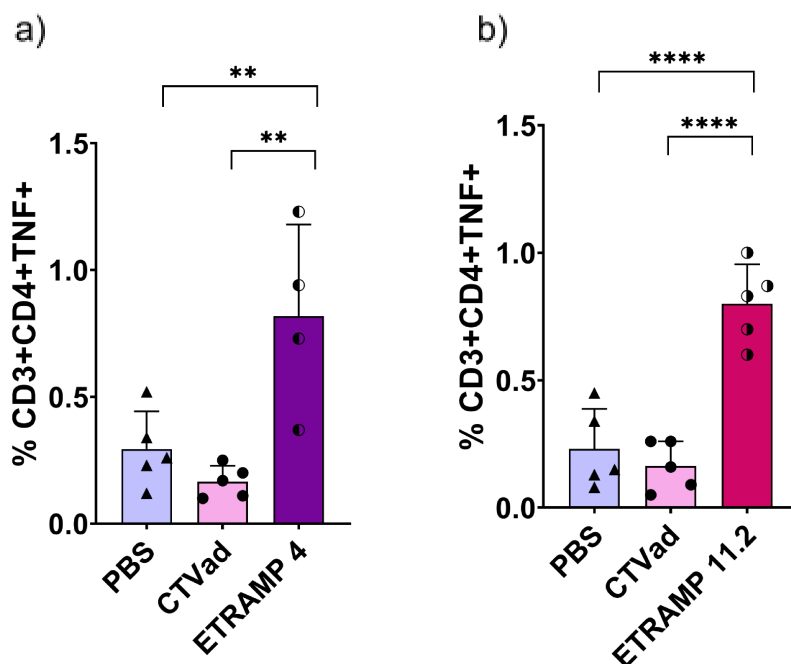


Animais vacinados com três doses (n= 5) foram eutanasiados 42 dias após o início do protocolo vacinal para avaliação do perfil de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  por imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os esplenócitos foram cultivados e estimulados por 18h na presença dos antígenos testados, previamente à adição de brefeldina e monensina. O perfil de grupos estimulados com os antígenos está representado **a)** para PvETRAPM 4, em **b)** para a PvETRAPM 11.2. As análises estatísticas foram feitas utilizando One-Way ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. \*valor-p  $\leq 0,05$ ; \*\*valor-p  $\leq 0,01$ ; \*\*\*valor-p  $\leq 0,001$ ; \*\*\*\* valor-p  $\leq 0,0001$ .

### 5.6.2. Células produtoras de TNF

Para a avaliação de células produtoras de TNF, foram feitas seleções de populações positivas para a citocina entre células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. O perfil observado após a vacinação demonstra que células T CD4<sup>+</sup> derivadas de animais imunizados com os candidatos vacinais testados respondem ao estímulo com significativa produção de TNF- $\alpha$  (Figuras 24a e 24b). Este resultado demonstra, novamente, um aumento na frequência de células antígeno específicas induzidas pela imunização, sendo que os grupos controles, conforme o esperado, permaneceram irresponsivos frente ao estímulo.

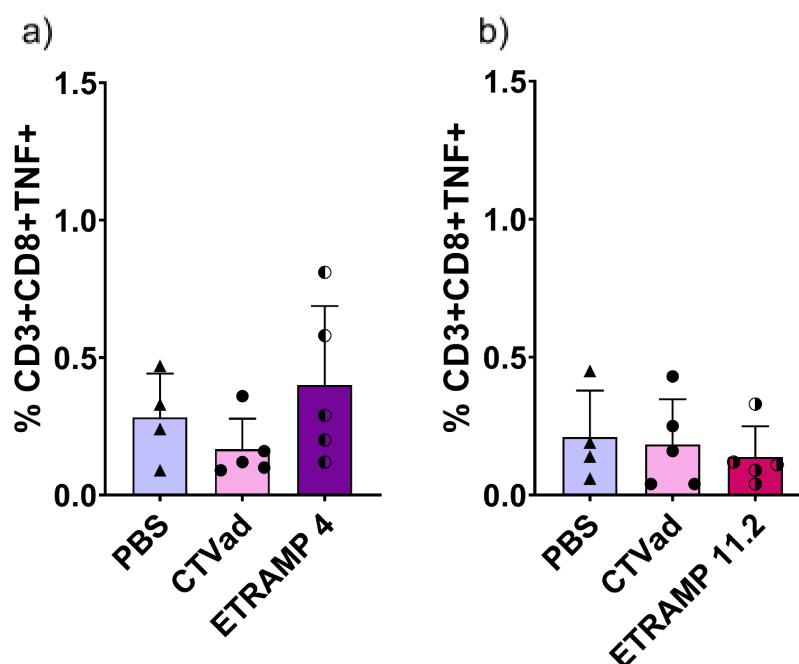
**Figura 24 - Perfil de produção de TNF por células T CD4<sup>+</sup>**



Animais vacinados com três doses (n= 5) foram eutanasiados 42 dias após o início do protocolo vacinal para avaliação do perfil de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de TNF por imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os esplenócitos foram cultivados e estimulados por 18h na presença dos antígenos testados, previamente à adição de brefeldina e monensina. O perfil de grupos estimulados com os antígenos está representado **a)** para PvETRAMP 4, em **b)** para a PvETRAMP 11.2. As análises estatísticas foram feitas utilizando One-Way ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. \*valor-p  $\leq 0,05$ ; \*\*valor-p  $\leq 0,01$ ; \*\*\*valor-p  $\leq 0,001$ ; \*\*\*\* valor-p  $\leq 0,0001$ .

Entretanto, dentre as células T CD8<sup>+</sup> não foi possível observar aumento na produção da citocina alvo frente ao estímulo em nenhum dos grupos avaliados (Figuras 25a e 25b), apesar da discreta tendência observada entre os animais vacinados com a proteína PvETRAMP 4 (Figura 25a). Assim, podemos hipotetizar que, possivelmente, as proteínas testadas não induzem a produção de TNF- $\alpha$  por células T CD8<sup>+</sup>.

**Figura 25- Perfil de produção de TNF por células T CD8<sup>+</sup>**



Animais vacinados com três doses (n= 5) foram eutanasiados 42 dias após o início do protocolo vacinal para avaliação do perfil de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de TNF por imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os esplenócitos foram cultivados e estimulados por 18h na presença dos antígenos testados, previamente à adição de brefeldina e monensina. O perfil de grupos estimulados com os antígenos está representado **a)** para PvETRAMP 4, em **b)** para a PvETRAMP 11.2. As análises estatísticas foram feitas utilizando One-Way ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. \*valor-p ≤0,05; \*\*valor-p ≤0,01; \*\*\*valor-p ≤0,001; \*\*\*\* valor-p ≤0,0001.

### 5.7. Desafio e avaliação da proteção

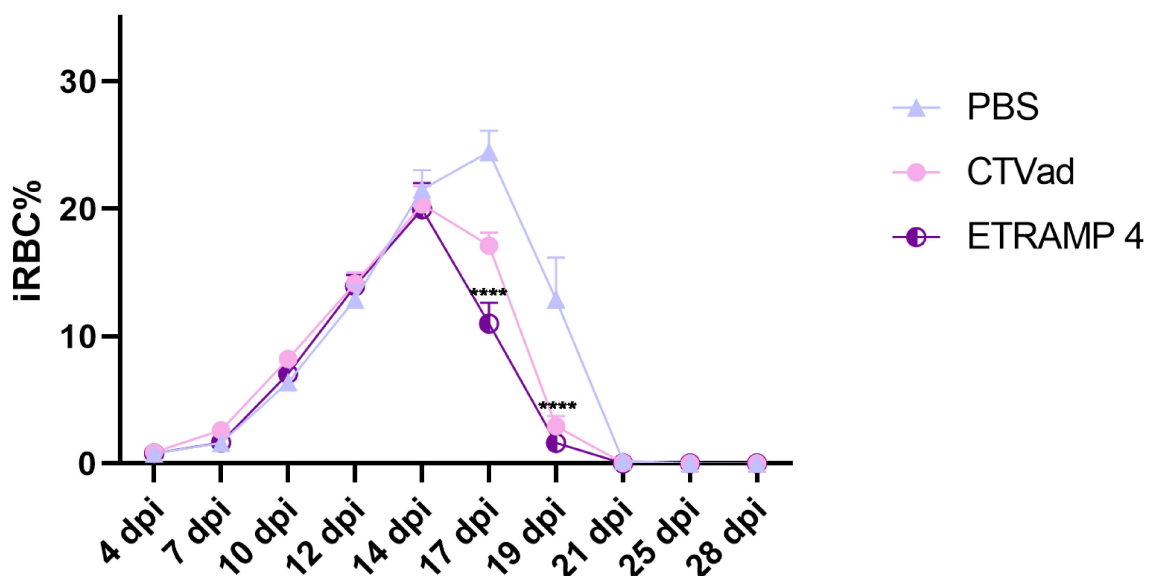
Decorridos 21 dias após a última dose, os animais (n= 5/grupo) imunizados foram desafiados com a cepa de *P. yoelii* 17XNL-GFP para avaliarmos a capacidade das proteínas de induzirem proteção específica. Para o desafio, foram utilizados 10<sup>5</sup> iRBC/animal, com injeção intraperitoneal e acompanhamento por 31 dias, através da citometria de fluxo selecionando populações de células vermelhas (FSC-A x SSC-A), com subsequente seleção de eventos individuais (FSC-A x FSC-H) e, posteriormente, seleção de eventos FITC/AlexaFluor 488<sup>+</sup> (Figura 8).

Durante o período de acompanhamento da parasitemia, todos os grupos experimentais seguiram um padrão de aumento crescente durante os 14 primeiros dias após infecção, sem distinção estatística entre os grupos (Figura 26). Entretanto,

3 dias após, com 17 dpi, a proteína PvETRAMP 4 apresentou redução significativa da parasitemia, quando comparada com CTVad (valor  $p= 0,0001$ ) ou o grupo imunizado com PBS (valor  $p<0,0001$ ). Nesse mesmo ponto, foi possível também observar um controle parcial do grupo imunizado com CTVad quando comparado com o PBS, indicando que o adjuvante foi capaz de induzir uma melhor resposta imunológica frente ao desafio através da indução de um estado basal mais ativado (Figura 26).

Posteriormente, com 19 dpi a resposta de animais imunizados com a proteína PvETRAMP 4 e animais imunizados apenas com o adjuvante se tornam similares, enquanto o grupo imunizado com PBS manteve uma média de parasitemia superior a 10% (valor  $p< 0,0001$ ). Nos dias seguintes de acompanhamento, todos os animais foram capazes de controlar a infecção, permanecendo negativos até o último dia de acompanhamento (Figura 26).

**Figura 26 - Curva de parasitemia comparativa com PvETRAMP 4**

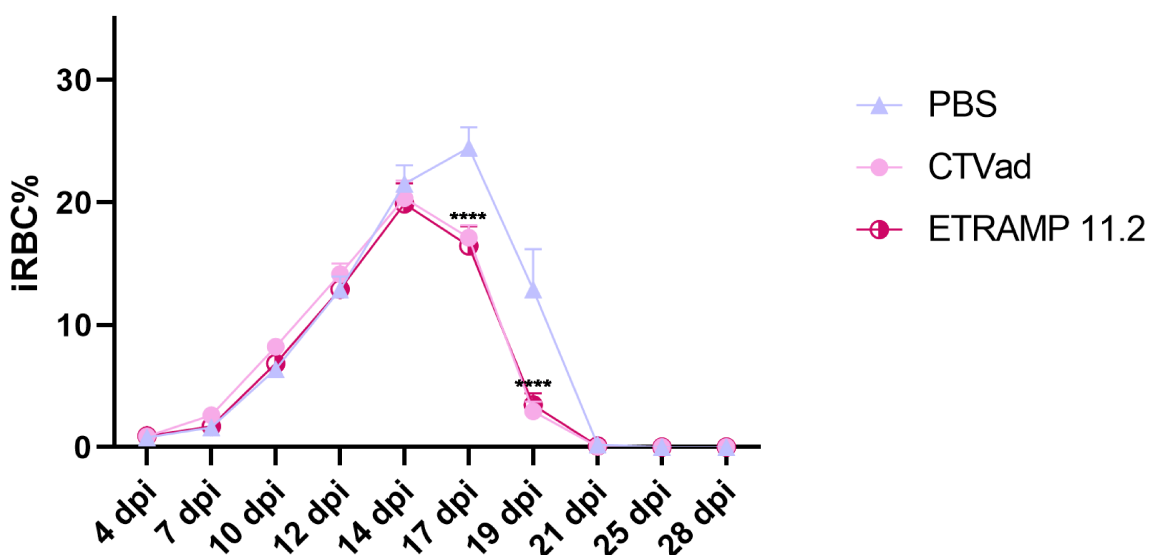


Animais vacinados ( $n= 5$ ) com três doses, foram desafiados 49 dias após o início do protocolo vacinal com  $10^5$  iRBCs e a carga parasitária acompanhada por citometria de fluxo por 31 dias pós-infecção (dpi). As análises estatísticas evidenciadas comparam a redução da parasitemia sanguínea do grupo imunizado com a proteína PvETRAMP 4 contra o controle salino, PBS. As análises estatísticas foram

feitas utilizando Two-Way ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. \*valor-p  $\leq 0,05$ ; \*\*valor-p  $\leq 0,01$ ; \*\*\*valor-p  $\leq 0,001$ ; \*\*\*\* valor-p  $\leq 0,0001$ .

