

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO DE
VARIANTES POLIMÓRFICAS DA PROTEÍNA DE
LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DUFFY (DBP) DO
Plasmodium vivax EM MODELOS MURINOS**

ROBERTA BOZI DA SILVA

ORIENTADOR: Dr. Oscar Bruña-Romero

BELO HORIZONTE

Fevereiro – 2013

ROBERTA BOZI DA SILVA

**ANÁLISE DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO DE
VARIANTES POLIMÓRFICAS DA PROTEÍNA DE
LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DUFFY (DBP) DO
Plasmodium vivax EM MODELOS MURINOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós- Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

ORIENTADO: Roberta Bozi da Silva

ORIENTADOR: Dr. Oscar Bruña-Romero

BELO HORIZONTE

Fevereiro – 2013

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus, que ilumina e fortalece a minha vida, me guiando sempre pelo melhor caminho.

Aos meus pais, José Roberto e Sonia, pelo carinho, paciência e confiança, que mesmo à distância foram fundamentais nesta jornada.

Ao Prof. Dr. Oscar Bruna-Romero, pela oportunidade, orientação e disponibilidade em dividir seus conhecimentos.

Aos meus amigos do LAR, pela cooperação e amizade. Chamá-los de amigos é muito pouco, pois em vocês encontrei uma nova família... Obrigada por tudo!

A toda minha família e amigos, pela torcida e incentivo, por entenderem minhas ausências.

Aos professores, pelos ensinamentos e contribuição à minha formação, e aos funcionários do programa de Pós-Graduação, pela atenção e suporte aos alunos. Agradeço à coordenação do programa por entender minhas dificuldades.

Ao INCTv, pela minha bolsa de pesquisa.

E, por último, agradeço ao Ronie, meu marido e meu amor, pelo incentivo incondicional, pela paciência e pela força nos momentos difíceis. Sem o seu incentivo eu não teria nem começado... Este trabalho é seu!

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
Introdução.....	3
1.1 A malária no mundo.....	3
1.2 Ciclo biológico	4
1.3 Principais antígenos vacinais.....	7
1.4 A proteína DBP (<i>Duffy Binding Protein</i>)	8
1.5 Adenovírus como vetores vacinais	12
1.6 Adjuvantes vacinais	12
1.7 Protocolos <i>prime-boost</i> (dose-reforço) heterólogos	13
Relevância e Justificativa da Realização do Projeto	15
Objetivos.....	16
1.8 Objetivo geral	16
1.9 Objetivos específicos.....	16
Metodologia	17
1.10 Clonagem e expressão das sequências polimórficas de PvDBPII	17
1.11 Estratégia de clonagem para a construção dos adenovírus recombinantes expressando PvDBPII-MT e PvDBPII-PA.....	19
1.12 Indução da síntese e purificação das proteínas expressadas em <i>E. coli</i> M15	21
1.13 Caracterização das proteínas em SDS-PAGE.....	23
1.14 Vacinação dos animais experimentais	23
1.14.1 Esquema vacinal da linhagem Swiss	24
1.14.2 Esquema vacinal da linhagem BALB/c	25