Em relação a PvETRAMP 11.2, os animais imunizados com a proteína apresentaram uma curva de parasitemia similar ao grupo controle imunizado com CTVad, indicando que o efeito observado frente ao desafio é proveniente da resposta imunológica induzida pelo adjuvante (Figura 27). Dessa forma, o perfil observado para a PvETRAMP 11.2 acompanha o previamente descrito para o CTVad, com o primeiro ponto de controle da parasitemia com 17 dpi (valor p < 0,0001) e, posteriormente, seguido por 19 dpi (valor p < 0,0001) quando comparados com o PBS. Similarmente, a PvETRAMP 4, os animais imunizados com a proteína PvETRAMP 11.2 também alçaram o controle da parasitemia com 21dpi, permanecendo sem parasitos detectados até o término do acompanhamento.

**Figura 27 - Curva de parasitemia comparativa com PvETRAMP 11.2**

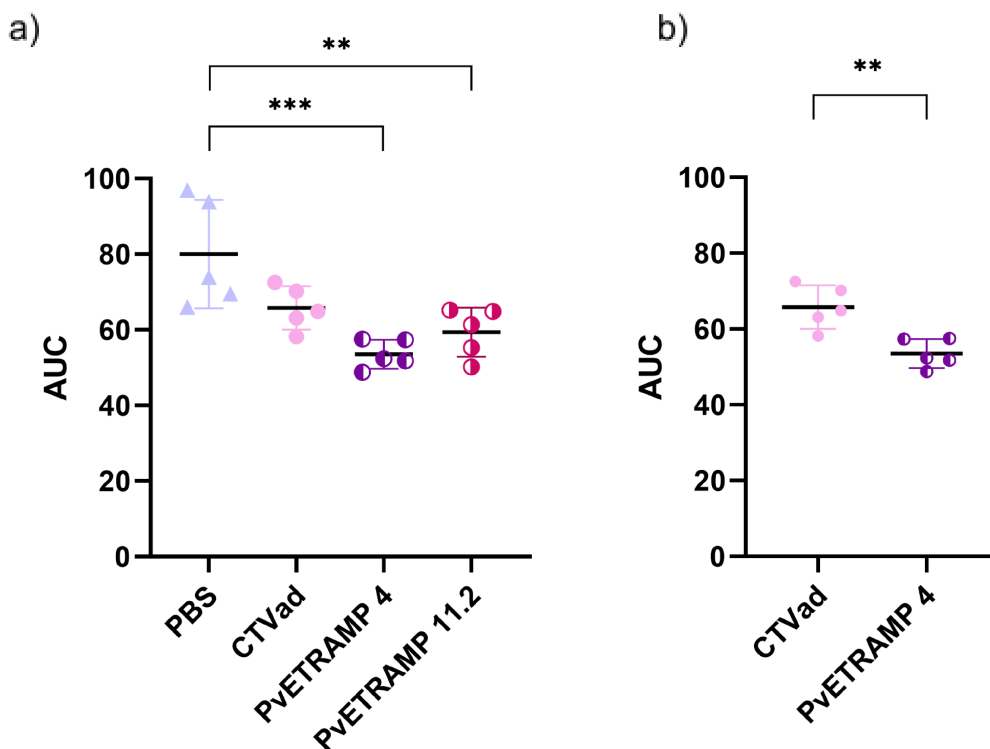


Animais vacinados (n= 5) com três doses foram desafiados 49 dias após o início do protocolo vacinal com  $10^5$  iRBCs e a carga parasitária acompanhada por citometria de fluxo por 31 dias pós-infecção (dpi). As análises estatísticas evidenciadas comparam a redução da parasitemia sanguínea do grupo imunizado com a proteína PvETRAMP 11.2 contra o controle salino, PBS. As análises estatísticas foram feitas utilizando Two-Way ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. \*valor-p  $\leq 0,05$ ; \*\*valor-p  $\leq 0,01$ ; \*\*\*valor-p  $\leq 0,001$ ; \*\*\*\* valor-p  $\leq 0,0001$ .

Para elucidar o efeito global sobre a parasitemia dos animais imunizados, foram calculadas as áreas sob a curva (do inglês, *Area Under the Curve* - AUC), para todos os animais em cada grupo, com exclusão de outliers (Figura 28a). Assim, comparando a variância das AUCs entre os grupos, é possível afirmar que ambas as proteínas impactaram positivamente no controle da parasitemia, com uma tendência de redução sendo observada entre os grupos PBS e CTVad.

Entretanto, apesar do aparente controle, a análise de variância entre os grupos não permite distinguir o real efeito da imunização com as proteínas de interesse e o adjuvante, sendo todos estatisticamente similares. Partindo da observação que a PvETRAMP 4 apresentou redução significativa na parasitemia quando comparada com o grupo CTVad (Figura 26), buscamos refinar a análise, através da comparação de médias pelo Teste T de Student, e confirmamos a hipótese de que a PvETRAMP 4 foi capaz de controlar parcialmente a parasitemia quando comparada com o adjuvante (Figura 28b).

**Figura 28 - AUC para a parasitemia dos animais imunizados**



Comparação de AUC (do inglês *Area Under the Curve*), considerando a curva de parasitemia individual de todos os animais.. Em **a)** está representada a análise de variância por One-Way ANOVA entre os grupos imunizados, sendo não-significante a variância entre os grupos PBS e CTVad. Em **b)**

está representada a comparação de médias entre os grupos CTvad e PvETRAMP 4 por meio do teste T de Student não-pareado. \*valor-p  $\leq 0,05$ ; \*\*valor-p  $\leq 0,01$ ; \*\*\*valor-p  $\leq 0,001$ ; \*\*\*\* valor-p  $\leq 0,0001$ .

### 5.8. Avaliação da homologia *P. vivax*/*P. yoelii*

Buscando entender os resultados observados com o desafio utilizando a cepa de *P. yoelii* 17XNL, recuperamos a sequência de aminoácidos de todas as ETRAMPs, conforme descrito por MacKellar (2011), para realizarmos a avaliação da identidade entre os alvos, originalmente encontrados em *P. vivax*, e a espécie utilizada no desafio, uma infecção heteróloga.

Assim, a partir da avaliação da homologia entre a PvETRAMP 4 com as demais proteínas de *P. yoelii* (Figura 29) foi possível observar uma concentração maior de resíduos conservados na porção N-terminal das proteínas avaliadas, majoritariamente até a posição 25. Sendo os resíduos mais polimórficos encontrados nas posições 6-7, 14-15, 19-20 e 23. Entretanto, a identidade global comparada com a PvETRAMP 4 (representada na Figura 29 como 100%) das demais proteínas foi consideravelmente baixa, sendo a maior homologia encontrada com a proteína EAA15650.1, com 24%.

**Figura 29 - Análise de identidade da região N-terminal da PvETRAMP 4 com *P. yoelii***

		1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40																			
PVX_090230 - PvETRAMP 4 (A5K676 - Sal1)	100%	M	K	L	A	K	L	F	Y	F	V	A	F	L	I	T	I	K	V	F	V	P	G	V	N	N	D	G	F	V	Q	A	K	S	A	G	A	D	S	K	S
XP_728418.1 uncharacterized protein PY17X_0518100 [ <i>Plasmodium yoelii</i> ]	12%	M	K	A	S	K	I	F	V	L	F	N	V	I	L	I	T	H	Y	L	V	F	G	L	S	K	N	V	P	K	K	N	T	S	A	F	K	K	F	R	D
EAA18713.1 hypothetical protein [ <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> ]	17%	M	K	L	T	K	A	L	Y	F	A	A	F	L	L	G	I	N	V	L	T	P	G	S	N	N	Y	V	E	A	N	P	E	I	I	N	R	I	K	K	K
EAA17456.1 hypothetical protein [ <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> ]	18%	M	K	L	A	K	V	L	Y	F	V	A	F	L	L	A	I	N	V	L	T	P	E	S	N	N	Y	V	E	A	N	S	E	I	I	N	K	I	K	K	K
XP_725147.1 early transcribed membrane protein [ <i>Plasmodium yoelii</i> ]	19%	M	K	L	A	K	A	L	Y	F	V	A	F	L	L	A	I	K	V	L	T	P	G	S	N	N	Y	V	E	A	K	P	A	N	T	K	K	V	T	K	S
EAA15650.1 hypothetical protein [ <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> ]	24%	M	K	L	A	K	A	L	Y	F	V	A	F	L	L	A	I	K	V	L	I	P	G	A	N	N	Y	V	E	A	K	P	A	N	T	K	K	V	V	K	G
XP_723839.1 early transcribed membrane protein [ <i>Plasmodium yoelii</i> ]	17%	M	K	L	A	K	A	L	Y	F	V	A	F	L	L	A	I	K	V	L	T	P	G	S	N	N	Y	V	E	A	N	P	P	N	S	D	K	V	A	N	G
XP_731367.1 early transcribed membrane protein [ <i>Plasmodium yoelii</i> ]	15%	M	K	L	T	K	T	L	Y	F	A	A	F	L	L	A	I	N	V	L	T	L	G	S	N	N	Y	V	E	A	N	L	E	I	I	N	R	I	K	K	
EAA22537.1 early transcribed membrane protein family [ <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> ]	5%	M	P	Q	F	F	T	C	I	I	Y	I	N	K	Y	F	R	T	N	K	K	Y	M	K	V	Y	K	M	N	T	L	K	V	F	F	V	F	V	L	Y	
XP_730579.1 early transcribed membrane protein [ <i>Plasmodium yoelii</i> ]	9%	M	K	V	P	K	V	S	A	L	F	L	V	F	L	S	V	S	F	L	P	S	S	S	L	C	D	P	N	A	A	N	T	K	I	P	N	I	P	N	
XP_729846.1 early transcribed membrane protein [ <i>Plasmodium yoelii</i> ]	19%	M	K	L	A	K	A	L	Y	F	V	A	F	L	L	A	I	K	V	L	T	P	G	Y	N	N	C	V	E	A	K	P	A	N	S	K	K	V	T	K	S
XP_729845.1 early transcribed membrane protein [ <i>Plasmodium yoelii</i> ]	8%	M	K	T	T	Y	V	S	L	F	F	I	L	L	I	C	G	I	F	E	C	K	A	S	S	V	D	E	T	N	D	P	K	P	N	N	V	K	L	T	

Representação parcial (1-40 aminoácidos) da identidade entre as proteínas da família de ETRAMPs dentro da espécie de *P. yoelii* frente a proteína de PvETRAMP 4. Em tons de azul estão representados resíduos de aminoácidos conservados em comparação com a proteína referência para a busca de identidade (sequência nominal marcada em roxo), sendo tons mais escuros referentes a resíduos altamente conservados. A porcentagem subsequente ao identificador para cada sequência é

referente a identidade comparada com a proteína PvETRAMP 4 (cuja identidade está representada como 100%).

Por sua vez, para a PvETRAMP 11.2 foi observada uma prevalência de resíduos conservados até a posição 15 (Figura 30). No entanto, similarmente aos achados para a PvETRAMP 4, ao avaliar a homologia global entre as proteínas os achados apontam para baixa identidade, com a XP\_725147.1 apresentando a maior identidade (24%).

**Figura 30 - Análise da identidade da região N-terminal da PvETRAMP 11.2 com *P. yoelii***

		1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40																			
PvX_003565 - PvETRAMP 11.2 (A5KBH5 - SalI)	100%	M	K	I	T	K	V	L	Y	L	F	A	A	L	L	A	V	N	F	I	A	P	S	F	Y	N	N	-	V	V	A	G	K	K	V	A	A	G	Y	K	K
XP_728418.1 uncharacterized protein PY17X_0518100 [ <i>Plasmodium yoelii</i> ]	13%	M	K	A	S	K	I	F	V	L	F	N	V	I	L	I	T	H	Y	L	V	F	G	L	S	K	N	V	P	K	K	N	T	S	A	F	K	K	F	R	D
EAA18713.1 hypothetical protein [ <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> ]	19%	M	K	L	T	K	A	L	Y	F	A	A	F	L	L	G	I	N	V	L	T	P	G	S	N	N	Y	V	E	A	N	P	E	I	I	N	R	I	K	K	K
EAA17456.1 hypothetical protein [ <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> ]	20%	M	K	L	A	K	V	L	Y	F	V	A	F	L	L	A	I	N	V	L	T	P	E	S	N	N	Y	V	E	A	N	S	E	I	I	N	K	I	K	K	K
XP_725147.1 early transcribed membrane protein [ <i>Plasmodium yoelii</i> ]	24%	M	K	L	A	K	A	L	Y	F	V	A	F	L	L	A	I	K	V	L	T	P	G	S	N	N	Y	V	E	A	K	P	A	N	T	K	K	V	T	K	S
EAA15650.1 hypothetical protein [ <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> ]	20%	M	K	L	A	K	A	L	Y	F	V	A	F	L	L	A	I	K	V	L	I	P	G	A	N	N	Y	V	E	A	K	P	A	N	T	K	K	V	V	K	G
XP_723839.1 early transcribed membrane protein [ <i>Plasmodium yoelii</i> ]	19%	M	K	L	A	K	A	L	Y	F	V	A	F	L	L	A	I	K	V	L	T	P	G	S	N	N	Y	V	E	A	N	P	P	N	S	D	K	V	A	N	G
XP_731367.1 early transcribed membrane protein [ <i>Plasmodium yoelii</i> ]	19%	M	K	L	T	K	T	L	Y	F	A	A	F	L	L	A	I	N	V	L	T	L	G	S	N	N	Y	V	E	A	N	L	E	I	I	N	R	I	K	K	K
EAA22537.1 early transcribed membrane protein family [ <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> ]	4%	M	P	Q	F	F	T	C	I	I	Y	I	N	K	Y	F	R	T	N	K	K	Y	M	K	V	Y	K	M	N	T	L	K	V	F	F	V	F	V	L	Y	
XP_730579.1 early transcribed membrane protein [ <i>Plasmodium yoelii</i> ]	12%	M	K	V	P	K	V	S	A	L	F	L	V	F	L	L	S	V	S	F	L	P	S	S	S	L	C	D	P	N	A	A	N	T	K	I	P	N	I	P	N
XP_729846.1 early transcribed membrane protein [ <i>Plasmodium yoelii</i> ]	23%	M	K	L	A	K	A	L	Y	F	V	A	F	L	L	A	I	K	V	L	T	P	G	Y	N	N	C	V	E	A	K	P	A	N	S	K	K	V	T	K	S
XP_729845.1 early transcribed membrane protein [ <i>Plasmodium yoelii</i> ]	14%	M	K	T	T	Y	V	S	L	F	F	I	L	L	I	C	G	I	F	E	C	K	A	S	S	V	D	E	T	N	D	P	K	P	N	N	V	K	L	T	

Representação parcial (1-40 aminoácidos) da identidade entre as proteínas da família de ETRAMPs dentro da espécie de *P. yoelii* frente a proteína de PvETRAMP 11.2. Em tons de azul estão representados resíduos de aminoácidos conservados em comparação com a proteína referência para a busca de identidade (sequência nominal marcada em roxo), sendo tons mais escuros referentes a resíduos altamente conservados. A porcentagem subsequente ao identificador para cada sequência é referente a identidade comparada com a proteína PvETRAMP 11.2 (cuja identidade está representada como 100%).

## 5.9. Antigenicidade em humanos

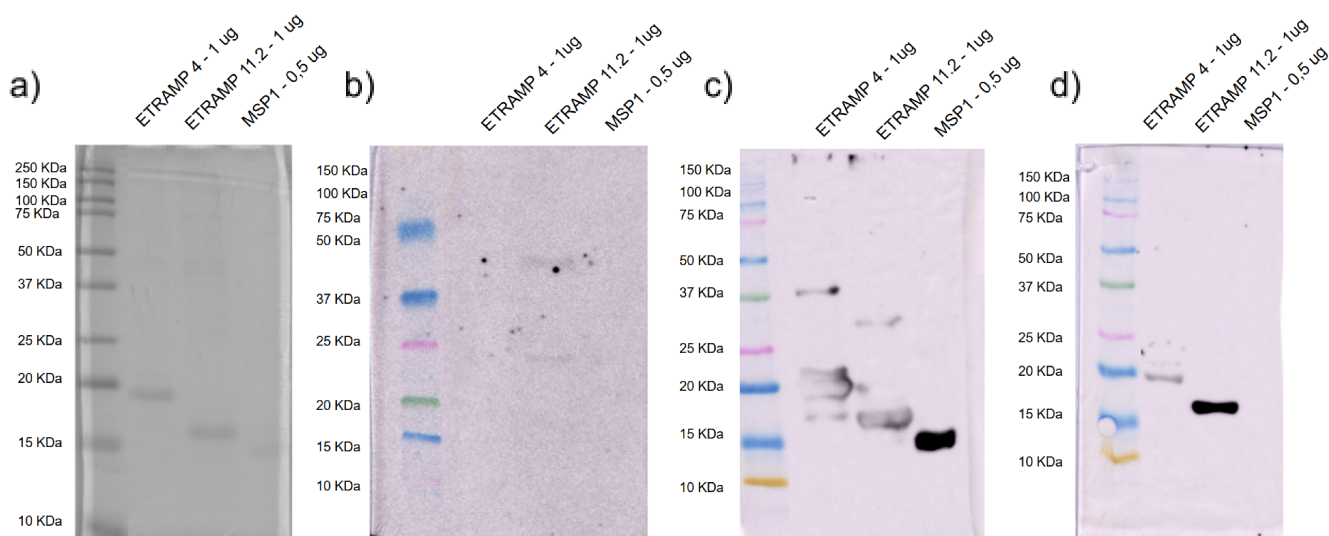
Para a avaliação da antigenicidade com amostras de soro/plasma humano, foram utilizadas as proteínas recombinantes purificadas, testadas contra o soro de pacientes saudáveis não endêmicos da cidade de Belo Horizonte-MG (Figura 31b), endêmicos da região de Porto Velho-RO infectados com *P. vivax* (Figura 31c) e pacientes da mesma localidade infectados com *P. falciparum* (Figura 31d).

Os resultados observados corroboram com achados prévios do grupo em ELISA, demonstrando reconhecimento específico das proteínas recombinantes PvETRAMP 4 e PvETRAMP 11.2 pelo soro de pacientes infectados com *P. vivax*,

com paralelo reconhecimento da PvMSP1 (Figura 31c) e *P. falciparum*, sem a presença da reatividade para a PvMSP1 (Figura 31d). Sendo este último resultado um indício significativo da reatividade cruzada com *P. falciparum*.

Ademais, foi possível observar duas bandas pouco reativas, próximas a 25 KDa e entre 37-50 KDa, referentes a canaleta da proteína PvETRAMP 11.2 testada frente ao soro de pacientes não-endêmicos. Esse resultado reforça a possibilidade destes antígenos reconhecidos de forma inespecífica serem contaminantes de *E. coli*, também observados no gel espelho na Figura 31a e não reativos na Figura 12a. Isso porque, membros da família de ETRAMPs são proteínas exclusivas de espécies de *Plasmodium*, além da ausência a exposição desses indivíduos de área não-endêmica aos antígenos naturais do parasito, como ocorre com indivíduos infectados.

**Figura 31 - Avaliação da antigenicidade de pacientes frente às proteínas recombinantes por *Western Blotting***



Capacidade de anticorpos induzidos pela infecção natural reconhecerem os antígenos recombinantes por *Western Blots* (WB). Em **a)** é possível ver o perfil eletroforético dos antígenos alvo corridos em gel SDS-PAGE 15% Bis-Acrilamida. As figuras **b-d)** representam *Western Blots* feitos com diferentes *pools* de soro de 6 pacientes, diluídos 1:200, sendo **b)** doadores saudáveis de área não-endêmica (Belo Horizonte - MG), **c)** pacientes infectados com *P. vivax* coletados na região de Porto Velho - RO e **d)** pacientes infectados com *P. falciparum* coletados na região de Porto Velho - RO.

## 6. DISCUSSÃO

A aprovação das vacinas RTS,S e R21 contra a malária falciparum representa um importante passo para o combate da doença, oferecendo melhora nas condições de vida de crianças imunizadas, além de abrir caminho para que outras vacinas mais eficazes sejam desenvolvidas. Entretanto, apesar de décadas de esforço e da significativa redução da mortalidade de indivíduos vacinados (~13%), os resultados ainda são insatisfatórios e os efeitos da vacinação não contemplam a infecção pelo *P. vivax*, deixando espaço para o desenvolvimento científico em ambos os casos (MIURA, K *et al.* 2024). Assim, considerando a relevância do *P. vivax*, o estudo de potenciais novos alvos vacinais constitui uma área de interesse significativo para o desenvolvimento de estratégias a serem abordadas no futuro.

Dessa forma, a partir dos estudos inéditos feitos em nosso grupo de pesquisa ao longo dos últimos anos, foram identificados diferentes antígenos, sendo estes antígenos caracterizados como capazes de engajar uma resposta celular direcionada contra o estágio sanguíneo da infecção. Para a continuidade desses esforços foram selecionados dois alvos, as proteínas PvETRAMP 4 e PvETRAMP 11.2, para caracterização quanto a sua capacidade imunogênica e protetora.

Para isso, essas proteínas foram produzidas utilizando o sistema de expressão heteróloga em *E. coli*. Inicialmente os achados demonstram a capacidade dessas proteínas serem expressas na íntegra pelas células hospedeiras, como observado no lisado total de colônias induzidas (Figura 10), sendo outras observações também coerentes com achados anteriores. Em estudo feito por Spielmann e colaboradores, os pesquisadores encontraram homodímeros na membrana da célula hospedeira, *E. coli*, de ETRAMPs de *P. falciparum*. Além da observação de que tais agregados eram resistentes às condições desnaturantes do gel SDS-PAGE (SPIELMANN, T. *et al.* 2006). Esses agregados proteicos podem desestabilizar as funções celulares, reduzindo sua viabilidade, por meio de alterações no proteoma membranar e no proteoma citoplasmático, com concomitante formação de corpos de inclusão (WAGNER, S. *et al.* 2007 & GEERTSMA, E. R. *et al.* 2008), em acordo com o observado acerca da solubilidade dos antígenos (Figura 11).

Neste aspecto, para a purificação de ambas as proteínas foram utilizados tampões contendo 8M de ureia, um agente desnaturante capaz de reduzir interações intra e intermoleculares (HAMADA, H., ARAKAWA, T., & SHIRAKI, K. 2009), de

forma a permitir a solubilização dos corpos de inclusão para posteriores etapas de purificação até que um perfil de pureza aceitável fosse obtido (Figura 12). Dado a natureza dos antígenos e a composição final do tampão para as imunizações (tampão contendo 10% de glicerol, 500 mM de NaCl, 20 mM de tampão fosfato de sódio pH= 7,8, 1M de ureia), um importante aspecto a ser considerado é o dobramento do antígeno, uma vez que esta característica pode impactar a resposta de anticorpos. Alterações conformacionais podem levar à indução de imunoglobulinas destinadas a epítomos não fidedignos à conformação nativa e, portanto, com atividade biológica alterada (KIBRIA, M. G. *et al.* 2020 & SELA-CULANG, I., KUNIK, V., & OFRAN, Y. 2013).

Estima-se que cerca de 90% dos epítomos proteicos para células B sejam destinados a regiões encontradas na estrutura terciária dos antígenos, com uma prevalência menor de epítomos lineares, aminoácidos sequenciais, engajando a produção de anticorpos, mesmo dentro de epítomos conformacionais (KRINGELUM, J. V *et al.* 2013 & CLIFFORD, J. N. *et al.* 2022). Dessa forma, a predição de epítomos lineares (Figuras 13 e 14) demonstra a acessibilidade das regiões das proteínas, em acordo com sua natureza desenovelada, indicando a capacidade de induzir anticorpos para essas porções. Uma importante característica da predição, reforçando sua qualidade, foi a baixa pontuação de resíduos presentes nos domínios transmembrana da PVETRAMP 4, entre as posições 6-29 e 56-79, e da PvETRAMP 11.2, entre 6-29 e 51-74, sendo estes resíduos provavelmente inacessíveis *in vivo*.