1.15	Avaliação da resposta imune	26
1.15.1	ELISA para análise dos anticorpos produzidos.....	26
1.15.2	Inibição da ligação ao eritrócito	26
1.16	Estudo comparativo da imunogenicidade dos polimorfismos da PvDBP, em formulações isoladas/associadas e em formulações multi-antígenos.....	27
	Resultados.....	28
1.17	Avaliação da resposta imune	28
1.17.1	Análise da resposta humoral após imunização com os candidatos vacinais...	28
1.17.2	Inibição da ligação ao eritrócito	43
	Discussão.....	46
	Conclusão.....	49
	Perspectivas.....	50
	Referências Bibliográficas	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Países e territórios afetados pela malária.....	3
Figura 2. Risco de transmissão de malária no Brasil em 2010.....	4
Figura 3. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	6
Figura 4. Alguns antígenos candidatos a vacinas contra a malária presentes nos estágios pré-eritrocítico, sanguíneo e sexual do desenvolvimento do parasito.....	8
Figura 5. Representação esquemática da estrutura e domínios da DBP.....	9
Figura 6. Representação dos polimorfismos encontrados nos pacientes da área endêmica brasileira.....	11
Figura 7. Principais eventos relacionados à aquisição de imunidade quando utiliza-se um protocolo <i>prime-boost</i> heterólogo.....	14
Figura 8. Representação esquemática da estratégia de clonagem da PvDBPII usada neste estudo.....	18
Figura 9. Expressão de PvDBPII em bactérias após indução com IPTG e purificação das proteínas expressadas.....	22
Figura 10. Imunogenicidade dos polimorfismos da PvDBPII em camundongos Swiss.....	29
Figura 11. Títulos de IgG total em camundongos BALB/c 15 dias após a primeira dose vacinal.....	33
Figura 12. Títulos de anticorpos 15 dias após a segunda dose vacinal em camundongos da linhagem BALB/c.....	35
Figura 13. Títulos de anticorpos 15 dias após a terceira dose vacinal (reforço com adenovírus) em camundongos da linhagem BALB/c.....	37
Figura 14. Títulos de anticorpos 6 meses após a terceira dose vacinal (reforço com adenovírus) em camundongos da linhagem BALB/c.....	39
Figura 15. Comparação dos títulos de IgG total entre os grupos vacinais deste estudo e do estudo com as quatro proteínas.....	42
Figura 16. Ensaio de inibição da ligação ao eritrócito.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Adjuvantes licenciados até o momento para uso humano.....	13
Tabela 2. Composição vacinal para camundongos linhagem Swiss – D1 _(P) e D.....	24
Tabela 3. Composição vacinal para camundongos linhagem Swiss – D3 _(Ad)	24
Tabela 4. Composição vacinal para camundongos linhagem BALB/c – D1 _(P) e D2 _(P)	25
Tabela 5. Composição vacinal para camundongos linhagem BALB/c – D3 _(Ad)	25
Tabela 6. Resumo dos títulos de IgG total em camundongos da linhagem Swiss em placas sensibilizadas com as duas variantes polimórficas.....	31
Tabela 7. Resumo dos títulos de IgG total em camundongos da linhagem BALB/c em placas sensibilizadas com as duas variantes polimórficas.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

aa – Aminoácido

Ac – Anticorpo

AM – Amazonas

AMA-1. Antígeno 1 de membrana apical (*Apical Membrane Antigen 1*)

APC – Célula apresentadora de antígeno

AS01B – Sistema adjuvante 01

AS04 – Sistema adjuvante 04

CFSE – *Carboxyfluorescein- succinimidyl-ester*

CMV – Citomegalovírus

CS - Proteína circumsporozoíta de superfície dos esporozoítos de *Plasmodium sp.*

D1_(P) – Primeira dose vacinal com proteína recombinante

D2_(P) – Segunda dose vacinal/reforço com proteína recombinante

D3_(Ad) – Terceira dose vacinal/reforço com adenovírus recombinante

DARC - Antígeno do grupo sanguíneo Duffy e receptor para quimiocinas (*Duffy Antigen Receptor for chemokines*)

DBL - *Duffy binding-like*

DBP - Proteína de ligação ao antígeno Duffy (*Duffy binding protein*)

DMEM – *Dullbeco's Modified Eagle Medium*

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EBP- proteína de ligação ao eritrócito (*Erythrocyte-binding protein*)

ELISA - Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

GFP - Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

HAd5 - Adenovírus humano do tipo 5. (*Human adenovirus 5*)