Assim, conforme o esperado, a imunização com as proteínas induziu a produção de anticorpos de maneira significativa. Inicialmente, a avaliação dos níveis de anticorpos totais da classe de IgG demonstrou aumento importante entre doses para a PvETRAMP 4, enquanto atingiu a saturação da resposta ainda na segunda dose com a PvETRAMP 11.2. (Figura 15b).

Tal resultado pode ser correlacionado com os achados de McNamara e colaboradores em seu estudo sobre o perfil de resposta de anticorpos em pacientes não expostos frente a imunização com esporozoítos irradiados de *P. falciparum*. Nesse estudo, os pesquisadores observaram uma estabilização da resposta de anticorpos específicos contra a PfCSP, enquanto as células B de memória estimuladas após o segundo reforço do imunizante mostraram manutenção, ou até declínio, em seus níveis quando comparadas com o aumento de quatro vezes duas

semanas após o primeiro reforço. Similarmente, os achados do grupo foram reprodutíveis em modelo murino (MCNAMARA, H. A *et al.* 2020).

Em relação aos níveis de IgG1 e IgG2c (Figuras 16 e 17) é possível inferir a atuação subjacente de células com um padrão Th2 e Th1, em ordem. Conforme estudo feito por Petritus e Burns, o efeito sinérgico entre IFN- $\gamma$  e IL-4, citocinas associadas a um padrão de respostas Th1 e Th2 respectivamente, bem como a presença de anticorpos das subclasses de IgG2a/c e IgG1 são importantes para a proteção de animais C57BL/6 imunizados frente ao desafio sanguíneo com a cepa letal *P. yoelii* 17XL (PETRITUS, P. M., & BURNS, J. M. 2008).

Entretanto, duas considerações são necessárias; primeiramente, o papel de anticorpos destinados às ETRAMPs no contexto da infecção ainda não está claro, bem como não foi explorado no presente trabalho. Em segundo lugar, o adjuvante utilizado, o CTvad1, é um análogo do MF59, sabidamente associado a um perfil de células Th2, oferecendo uma possível tendência à ativação dessa população (KO, E.-J. *et al.* 2016 & ZHAO, T. *et al.* 2023). Ademais, em relação ao potencial estimulador do CTvad1, achados demonstram um potencial para a indução de células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas, através da indução da apresentação cruzada por células dendríticas nos linfonodos de animais imunizados (KIM, E. H. *et al.* 2020).

Subsequentemente, partimos para a avaliação da resposta celular e dos epítopos para células T em camundongos C57BL/6, buscando construir o entendimento empírico e teórico acerca da capacidade imunoestimulatória das proteínas utilizadas para induzir resposta de células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> (PAUL, S. *et al.* 2020). Os resultados das predições demonstram uma concentração de epítopos na região N-terminal de ambas as proteínas (Figuras 18 e 19), um achado importante dado a maior conservação de resíduos de aminoácidos até a posição 40 na cadeia polipeptídica (Figuras 29 e 30), com especial destaque para a PvETRAMP 4 (Figura 29) e o intervalo entre os resíduos 1-25. Interessantemente, conforme supracitado, esse intervalo engloba parte da primeira região transmembrana da PvETRAMP 4, assim como da PvETRAMP 11.2, e está em acordo com resultados observados por outros grupos. Nestes, os pesquisadores relatam uma representação significativa de regiões helicais transmembrana entre os ligantes fortes de MHC-I e HLA-I (PEREZ, M. A. S. *et al.* 2019 & GOLDBERGER, Z. *et al.* 2023 & TOKITA, S., KANASEKI, T., & TORIGOE, T. 2024).

Em relação à ativação de células T CD4<sup>+</sup>, podemos observar uma resposta basal elevada entre os grupos controle, mas com aumento significativo de células T CD4<sup>+</sup> responsivas, expressando CD69, dentre os grupos imunizados para ambas as proteínas (Figura 20). Tal achado reforça a importância dos testes *in vivo*, uma vez que as predições iniciais de epítopos para T CD4<sup>+</sup>, portanto apresentados por MHC-II, não indicavam peptídeos imunoestimuladores para a PvETRAMP 11.2 (Figura 19). Entretanto, devemos reconhecer a alta estrigência do critério de seleção, com afinidade ranqueada desejável de <0,7, limitando a disponibilidade de ligantes preditos. Para células T CD8<sup>+</sup> somente a proteína PvETRAMP 4 demonstrou capacidade de ativar essa população celular (Figura 21a) com aumento do marcador CD69.

Brevemente, esta proteína de superfície faz parte da família de receptores de lectinas tipo C-II, sendo considerada um marcador de ativação recente clássico, expresso por diversos tipos celulares do sistema imune. Sua expressão está relacionada com o engajamento do TCR/CD3 ou outros estímulos de ativação, com rápida transcrição (30-60 minutos), seguida de rápido declínio em até 6 horas (CIBRIÁN, D.& SÁNCHEZ-MADRID, F. 2017). Este fator associado ao protocolo de estímulo, por uma noite, e de marcação, bem como às características intrínsecas do antígeno, podem estar ligados à baixa ativação de células CD8<sup>+</sup> pela proteína PvETRAMP 11.2 (Figura 21b).

Outro importante achado foi a indução de IFN- $\gamma$  em células T CD4<sup>+</sup> (Figura 22) e T CD8<sup>+</sup> (Figura 23) antígeno específicas para cada uma das proteínas utilizadas na imunização. Conforme discutido ao longo deste trabalho, o IFN- $\gamma$  representa uma importante citocina com efeitos antiparasitários e fortemente relacionada à proteção de indivíduos infectados, com achados similares em modelos murinos (PETRITUS, P. M., & BURNS, J. M. 2008).

Em estudo feito por pesquisadores do nosso grupo, demonstrou-se que o IFN- $\gamma$  estimula a transcrição de genes associados com a apresentação de antígenos intracelulares, como *b2m*, *mhci*, *tap1* e *tap2*, em eritroblastos de animais infectados com *P. yoelii* 17XNL. Esse perfil de genes estimulados pelo IFN- $\gamma$  indicam um papel protetor dessa citocina que, conjuntamente com a expansão de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas capazes de reconhecer e eliminar os reservatórios do parasito (reticulócitos infectados), auxilia no controle da parasitemia sanguínea (HOJO-SOUZA, N. S, *et al.* 2020). Ademais, o reconhecimento e estímulo de células

T CD8<sup>+</sup> pelo IFN- $\gamma$  leva à expansão de células cujo TCR possui baixa afinidade pelo complexo peptídeo-MHC-I e reduz a magnitude da resposta inicial de células de alta afinidade. Assim, impedindo a exaustão imediata desses linfócitos e favorecendo a formação de uma população de memória de alta avides, enquanto oferece uma resposta moderada inicial (UHL, L. F. K. *et al.* 2023).

Em relação à produção de TNF- $\alpha$ , apenas células T CD4<sup>+</sup> apresentaram esse perfil de citocinas (Figura 24), com células T CD8<sup>+</sup> não responsivas (Figura 25). A resposta produtora de TNF- $\alpha$  de ambos os subtipos de linfócitos T durante a malária desempenha papel importante na ativação de outras células imunes, como macrófagos e células NK por exemplo, participando do controle da parasitemia, mas também de processos patológicos da doença (ANTONELLI, L. R. *et al.* 2020 & LEÃO, L. *et al.* 2020). Achados como o Van der Ploeg e colaboradores ressaltam a complexa dinâmica dessa citocina, sendo relatado em seus estudos, sobre SARs-CoV-2, a associação de anticorpos neutralizantes de longa vida na presença de células T CD4<sup>+</sup>/TNF<sup>+</sup> (VAN DER PLOEG, K. *et al.* 2022). Dessa forma, evidenciando seu papel protetor, ainda que inconsistente entre estudos.

Para os animais desafiados, foi observado que a PvETRAMP 4 demonstrou discreta capacidade para controlar a parasitemia sanguínea a partir do décimo sétimo dia (Figuras 26 e 28b), enquanto animais imunizados com a PvETRAMP 11.2 apresentaram performance similar ao grupo que recebeu apenas o adjuvante (Figuras 27 e 28a). Sendo este último achado um indício de uma resposta inespecífica, provavelmente mediada por um efeito de ativação basal pelo adjuvante, no caso do grupo controle, ou pela combinação com a proteína (VAN AALST, S. *et al.* 2017), um antígeno sabidamente imunogênico como supracitado.

Entretanto, apesar da capacidade de controlar a parasitemia sanguínea (Figura 28b), o período de resposta dos animais imunizados com a PvETRAMP 4 condiz com a cinética clássica associada ao desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Dessa forma, hipotetizamos que, dado a baixa conservação de epítomos entre as ETRAMPs de *P. yoelii* e a PvETRAMP 4, a resposta inicial frente à vacinação deve estimular fracamente a proliferação de células de menor afinidade ao antígeno alvo, com aumento de células específicas e de alta avides, mas com baixa capacidade para desempenhar a reatividade cruzada. Com o curso da infecção, no entanto, as células de baixa afinidade à PvETRAMP 4 devem sofrer expansão, justificando o efeito observado no décimo sétimo dia. Ademais,

acreditamos ser um processo mediado por células T, visto que a região mais conservada entre as proteínas se encontra na porção N-terminal (Figura 29), com destaque para as posições entre 1-25, onde a predição de epítomos de células B aponta não haver resíduos imunogênicos significativos.

Conforme exposto ao longo do trabalho, os modelos murinos de imunização e desafio sanguíneo costumam atingir altas parasitemias (HOJO-SOUZA, N. S. *et al.* 2020) e falhar no controle pleno da carga parasitária (GOOD, M. F., 2001), uma limitação que não desqualifica um candidato vacinal por si só. No presente caso, a alta diferença antigênica entre as espécies é certamente um gargalo, mas os resultados ainda assim apontam para uma possível capacidade protetora, ao menos para a PvETRAMP 4 (Figuras 26 e 28b).

Por fim, avaliamos a antigenicidade das proteínas frente ao soro de pacientes infectados com *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo também testada a reatividade cruzada contra soro de pacientes saudáveis não-expostos. Apesar da baixa identidade dessa família de proteínas entre diferentes espécies, foi possível observar reatividade específica para ambos os antígenos de interesse utilizando o soro de pacientes infectados com *P. vivax* e *P. falciparum* (respectivamente Figuras 31c e 31d), apontando uma possível resposta cruzada a ser investigada. Interessantemente, o soro de indivíduos saudáveis indicou uma linha de reatividade inespecífica para a PvETRAMP 11.2, sendo possivelmente uma reação cruzada contra proteínas contaminantes de *E. coli*. Dessa forma, a imunização com ambas as proteínas seria capaz de induzir uma resposta de anticorpos com reatividade cruzada para *P. falciparum*, transcendendo a proposta original de uma vacina focada apenas na malária vivax. No entanto, dado a natureza incerta, previamente mencionada, da resposta de anticorpos contra essas proteínas, outros testes seriam necessários para elucidar os mecanismos imunológicos envolvidos no perfil protetor induzido por essas proteínas.

## 7. CONCLUSÃO

O presente projeto demonstrou a capacidade imunogênica das proteínas testadas, apresentando achados significativos para justificar a continuidade de estudos vacinais com esses antígenos, no entanto, dado as limitações do modelo de desafio com *P. yoelli*, não conseguiu gerar provas contundentes de sua capacidade protetora. Outros estudos serão necessários para elucidar a especificidade da resposta celular e a função de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, bem como o papel dos anticorpos induzidos pela imunização na proteção contra a infecção.

## REFERÊNCIAS

1. ADERINTO, N., Olatunji, G., Kokori, E., Sikirullahi, S., Aboje, J. E., & Ojabo, R. E. (2024). **A perspective on Oxford's R21/Matrix-MTM malaria vaccine and the future of global eradication efforts.** *Malaria Journal*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-024-04846-w>
2. ALBUQUERQUE, S. S., Carret, C., Grosso, A. R., Tarun, A. S., Peng, X., Kappe, S. H. I., Prudêncio, M., & Mota, M. M. (2009). **Host cell transcriptional profiling during malaria liver stage infection reveals a coordinated and sequential set of biological events.** *BMC Genomics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-270>
3. AMINO, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., & Ménard, R. (2006). **Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal.** *Nature Medicine*, 12(2), 220–224. <https://doi.org/10.1038/nm1350>
4. ANTONELLI, L. R., Junqueira, C., Vinetz, J. M., Golenbock, D. T., Ferreira, M. U., & Gazzinelli, R. T. (2020). **The immunology of Plasmodium vivax malaria.** *Immunological Reviews*, 293(1), 163–189. <https://doi.org/10.1111/imr.12816>
5. ARORA, G., Chuang, Y. M., Sinnis, P., Dimopoulos, G., & Fikrig, E. (2023). **Malaria: influence of Anopheles mosquito saliva on Plasmodium infection.** In *Trends in Immunology* (Vol. 44, Issue 4, pp. 256–265). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.it.2023.02.005>
6. BAER, K., Klotz, C., Kappe, S. H. I., Schnieder, T., & Frevert, U. (2007). **Release of hepatic Plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature.** *PLoS Pathogens*, 3(11), 1651–1668. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030171>
7. BAER, K., Roosevelt, M., Clarkson, A. B., van Rooijen, N., Schnieder, T., & Frevert, U. (2007). **Kupffer cells are obligatory for Plasmodium yoelii sporozoite infection of the liver.** *Cellular Microbiology*, 9(2), 397–412. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00798.x>
8. BAKER, D. A. (2010). **Malaria gametocytogenesis.** In *Molecular and Biochemical Parasitology* (Vol. 172, Issue 2, pp. 57–65). <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.019>
9. BANO, N., Romano, J. D., Jayabalasingham, B., & Coppens, I. (2007). **Cellular interactions of Plasmodium liver stage with its host mammalian cell.** *International Journal for Parasitology*, 37(12), 1329–1341. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.005>
10. BANTUCHAI, S., Imad, H., & Nguitrageool, W. (2022). **Plasmodium vivax gametocytes and transmission.** *Parasitology International*, 87. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102497>

11. BARBOSA, C. R. R., DE LACERDA, L. B, BETEMCOURT, P. et al. **Identification of cross-stage, cross-species malaria CD8+ T cell antigens**, 30 May 2025, PREPRINT (Version 1) available at Research Square [https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-6682089/v1]
12. BARROS, F. S. M., Arruda, M. E., Gurgel, H. C., & Honório, N. A. (2011). **Spatial clustering and longitudinal variation of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larvae in a river of the Amazon**: The importance of the forest fringe and of obstructions to flow in frontier malaria. *Bulletin of Entomological Research*, 101(6), 643–658. https://doi.org/10.1017/S0007485311000265
13. BRADDOM, A. E., Batugedara, G., Bol, S., & Bunnik, E. M. (2020). **Potential functions of atypical memory B cells in Plasmodium-exposed individuals**. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 50, Issue 13, pp. 1033–1042). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.08.003
14. BRANDES M, Willimann K, Moser B. **Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells**. *Science*. 2005 Jul 8;309(5732):264-8. doi: 10.1126/science.1110267. Epub 2005 Jun 2. PMID: 15933162.
15. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Boletim epidemiológico**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, v. 55, n. 14, 1 out. 2024. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria/situacao-e-epidemiologica-da-malaria/boletins-epidemiologicos-de-malaria/boletim-epidemiologico-volume-55-no-14. Acesso em: 12/03/2025.
16. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Boletim Epidemiológico: Dia da Malária nas Américas – um panorama da malária no Brasil em 2022 e no primeiro semestre de 2023**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2024. v. 55, n. 1. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria/situacao-e-epidemiologica-da-malaria/boletins-epidemiologicos-de-malaria/2022-boletim-e-epidemiologico-volume-55-no-1-2023-dia-da-malaria-nas-americas-2013-um-panorama-da-malaria-no-brasil-em-2022-e-no-primeiro-semester-de-2023. Acesso em: 13/03/2025.
17. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil. (2019) **Guia de Vigilância em Saúde**. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\_vigilancia\_saude\_3ed.pdf
18. BUTLER, N. S., Moebius, J., Pewe, L. L., Traore, B., Doumbo, O. K., Tygrett, L. T., Waldschmidt, T. J., Crompton, P. D., & Harty, J. T. (2012). **Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection**. *Nature Immunology*, 13(2), 188–195. https://doi.org/10.1038/ni.2180

19. CALDAS DE CASTRO, M., Monte-Mó, R. L., Sawyer, D. O., & Singer, B. H. (2006). **Malaria risk on the Amazon frontier**. In *PNAS February* (Vol. 14, Issue 7). [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0510576103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0510576103)
20. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. **Malaria**. Atualizado em 24/09/2024. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
21. CERAMI, C., Frevert, U., Sinnis, P., Takacs, B., Clavijo, P., Santos, M. J., Nussenzweig, V., & Heidelberger, M. (1992). **The Basolateral Domain of the Hepatocyte Plasma Membrane Bears Receptors for the Circumsporozoite Protein of Plasmodium falciparum Sporozoites**. In *Cell* (Vol. 70).
22. CHATURVEDI, N., Bharti, P. K., Tiwari, A., & Singh, N. (2016). **Strategies & recent development of transmission-blocking vaccines against Plasmodium falciparum**. In *Indian Journal of Medical Research* (Vol. 143, Issue JUNE, pp. 696–711). Indian Council of Medical Research. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.191927>
23. CHAVES, Y. O., da Costa, A. G., Pereira, M. L. M., de Lacerda, M. V. G., Coelho-Dos-Reis, J. G., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Malheiro, A., Monteiro, W. M., Orlandi, P. P., Marinho, C. R. F., & Nogueira, P. A. (2016). **Immune response pattern in recurrent Plasmodium vivax malaria**. *Malaria Journal*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1501-5>
24. CHENG, Y., Lu, F., Lee, S. K., Kong, D. H., Ha, K. S., Wang, B., Sattabongkot, J., Tsuboi, T., & Han, E. T. (2015). **Characterization of plasmodium vivax early transcribed membrane protein 11.2 and exported protein 1**. *PLoS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127500>
25. CIBRIÁN, D., & Sánchez-Madrid, F. (2017). **CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper**. In *European Journal of Immunology* (Vol. 47, Issue 6, pp. 946–953). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>
26. CLIFFORD, J. N., Høie, M. H., Deleuran, S., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. (2022). **BepiPred-3.0: Improved B-cell epitope prediction using protein language models**. *Protein Science*, 31(12). <https://doi.org/10.1002/pro.4497>
27. CLYDE DF, McCarthy VC, Miller RM, Hornick RB. **Specificity of protection of man immunized against sporozoite-induced falciparum malaria**. *Am J Med Sci*. 1973 Dec;266(6):398-403. doi: 10.1097/00000441-197312000-00001. PMID: 4590095.
28. CLYDE DF, Most H, McCarthy VC, Vanderberg JP. **Immunization of man against sporozoite-induced falciparum malaria**. *Am J Med Sci*. 1973 Sep;266(3):169-77. doi: 10.1097/00000441-197309000-00002. PMID: 4583408.

29. CLYDE DF. **Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites**: A review of the university of Maryland studies, 1971-75. *Bull World Health Organ* (1990) 68 Suppl:9-12.
30. COHEN, S., MCGREGOR, I. A., & CARRINGTON, S. (1961). **Gamma-Globulin and Acquired Immunity to Human Malaria**. *Nature*, 192(4804), 733-737. doi:10.1038/192733a0
31. COPPI A, Tewari R, Bishop JR, Bennett BL, Lawrence R, Esko JD, et al. **Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to Plasmodium sporozoites to stop migrating and productively invade host cells**. *Cell Host Microbe*. 2007; 2:316-327. [PubMed: 18005753]
32. COSTA, P. A. C., Figueiredo, M. M., Diniz, S. Q., Peixoto, A. P. M. M., Maloy, K. J., Teixeira-Carvalho, A., Tada, M. S., Pereira, D. B., Gazzinelli, R. T., & Antonelli, L. R. V. (2018). **Plasmodium vivax infection impairs regulatory T-Cell suppressive function during acute malaria**. *Journal of Infectious Diseases*, 218(8), 1314-1323. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy296>
33. COSTA, P. A. C., Leoratti, F. M. S., Figueiredo, M. M., Tada, M. S., Pereira, D. B., Junqueira, C., Soares, I. S., Barber, D. L., Gazzinelli, R. T., & Antonelli, L. R. V. (2015). **Induction of inhibitory receptors on T cells during plasmodium vivax malaria impairs cytokine production**. *Journal of Infectious Diseases*, 212(12), 1999-2010. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv306>
34. CURRÀ, C., di Luca, M., Picci, L., de Sousa Silva Gomes dos Santos, C., Siden-Kiamos, I., Pace, T., & Ponzi, M. (2013). **The ETRAMP Family Member SEP2 Is Expressed throughout Plasmodium berghei Life Cycle and Is Released during Sporozoite Gliding Motility**. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067238>
35. DA SILVA, A. N. M., Santos, C. C., Lacerda, R. N., Machado, R. L., & Póvoa, M. M. (2006). **Susceptibility of Anopheles aquasalis and An. darlingi to Plasmodium vivax VK210 and VK247**. In *Mem Inst Oswaldo Cruz* (Vol. 101, Issue 5).
36. DAME JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, Hockmeyer WT, Maloy WL, Haynes JD, Schneider I, Roberts D, et al. **Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite Plasmodium falciparum**. *Science*. 1984 Aug 10;225(4662):593-9. doi: 10.1126/science.6204383. PMID: 6204383.
37. DASSAH, S., Adu, B., Sirima, S. B., Mordmüller, B., Ngoa, U. A., Atuguba, F., Arthur, F. K. N., Mensah, B. A., Kaddumukasa, M., Bang, P., Kremsner, P. G., Mategula, D., Flach, C., Milligan, P., & Theisen, M. (2021). **Extended follow-up of children in a phase2b trial of the GMZ2 malaria vaccine**. *Vaccine*, 39(31), 4314-4319. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.06.024>
38. DATOO, M. S., Dicko, A., Tinto, H., Ouédraogo, J. B., Hamaluba, M., Olotu, A., Beaumont, E., Ramos Lopez, F., Natama, H. M., Weston, S., Chemba, M., Compaore, Y. D., Issiaka, D., Salou, D., Some, A. M., Omenda, S., Lawrie, A.,

- Bejon, P., Rao, H., ... Valea, I. (2024). **Safety and efficacy of malaria vaccine candidate R21/Matrix-M in African children: a multicentre, double-blind, randomised, phase 3 trial.** *The Lancet*, 403(10426), 533–544. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)02511-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02511-4)
39. DE CAMARGO, T. M., de Freitas, E. O., Gimenez, A. M., Lima, L. C., de Almeida Caramico, K., Franoso, K. S., Bruna-Romero, O., Andolina, C., Nosten, F., Renia, L., Ertl, H. C. J., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., Rodrigues, M. M., Reyes-Sandoval, A., & Soares, I. S. (2018). **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(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19063-6>
40. DOUGLAS, A. D., Baldeviano, G. C., Lucas, C. M., Lugo-Roman, L. A., Crosnier, C., Bartholdson, S. J., Diouf, A., Miura, K., Lambert, L. E., Ventocilla, J. A., Leiva, K. P., Milne, K. H., Illingworth, J. J., Spencer, A. J., Hjerrild, K. A., Alanine, D. G. W., Turner, A. v., Moorhead, J. T., Edgel, K. A., ... Draper, S. J. (2015). **A PfrH5-based vaccine is efficacious against heterologous strain blood-stage plasmodium falciparum infection in Aotus monkeys.** *Cell Host and Microbe*, 17(1), 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.017>
41. DRAPER, S. J., Sack, B. K., King, C. R., Nielsen, C. M., Rayner, J. C., Higgins, M. K., Long, C. A., & Seder, R. A. (2018). **Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons.** In *Cell Host and Microbe* (Vol. 24, Issue 1, pp. 43–56). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.008>
42. DUFFY, P. E. (2022). **Current approaches to malaria vaccines.** In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 70). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102227>
43. DUFFY, P. E., Gorres, J. P., Healy, S. A., & Fried, M. (2024). **Malaria vaccines: a new era of prevention and control.** In *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01065-7>
44. DUNCAN, C. J. A., Sheehy, S. H., Ewer, K. J., Douglas, A. D., Collins, K. A., Halstead, F. D., Elias, S. C., Lillie, P. J., Rausch, K., Aebig, J., Miura, K., Edwards, N. J., Poulton, I. D., Hunt-Cooke, A., Porter, D. W., Thompson, F. M., Rowland, R., Draper, S. J., Gilbert, S. C., ... Ellis, R. D. (2011). **Impact on malaria parasite multiplication rates in infected volunteers of the protein-in-adjuvant vaccine AMA1-C1/alhydrogel+CPG 7909.** *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022271>
45. FERREIRA, M. U., & Castro, M. C. (2016). **Challenges for malaria elimination in Brazil.** In *Malaria Journal* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1335-1>
46. FIGUEIREDO, M. M., Costa, P. A. C., Diniz, S. Q., Henriques, P. M., Kano, F. S., Tada, M. S., Pereira, D. B., Soares, I. S., Martins-Filho, O. A., Jankovic, D., Gazzinelli, R. T., & Antonelli, L. R. do V. (2017). **T follicular helper cells regulate the activation of B lymphocytes and antibody production during**

- Plasmodium vivax** infection. *PLoS Pathogens*, 13(7).  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006484>
47. FIRACATIVE, C., Gressler, A. E., Schubert, K., Schulze, B., Müller, U., Brombacher, F., von Bergen, M., & Alber, G. (2018). **Identification of T helper (Th)1- and Th2-associated antigens of *Cryptococcus neoformans* in a murine model of pulmonary infection.** *Scientific Reports*, 8(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21039-z>
  48. FRISCHKNECHT F, Matuschewski K. ***Plasmodium* Sporozoite Biology.** Cold Spring Harb Perspect Med. 2017 May 1;7(5):a025478. doi: 10.1101/cshperspect.a025478. PMID: 28108531; PMCID: PMC5411682.
  49. GAZZINELLI, R. T., Kalantari, P., Fitzgerald, K. A., & Golenbock, D. T. (2014). **Innate sensing of malaria parasites.** *Nature Reviews Immunology*, 14(11), 744–757. <https://doi.org/10.1038/nri3742>
  50. GEERTSMA, E. R., Groeneveld, M., Slotboom, D.-J., Poolman, B., & Kaback, H. R. (2008). **Quality control of overexpressed membrane proteins.** In *PNAS April* (Vol. 15, Issue 15).
  51. GIMENEZ, A. M., Salman, A. M., Marques, R. F., López-Camacho, C., Harrison, K., Kim, Y. C., Janse, C. J., Soares, I. S., & Reyes-Sandoval, A. (2021). **A universal vaccine candidate against *Plasmodium vivax* malaria confers protective immunity against the three PvCSP alleles.** *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96986-1>
  52. GOLDBERGER, Z., Hauert, S., Chang, K., Kurtanich, T., Alpar, A. T., Repond, G., Wang, Y., Gomes, S., Krishnakumar, R., Siddarth, P., Swartz, M. A., Hubbell, J. A., & Briquez, P. S. (2023). **Membrane-localized neoantigens predict the efficacy of cancer immunotherapy.** *Cell Reports Medicine*, 4(8).  
<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101145>
  53. GOMES, E. C. de S., Cruz, D. L. da, Santos, M. A. V. M., Souza, R. M. C., Oliveira, C. M. F. de, Ayres, C. F. J., Domingos, R. M., Pedro, M. das G. da S., Paiva, M. H. S., & Pimentel, L. M. L. M. (2020). **Outbreak of autochthonous cases of malaria in coastal regions of Northeast Brazil: the diversity and spatial distribution of species of *Anopheles*.** *Parasites and Vectors*, 13(1).  
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04502-7>
  54. GOOD, M. F. (2001). **Towards a blood-stage vaccine for malaria: Are we following all the leads?** *Nature Reviews Immunology*, 1(2), 117–125.  
<https://doi.org/10.1038/35100540>
  55. GRAEWE, S., Rankin, K. E., Lehmann, C., Deschermeier, C., Hecht, L., Froehlike, U., Stanway, R. R., & Heussler, V. (2011). **Hostile takeover by plasmodium: Reorganization of parasite and host cell membranes during liver stage egress.** *PLoS Pathogens*, 7(9).  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002224>
  56. GRUSZCZYK, J., Huang, R. K., Chan, L. J., Menant, S., Hong, C., Murphy, J. M., Mok, Y. F., Griffin, M. D. W., Pearson, R. D., Wong, W., Cowman, A. F., Yu,

- Z., & Tham, W. H. (2018). **Cryo-EM structure of an essential Plasmodium vivax invasion complex**. *Nature*, 559(7712), 135–139. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0249-1>
57. GRUSZCZYK, J., Kanjee, U., Chan, L. J., Menant, S., Malleret, B., Lim, N. T. Y., Schmidt, C. Q., Mok, Y. F., Lin, K. M., Pearson, R. D., Rangel, G., Smith, B. J., Call, M. J., Weekes, M. P., Griffin, M. D. W., Murphy, J. M., Abraham, J., Sriprawat, K., Menezes, M. J., ... Tham, W. H. (2018). **Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for Plasmodium vivax**. *Science*, 359(6371), 48–55. <https://doi.org/10.1126/science.aan1078>
58. HAMADA, H., Arakawa, T., & Shiraki, K. (2009). **Effect of Additives on Protein Aggregation**. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(4), 400–407. <https://doi.org/10.2174/138920109788488941>
59. HART, M. N., Mohring, F., DonVito, S. M., Thomas, J. A., Muller-Sienerth, N., Wright, G. J., Knuepfer, E., Saibil, H. R., & Moon, R. W. (2023). **Sequential roles for red blood cell binding proteins enable phased commitment to invasion for malaria parasites**. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40357-z>
60. HIRAKO, I. C., Assis, P. A., Hojo-Souza, N. S., Reed, G., Nakaya, H., Golenbock, D. T., Coimbra, R. S., & Gazzinelli, R. T. (2018). **Daily Rhythms of TNF $\alpha$  Expression and Food Intake Regulate Synchrony of Plasmodium Stages with the Host Circadian Cycle**. *Cell Host and Microbe*, 23(6), 796–808.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.04.016>
61. HOJO-SOUZA, N. S., Azevedo, P. O. de, Castro, J. T. de, Teixeira-Carvalho, A., Lieberman, J., Junqueira, C., & Gazzinelli, R. T. (2020). **Contributions of IFN- $\gamma$  and granulysin to the clearance of Plasmodium yoelii blood stage**. *PLoS Pathogens*, 16(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008840>
62. HORNBECK, P. v. (2015). **Enzyme-linked immunosorbent assays**. *Current Protocols in Immunology*, 2015(August), 2.1.1-2.1.23. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0201s110>
63. HOU, M. M., Barrett, J. R., Themistocleous, Y., Rawlinson, T. A., Diouf, A., Martinez, F. J., Nielsen, C. M., Lias, A. M., King, L. D. W., Edwards, N. J., Greenwood, N. M., Kingham, L., Poulton, I. D., Khozoe, B., Goh, C., Hodgson, S. H., Lochlainn, D. J. mac, Salkeld, J., Guillotte-Blisnick, M., ... Draper, S. J. (2023). **Vaccination with Plasmodium vivax Duffy-binding protein inhibits parasite growth during controlled human malaria infection**. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adf1782>
64. JUNQUEIRA, C., Barbosa, C. R. R., Costa, P. A. C., Teixeira-Carvalho, A., Castro, G., sen Santara, S., Barbosa, R. P., Dotiwala, F., Pereira, D. B., Antonelli, L. R., Lieberman, J., & Gazzinelli, R. T. (2018). **Cytotoxic CD8+ T cells recognize and kill Plasmodium vivax-infected reticulocytes**. *Nature Medicine*, 24(9), 1330–1336. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0117-4>

65. KIBRIA, M. G., Akazawa-Ogawa, Y., Rahman, N., Hagihara, Y., & Kuroda, Y. (2020). **The immunogenicity of an anti-EGFR single domain antibody (VHH) is enhanced by misfolded amorphous aggregation but not by heat-induced aggregation.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 152, 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.05.006>
66. KIM, E. H., Woodruff, M. C., Grigoryan, L., Maier, B., Lee, S. H., Mandal, P., Cortese, M., Natrajan, M. S., Ravindran, R., Ma, H., Merad, M., Gitlin, A. D., MocarSKI, E. S., Jacob, J., & Pulendran, B. (2020). **Squalene emulsion-based vaccine adjuvants stimulate CD8 T cell, but not antibody responses, through a RIPK3-dependent pathway.** *ELife*, 9, 1–27. <https://doi.org/10.7554/eLife.52687>
67. KO, E.-J., Lee, Y.-T., Kim, K.-H., Jung, Y.-J., Lee, Y., Denning, T. L., & Kang, S.-M. (2016). **Effects of MF59 Adjuvant on Induction of Isotype-Switched IgG Antibodies and Protection after Immunization with T-Dependent Influenza Virus Vaccine in the Absence of CD4 + T Cells .** *Journal of Virology*, 90(15), 6976–6988. <https://doi.org/10.1128/jvi.00339-16>
68. KRINGELUM, J. V., Nielsen, M., Padkjær, S. B., & Lund, O. (2013). **Structural analysis of B-cell epitopes in antibody: Protein complexes.** *Molecular Immunology*, 53(1–2), 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.06.001>
69. KUNKEAW, N., Nguitragool, W., Takashima, E., Kangwanrangsang, N., Muramatsu, H., Tachibana, M., Ishino, T., Lin, P. J. C., Tam, Y. K., Pichyangkul, S., Tsuboi, T., Pardi, N., & Sattabongkot, J. (2023). **A Pvs25 mRNA vaccine induces complete and durable transmission-blocking immunity to Plasmodium vivax.** *Npj Vaccines*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00786-9>
70. KURUP, S. P., Butler, N. S., & Harty, J. T. (2019). **T cell-mediated immunity to malaria.** In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 19, Issue 7, pp. 457–471). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0158-z>
71. LAMARQUE, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J. F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B. W., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Boulanger, M. J., Bentley, G. A., & Lebrun, M. (2011). **The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites.** *PLoS Pathogens*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001276>
72. LAURENS, M. B. (2019). **RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview.** *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1669415>
73. LEÃO, L., Puty, B., Dolabela, M. F., Pova, M. M., Né, Y. G. D. S., Eiró, L. G., Fagundes, N. C. F., Maia, L. C., & Lima, R. R. (2020). **Association of cerebral malaria and TNF-α levels: A systematic review.** *BMC Infectious Diseases*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05107-2>

74. LINDNER, S. E., Miller, J. L., & Kappe, S. H. I. (2012). **Malaria parasite pre-erythrocytic infection: Preparation meets opportunity.** In *Cellular Microbiology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 316–324).  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01734.x>
75. LONGLEY, R. J., Halbroth, B. R., Salman, A. M., Ewer, K. J., Hodgson, S. H., Janse, C. J., Khan, S. M., Hill, A. V. S., & Spencer, A. J. (2017). **Assessment of the Plasmodium falciparum preerythrocytic antigen UIS3 as a potential candidate for a malaria vaccine.** *Infection and Immunity*, 85(3).  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00641-16>
76. LUNDIE, R. J., de Koning-Ward, T. F., Davey, G. M., Nie, C. Q., Hansen, D. S., Shong Lau, L., Mintern, J. D., Belz, G. T., Schofield, L., Carbone, F. R., Villadangos, J. A., Crabb, B. S., Heath, W. R., & Hall, E. (2008). **Blood-stage Plasmodium infection induces CD8 T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8 dendritic cells.** In *PNAS September* (Vol. 23).
77. MAC-DANIEL, L., Buckwalter, M. R., Berthet, M., Virk, Y., Yui, K., Albert, M. L., Gueirard, P., & Ménard, R. (2014). **Local Immune Response to Injection of Plasmodium Sporozoites into the Skin .** *The Journal of Immunology*, 193(3), 1246–1257. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302669>
78. MACKELLAR, D. C., O'Neill, M. T., Aly, A. S. I., Sacci, J. B., Cowman, A. F., & Kappe, S. H. I. (2010). **Plasmodium falciparum PF10\_0164 (ETRAMP10.3) is an essential parasitophorous vacuole and exported protein in blood stages.** *Eukaryotic Cell*, 9(5), 784–794. <https://doi.org/10.1128/EC.00336-09>
79. MACKELLAR, D. C., Vaughan, A. M., Aly, A. S. I., Deleon, S., & Kappe, S. H. I. (2011). **A systematic analysis of the early transcribed membrane protein family throughout the life cycle of Plasmodium yoelii.** *Cellular Microbiology*, 13(11), 1755–1767.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01656.x>
80. MALKIN, E. M., Durbin, A. P., Diemert, D. J., Sattabongkot, J., Wu, Y., Miura, K., Long, C. A., Lambert, L., Miles, A. P., Wang, J., Stowers, A., Miller, L. H., & Saul, A. (2005). **Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: A transmission blocking vaccine for Plasmodium vivax malaria.** *Vaccine*, 23(24), 3131–3138. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.12.019>
81. MALLERET, B., Li, A., Zhang, R., W Tan, K. S., Suwanarusk, R., Claser, C., Sun Cho, J., Geok Liang Koh, E., Chu, C. S., Pukrittayakamee, S., Lee Ng, M., Ginhoux, F., Guan Ng, L., Teck Lim, C., Nosten, F., Snounou, G., & Russell, B. (2015). **Plasmodium vivax: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes.** *Blood*, 125(8), 1314–1324.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2014>
82. MANDEFRO, A., Kebede, A. M., Katsvanga, M., Cham, F., Oriero, E., Amambua-Ngwa, A., & Golassa, L. (2025). **Unveiling mismatch of RTS S AS01 and R21 Matrix M malaria vaccines haplotype among Ethiopian**

- Plasmodium falciparum clinical isolates.** *Scientific Reports*, 15(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-00140-0>
83. MCGREGOR, I. ., Carrington, S. ., & Cohen, S. (1963). **Treatment of east african *P. falciparum* malaria with west african human  $\gamma$ -globulin.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 57(3), 170–175. doi:10.1016/0035-9203(63)90058-0
84. MCNAMARA, H. A., Idris, A. H., Sutton, H. J., Vistein, R., Flynn, B. J., Cai, Y., Wiehe, K., Lyke, K. E., Chatterjee, D., KC, N., Chakravarty, S., Lee Sim, B. K., Hoffman, S. L., Bonsignori, M., Seder, R. A., & Cockburn, I. A. (2020). **Antibody Feedback Limits the Expansion of B Cell Responses to Malaria Vaccination but Drives Diversification of the Humoral Response.** *Cell Host and Microbe*, 28(4), 572-585.e7.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.07.001>
85. MEIRELES, A. C. A., da Silva, L. R., Simplício, M. F., de Lima, A. A., Rios, F. G. F., de Menezes, C. A., Feitoza, L. H. M., & Julião, G. R. (2022). **Anopheline diversity in urban and peri-urban malaria foci: comparison between alternative traps and seasonal effects in a city in the Western Brazilian Amazon.** *Malaria Journal*, 21(1).  
<https://doi.org/10.1186/s12936-022-04274-8>
86. MELO, J. O., Padilha, M. A. O., Barbosa, R. T. A., Alonso, W. J., Vittor, A. Y., & Laporta, G. Z. (2020). **Evaluation of the malaria elimination policy in Brazil: a systematic review and epidemiological analysis study HHS Public Access.** In *Trop Biomed* (Vol. 37, Issue 2).
87. MIKOLAJCZAK, S. A., Jacobs-Lorena, V., MacKellar, D. C., Camargo, N., & Kappe, S. H. I. (2007). **L-FABP is a critical host factor for successful malaria liver stage development.** *International Journal for Parasitology*, 37(5), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.01.002>
88. MILLER, L. H., Roberts, T., Shahabuddin, M., & Mccutchan, T. F. (1993). **Analysis of sequence diversity in the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 (MSP-1).** In *Molecular and Biochemical Parasitology* (Vol. 59).
89. MITCHELL, R. A., Ubillos, I., Requena, P., Campo, J. J., Ome-Kaius, M., Hanieh, S., Umbers, A., Samol, P., Barrios, D., Jiménez, A., Bardají, A., Mueller, I., Menéndez, C., Rogerson, S., Dobaño, C., & Moncunill, G. (2024). **Chronic malaria exposure is associated with inhibitory markers on T cells that correlate with atypical memory and marginal zone-like B cells.** *Clinical and Experimental Immunology*, 216(2), 172–191.  
<https://doi.org/10.1093/cei/uxae015>
90. MIURA, K., Flores-Garcia, Y., Long, C. A., & Zavala, F. (2024). **Vaccines and monoclonal antibodies: new tools for malaria control.** In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 37, Issue 2). American Society for Microbiology.  
<https://doi.org/10.1128/cmr.00071-23>

91. MORDMÜLLER, B., Surat, G., Lagler, H., Chakravarty, S., Ishizuka, A. S., Lalremruata, A., Gmeiner, M., Campo, J. J., Esen, M., Ruben, A. J., Held, J., Calle, C. L., Mengue, J. B., Gebru, T., Ibáñez, J., Sulyok, M., James, E. R., Billingsley, P. F., Natasha, K., ... Kremsner, P. G. (2017). **Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine.** *Nature*, 542(7642), 445–449. <https://doi.org/10.1038/nature21060>
92. MOTA, M. M., Hafalla, J. C. R., & Rodriguez, A. (2002). **Migration through host cells activates Plasmodium sporozoites for infection.** *Nature Medicine*, 8(11), 1318–1322. <https://doi.org/10.1038/nm785>
93. MOUNT AM, Mwapasa V, Elliott SR, Beeson JG, Tadesse E, Lema VM, Molyneux ME, Meshnick SR, Rogerson SJ. **Impairment of humoral immunity to Plasmodium falciparum malaria in pregnancy by HIV infection.** *Lancet*. 2004 Jun 5;363(9424):1860-7. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16354-X. PMID: 15183624.
94. MUELLER, A.-K., Camargo, N., Kaiser, K., Andorfer, C., Frevert, U., Matuschewski, K., & Kappe, S. H. (2005). **Plasmodium liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface.** [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0408442102](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0408442102)
95. MUELLER, A.-K., Labaied, M., Kappe, S. H. I., & Matuschewski, K. (2005). **Genetically modified Plasmodium parasites as a protective experimental malaria vaccine.** [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature)
96. MÜLLER HM, Reckmann I, Hollingdale MR, Bujard H, Robson KJ, Crisanti A. **Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of Plasmodium falciparum binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes.** *EMBO J*. 1993 Jul;12(7):2881-9. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05950.x. PMID: 8392935; PMCID: PMC413541.
97. MÜNTER, S., Sabass, B., Selhuber-Unkel, C., Kudryashev, M., Hegge, S., Engel, U., Spatz, J. P., Matuschewski, K., Schwarz, U. S., & Frischknecht, F. (2009). **Plasmodium Sporozoite Motility Is Modulated by the Turnover of Discrete Adhesion Sites.** *Cell Host and Microbe*, 6(6), 551–562. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.11.007>
98. NADEEM, A. Y., Shehzad, A., Islam, S. U., Al-Suhaimi, E. A., & Lee, Y. S. (2022). **Mosquirix™ RTS, S/AS01 Vaccine Development, Immunogenicity, and Efficacy.** In *Vaccines* (Vol. 10, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050713>
99. NAGHIZADEH, M., Miura, K., Addo Ofori, E., Long, C., Sagara, I., Tiono, A. B., Plieskatt, J., & Theisen, M. (2025). **Magnitude and durability of ProC6C-AIOH/Matrix-Mtm vaccine-induced malaria transmission-blocking antibodies in Burkinabe adults from a Phase 1 randomized trial.** *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 21(1). <https://doi.org/10.1080/21645515.2025.2488075>

100. NATAMA, H. M., Salkeld, J., Somé, A., Soremekun, S., Diallo, S., Traoré, O., Rouamba, T., Ouédraogo, F., Ouédraogo, E., Daboné, K. C. S., Koné, N. A., Compaoré, Z. M. J., Kafando, M., Bonko, M. dit A., Konaté, F., Sorgho, H., Nielsen, C. M., Pipini, D., Diouf, A., ... Minassian, A. M. (2025). **Safety and efficacy of the blood-stage malaria vaccine RH5.1/Matrix-M in Burkina Faso: interim results of a double-blind, randomised, controlled, phase 2b trial in children.** *The Lancet Infectious Diseases*.  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(24\)00752-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00752-7)
101. NAZERI, S., Zakeri, S., Mehrizi, A. A., Sardari, S., & Djadid, N. D. (2020). **Measuring of IgG2c isotype instead of IgG2a in immunized C57BL/6 mice with Plasmodium vivax TRAP as a subunit vaccine candidate in order to correct interpretation of Th1 versus Th2 immune response.** *Experimental Parasitology*, 216. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107944>
102. NUNES-CABAÇO, H., Moita, D., & Prudêncio, M. (2022). **Five decades of clinical assessment of whole-sporozoite malaria vaccines.** In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.977472>
103. NUSSENZWEIG, R.S., Vanderberg, J., Most, H., and Orton, C. (1967). **Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei.** *Nature* 216, 160–162.
104. OLATUNDE, A. C., Cornwall, D. H., Roedel, M., & Lamb, T. J. (2022). Mouse Models for **Unravelling Immunology of Blood Stage Malaria.** In *Vaccines* (Vol. 10, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vaccines10091525>
105. PAN-HAMMARSTRÖM, Q., Zhao, Y., & Hammarström, L. (2007). Class Switch Recombination: **A Comparison Between Mouse and Human.** In *Advances in Immunology* (Vol. 93, pp. 1–61).  
[https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)93001-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)93001-6)
106. PATEL, P., Bharti, P. K., Bansal, D., Raman, R. K., Mohapatra, P. K., Sehgal, R., Mahanta, J., Sultan, A. A., & Singh, N. (2017). **Genetic diversity and antibody responses against Plasmodium falciparum vaccine candidate genes from Chhattisgarh, Central India: Implication for vaccine development.** *PLoS ONE*, 12(8).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182674>
107. PAUL, S., Croft, N. P., Purcell, A. W., Tschärke, D. C., Sette, A., Nielsen, M., & Peters, B. (2020). **Benchmarking predictions of MHC class I restricted T cell epitopes in a comprehensively studied model system.** *PLoS Computational Biology*, 16(5).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007757>
108. PEREIRA-SILVA, J. W., Martins-Campos, K. M., Ferreira-Neto, J. V., Lacerda, M. V. G., Pessoa, F. A. C., & Ríos-Velásquez, C. M. (2022). **Amazonian Anopheles with low numbers of oocysts transmit Plasmodium vivax sporozoites during a blood meal.** *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24058-z>

109. PEREZ, M. A. S., Bassani-Sternberg, M., Coukos, G., Gfeller, D., & Zoete, V. (2019). **Analysis of Secondary Structure Biases in Naturally Presented HLA-I Ligands**. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02731>
110. PETRITUS, P. M., & Burns, J. M. (2008). **Suppression of Lethal Plasmodium yoelii Malaria following Protective Immunization Requires Antibody-, IL-4-, and IFN- $\gamma$ -Dependent Responses Induced by Vaccination and/or Challenge Infection**. *The Journal of Immunology*, 180(1), 444–453. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.444>
111. POHL, K., & Cockburn, I. A. (2022). **Innate immunity to malaria: The good, the bad and the unknown**. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.914598>
112. POPOVICI, J., Roesch, C., & Rougeron, V. (2020). **The enigmatic mechanisms by which Plasmodium vivax infects Duffy-negative individuals**. *PLoS Pathogens*, 16(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008258>
113. PRAJAPATI, S. K., Borlon, C., Rovira-Vallbona, E., Gruszczyk, J., Menant, S., Tham, W. H., Kattenberg, J. H., Villasis, E., de Meulenaere, K., Gamboa, D., Vinetz, J., Fujita, R., Xuan, X. N., Urbano Ferreira, M., Niño, C. H., Patarroyo, M. A., Spanakos, G., Kestens, L., Abbeele, J. van den, & Rosanas-Urgell, A. (2019). **Complement Receptor 1 availability on red blood cell surface modulates Plasmodium vivax invasion of human reticulocytes**. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45228-6>
114. RIOS-VELÁSQUEZ, C. M., Martins-Campos, K. M., Simões, R. C., Izzo, T., Santos, E. V. dos, Pessoa, F. A., Lima, J. B., Monteiro, W. M., Secundino, N. F., Lacerda, M. V., Tadei, W. P., & Pimenta, P. F. (2013). **Experimental Plasmodium vivax infection of key Anopheles species from the Brazilian Amazon**. <http://www.malariajournal.com/content/12/1/460>
115. ROGERSON, S. J., Beeson, J. G., Laman, M., Poespoprodjo, J. R., William, T., Simpson, J. A., Price, R. N., Anstey, N., Fowkes, F., McCarthy, J., McCaw, J., Mueller, I., & Gething, P. (2020). **Identifying and combating the impacts of COVID-19 on malaria**. In *BMC Medicine* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01710-x>
116. SAGARA, I., Dicko, A., Ellis, R. D., Fay, M. P., Diawara, S. I., Assadou, M. H., Sissoko, M. S., Kone, M., Diallo, A. I., Saye, R., Guindo, M. A., Kante, O., Niambele, M. B., Miura, K., Mullen, G. E. D., Pierce, M., Martin, L. B., Dolo, A., Diallo, D. A., ... Saul, A. (2009). **A randomized controlled phase 2 trial of the blood stage AMA1-C1/Alhydrogel malaria vaccine in children in Mali**. *Vaccine*, 27(23), 3090–3098. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.014>
117. SCHOFIELD, L., & Mueller, I. (2006). **Clinical Immunity to Malaria**. In *Current Molecular Medicine* (Vol. 6).

118. SEDER, R. A., Lee, †, Chang, -Jah, Enama, M. E., Zephir, K. L., Sarwar, U. N., Gordon, I. J., Holman, L. A., James, E. R., Billingsley, P. F., Gunasekera, A., Richman, A., Chakravarty, S., Manoj, A., Velmurugan, S., Li, M., Ruben, A. J., Li, T., Eappen, A. G., ... Hoffman, S. L. (2013). *Protection Against Malaria by Intravenous Immunization with a Nonreplicating Sporozoite Vaccine*. <https://www.science.org>
119. SELA-CULANG, I., Kunik, V., & Ofran, Y. (2013). **The structural basis of antibody-antigen recognition**. *Frontiers in Immunology*, 4(OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00302>
120. SHEEHY, S. H., Duncan, C. J., Elias, S. C., Choudhary, P., Biswas, S., Halstead, F. D., Collins, K. A., Edwards, N. J., Douglas, A. D., Anagnostou, N. A., Ewer, K. J., Havelock, T., Mahungu, T., Bliss, C. M., Miura, K., Poulton, I. D., Lillie, P. J., Antrobus, R. D., Berrie, E., ... Draper, S. J. (2012). **ChAd63-MVA-vectored blood-stage Malaria vaccines targeting MSP1 and AMA1: Assessment of efficacy against mosquito bite challenge in humans**. *Molecular Therapy*, 20(12), 2355–2368. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.223>
121. SIDDIQUI WA. **An effective immunization of experimental monkeys against a human malaria parasite, Plasmodium falciparum**. *Science*. 1977 Jul 22;197(4301):388-9. doi: 10.1126/science.406671. PMID: 406671.
122. SINGH, S. K., Thrane, S., Chourasia, B. K., Teelen, K., Graumans, W., Stoter, R., van Gemert, G. J., van de Vegte-Bolmer, M. G., Nielsen, M. A., Salanti, A., Sander, A. F., Sauerwein, R. W., Jore, M. M., & Theisen, M. (2019). **Pfs230 and Pfs48/45 fusion proteins elicit strong transmission-blocking antibody responses against plasmodium falciparum**. *Frontiers in Immunology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01256>
123. SOARES, I. F., López-Camacho, C., Rodrigues-da-Silva, R. N., da Silva Matos, A., de Oliveira Baptista, B., Totino, P. R. R., de Souza, R. M., Harrison, K., Gimenez, A. M., de Freitas, E. O., Kim, Y. C., Oliveira-Ferreira, J., Daniel-Ribeiro, C. T., Reyes-Sandoval, A., Pratt-Riccio, L. R., & Lima-Junior, J. da C. (2020). **Recombinant Plasmodium vivax circumsporozoite surface protein allelic variants: antibody recognition by individuals from three communities in the Brazilian Amazon**. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70893-3>
124. SONG, H. K., & Hwang, D. Y. (2017). **Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches**. In *Laboratory Animal Research* (Vol. 33, Issue 2, pp. 119–123). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.5625/lar.2017.33.2.119>
125. SPIELMANN, T., & Beck, H. P. (2000). **Analysis of stage-specific transcription in Plasmodium falciparum reveals a set of genes exclusively transcribed in ring stage parasites**. In *Molecular and Biochemical Parasitology* (Vol. 111). [www.parasitology-online.com](http://www.parasitology-online.com).

126. SPIELMANN, T., David, †, Fergusen, J. P., & Beck, H.-P. (2003). **etramps, a New Plasmodium falciparum Gene Family Coding for Developmentally Regulated and Highly Charged Membrane Proteins Located at the Parasite-Host Cell Interface**. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 1529–1544. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-04>
127. SPIELMANN, T., Gardiner, D. L., Beck, H. P., Trenholme, K. R., & Kemp, D. J. (2006). **Organization of ETRAMPs and EXP-1 at the parasite-host cell interface of malaria parasites**. *Molecular Microbiology*, 59(3), 779–794. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04983.x>
128. SPIELMANN, T., Montagna, G. N., Hecht, L., & Matuschewski, K. (2012). **Molecular make-up of the Plasmodium parasitophorous vacuolar membrane**. In *International Journal of Medical Microbiology* (Vol. 302, Issues 4–5, pp. 179–186). <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.07.011>
129. SU, X.-Z., Lane, K. D., Xia, L., Sá, J. M., & Wellems, T. E. (2019). **Plasmodium Genomics and Genetics: New Insights into Malaria Pathogenesis, Drug Resistance, Epidemiology, and Evolution**. <https://doi.org/10.1128/cmr.00019-19>
130. SULTAN, A. A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K. J. H., & Crisanti, A. (1997). **TRAP Is Necessary for Gliding Motility and Infectivity of Plasmodium Sporozoites micronemes**. Invasive stages of Apicomplexa also exhibit gliding motility, a form of substrate-dependent cell. In *Cell* (Vol. 90).
131. TACHIBANA, M., Miura, K., Takashima, E., Morita, M., Nagaoka, H., Zhou, L., Long, C. A., Richter King, C., Torii, M., Tsuboi, T., & Ishino, T. (2019). **Identification of domains within Pfs230 that elicit transmission blocking antibody responses**. *Vaccine*, 37(13), 1799–1806. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.021>
132. TACHIBANA, M., Takashima, E., Torii, M., Wu, Y., Sattabongkot, J., & Tsuboi, T. (2025). **Advances in transmission-blocking vaccines against Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax**. *Expert Review of Vaccines*. <https://doi.org/10.1080/14760584.2025.2517720>
133. TIONO, A. B., Plieskatt, J. L., Ouedraogo, A., Soulama, B. I., Miura, K., Bougouma, E. C., Naghizadeh, M., Barry, A., Yaro, J. B. B., Ezinmegnon, S., Henry, N., Ofori, E. A., Adu, B., Singh, S. K., Konkobo, A., Bengtsson, K. L., Diarra, A., Carnrot, C., Reimer, J. M., ... Theisen, M. (2024). **A randomized first-in-human phase I trial of differentially adjuvanted Pfs48/45 malaria vaccines in Burkinabé adults**. *Journal of Clinical Investigation*, 134(7). <https://doi.org/10.1172/JCI175707>
134. TOKITA, S., Kanaseki, T., & Torigoe, T. (2024). **Neoantigen prioritization based on antigen processing and presentation**. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1487378>
135. UHL, L. F. K., Cai, H., Oram, S. L., Mahale, J. N., MacLean, A. J., Mazet, J. M., Piccirilli, T., He, A. J., Lau, D., Elliott, T., & Gerard, A. (2023). **Interferon-γ**

- couples CD8+ T cell avidity and differentiation during infection.** *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42455-4>
136. ULLAND, T. K., Jain, N., Hornick, E. E., Elliott, E. I., Clay, G. M., Sadler, J. J., Mills, K. A. M., Janowski, A. M., Volk, A. P. D., Wang, K., Legge, K. L., Gakhar, L., Bourdi, M., Ferguson, P. J., Wilson, M. E., Cassel, S. L., & Sutterwala, F. S. (2016). **Nlrp12 mutation causes C57BL/6J strain-specific defect in neutrophil recruitment.** *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13180>
137. VAN AALST, S., Ludwig, I. S., van der Zee, R., van Eden, W., & Broere, F. (2017). **Bystander activation of irrelevant CD4+ T cells following antigen-specific vaccination occurs in the presence and absence of adjuvant.** *PLoS ONE*, 12(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177365>
138. VAN DER PLOEG, K., Kiro Singh, A. S., Mori, D. A. M., Chakraborty, S., Hu, Z., Sievers, B. L., Jacobson, K. B., Bonilla, H., Parsonnet, J., Andrews, J. R., Press, K. D., Ty, M. C., Ruiz-Betancourt, D. R., de la Parte, L., Tan, G. S., Blish, C. A., Takahashi, S., Rodriguez-Barraquer, I., Greenhouse, B., ... Jagannathan, P. (2022). **TNF- $\alpha$ + CD4+ T cells dominate the SARS-CoV-2 specific T cell response in COVID-19 outpatients and are associated with durable antibodies.** *Cell Reports Medicine*, 3(6). <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100640>
139. WAGNER, S., Baarst, L., Ytterberg, A. J., Klussmerer, A., Wagner, C. S., Nord, O., Nygren, P. Å., van Wijks, K. J., & de Gier, J. W. (2007). **Consequences of membrane protein overexpression in Escherichia coli.** *Molecular and Cellular Proteomics*, 6(9), 1527–1550. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600431-MCP200>
140. WEISS, D. J., Dzianach, P. A., Saddler, A., Lubinda, J., Browne, A., McPhail, M., Rumisha, S. F., Sanna, F., Gelaw, Y., Kiss, J. B., Hafsia, S., Jayaseelen, R., Baggen, H. S., Amratia, P., Bertozzi-Villa, A., Nesbit, O., Whisnant, J., Battle, K. E., Nguyen, M., ... Gething, P. W. (2025). **Mapping the global prevalence, incidence, and mortality of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria, 2000–22: a spatial and temporal modelling study.** *The Lancet*, 405(10483), 979–990. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(25\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(25)00038-8)
141. WEISS, G. E., Crompton, P. D., Li, S., Walsh, L. A., Moir, S., Traore, B., Kayentao, K., Ongoiba, A., Doumbo, O. K., & Pierce, S. K. (2009). **Atypical Memory B Cells Are Greatly Expanded in Individuals Living in a Malaria-Endemic Area.** *The Journal of Immunology*, 183(3), 2176–2182. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901297>
142. WEISS, G. E., Gilson, P. R., Taechalertpaisarn, T., Tham, W. H., de Jong, N. W. M., Harvey, K. L., Fowkes, F. J. I., Barlow, P. N., Rayner, J. C., Wright, G. J., Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2015). **Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes.** *PLoS Pathogens*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004670>

143. WHITE, N. J., & Imwong, M. (2012). **Relapse**. In *Advances in Parasitology* (Vol. 80, pp. 113–150). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397900-1.00002-5>
144. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO review of malaria vaccine clinical development**. Atualizado em: 04/2025. Disponível em:  
<https://www.who.int/observatories/global-observatory-on-health-research-and-development/monitoring/who-review-of-malaria-vaccine-clinical-development#what-you-see>
145. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2024: addressing inequity in the global malaria response**. Geneva, 2024.  
Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
146. WU, Y., Ellis, R. D., Shaffer, D., Fontes, E., Malkin, E. M., Mahanty, S., Fay, M. P., Narum, D., Rausch, K., Miles, A. P., Aebig, J., Orcutt, A., Muratova, O., Song, G., Lambert, L., Zhu, D., Miura, K., Long, C., Saul, A., ... Durbin, A. P. (2008). **Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs 25 formulated with montanide ISA 51**. *PLoS ONE*, 3(7).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002636>
147. ZAIDI, I., Diallo, H., Conteh, S., Robbins, Y., Kolasny, J., Orr-Gonzalez, S., Carter, D., Butler, B., Lambert, L., Brickley, E., Morrison, R., Sissoko, M., Healy, S. A., Sim, B. K. L., Doumbo, O. K., Hoffman, S. L., & Duffy, P. E. (2017).  **$\gamma\delta$  T Cells Are Required for the Induction of Sterile Immunity during Irradiated Sporozoite Vaccinations**. *The Journal of Immunology*, 199(11), 3781–3788. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700314>
148. ZHAO, J., Bhanot, P., Hu, J., & Wang, Q. (2016). **A comprehensive analysis of Plasmodium circumsporozoite protein binding to hepatocytes**. *PLoS ONE*, 11(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161607>
149. ZHAO, T., Cai, Y., Jiang, Y., He, X., Wei, Y., Yu, Y., & Tian, X. (2023). **Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms**. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 8, Issue 1). Springer Nature.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-023-01557-7>