HBV – Vírus da hepatite B

HPV – Papilomavírus humano

IFN γ - Interferon-gamma

IgG - Imunoglobulina G

IL – Interleucina

IPTG - Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

kDa – Kilodalton

LB - Meio Luria-Bertani

M – molar

MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal (*Major histocompatibility complex*)

mL - Mililitro
mM - Milimolar
MPLA – Monofosforil lipídeo A
MSP-1 - Proteína 1 de superfície do merozoíto (*Merozoite Surface Protein-1*)
MT – Mato Grosso
NK – Células Natural Killer
nm – Nanômetro
° C - Graus Celsius
p.f.u. - Unidades formadoras de placa de lise
p/v – Partes por volume
PA – Pará
PBS - Salina tamponada com fosfato (*Phosphate-buffered saline*)
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
pH - Potencial Hidrogeniônico
q.s.p - Quantidade suficiente para
rpm – rotações por minuto
RPMI – Meio *Roswell Park Memorial Institute*
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
Th1 - Células T auxiliares do tipo 1
Th2 - Células T auxiliares do tipo 2
TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
V – Volts
v/v – Volume por volume
WHO - Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)
 μ g - Micrograma
 μ L - Microlitro
 μ M – Micromolar

RESUMO

A malária é uma doença parasitária que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, e das espécies de protozoários causadores da malária humana, o *Plasmodium vivax* é a espécie que apresenta maior distribuição mundial. Nesta espécie, para que o merozoíto invada o eritrócito são necessárias interações específicas envolvendo proteínas do parasito e receptores presentes na superfície da célula hospedeira, sendo essa invasão mediada pela interação entre a proteína de ligação ao antígeno Duffy (*Duffy Binding Protein* - PvDBP) e seu receptor na superfície dos eritrócitos Duffy-positivos. Na área endêmica brasileira, os polimorfismos MT e PA mostraram-se responsáveis pela grande maioria das infecções humanas, tornando-se alvos vacinais interessantes para este estudo, os quais foram clonados e expressados como proteínas recombinantes e também conjugados a adenovírus recombinantes, sendo utilizados em protocolos de imunização dose/reforço em camundongos. A análise dos resultados obtidos mostrou que os polimorfismos estudados são capazes de estimular o sistema imune fortemente, demonstrando que a DBP do *P. vivax* é um alvo vacinal promissor, juntamente com o adjuvante vacinal Montanide ISA 720 e adenovírus humano tipo 5, promovendo a produção de altos títulos de anticorpos funcionais. Foi possível verificar também uma ação sinérgica entre os dois polimorfismos estudados na manutenção dos títulos de anticorpos meses após a imunização dos camundongos.

ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease that affects millions of people worldwide, and species of protozoa that cause human malaria, *Plasmodium vivax* is the species that has the highest worldwide distribution. In this species, so that the merozoite invades erythrocytes are required specific interactions involving proteins of the parasite and receptors present on the host cell surface, and this invasion mediated by the interaction between the binding protein to Duffy antigen (Duffy Binding Protein - PvDBP) and its receptor on the surface of Duffy positive erythrocytes. In endemic areas of Brazil, MT and PA polymorphisms were shown to be responsible for the vast majority of human infections, becoming interesting targets for vaccine in this study, which were cloned and expressed as recombinant proteins and also conjugated to recombinant adenoviruses, being used in immunization protocols prime/boost in mice. The results obtained showed that the polymorphisms are able to strongly stimulate the immune system, demonstrating that DBP of *P. vivax* is a promising vaccination target, with the adjuvant Montanide ISA 720 and human adenovirus type 5, promoting the production of high titers of functional antibodies. It was also verified a synergistic action between the two polymorphisms in the maintenance of antibody titers months after mice immunization.

Introdução

1.1 A malária no mundo

A malária é uma doença parasitária que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, e segundo dados recentes da Organização Mundial da Saúde (2012), ocorre em 99 países e uma estimativa de 3,3 bilhões de pessoas estavam sob risco de contrair a doença em 2010 (figura 1). Aproximadamente 86% das mortes provocadas por malária ocorrem em crianças menores de 5 anos, a maioria na África sub-saariana. A incidência estimada de malária diminuiu cerca de 17% globalmente de 2000 a 2010 e a mortalidade proporcional diminuiu 26% devido a ações de prevenção e tratamento. Ainda assim, o número de casos de malária estimado em 2010 foi de 216 milhões, resultando em mais de 300.000 mortes em decorrência da doença (WHO 2012).

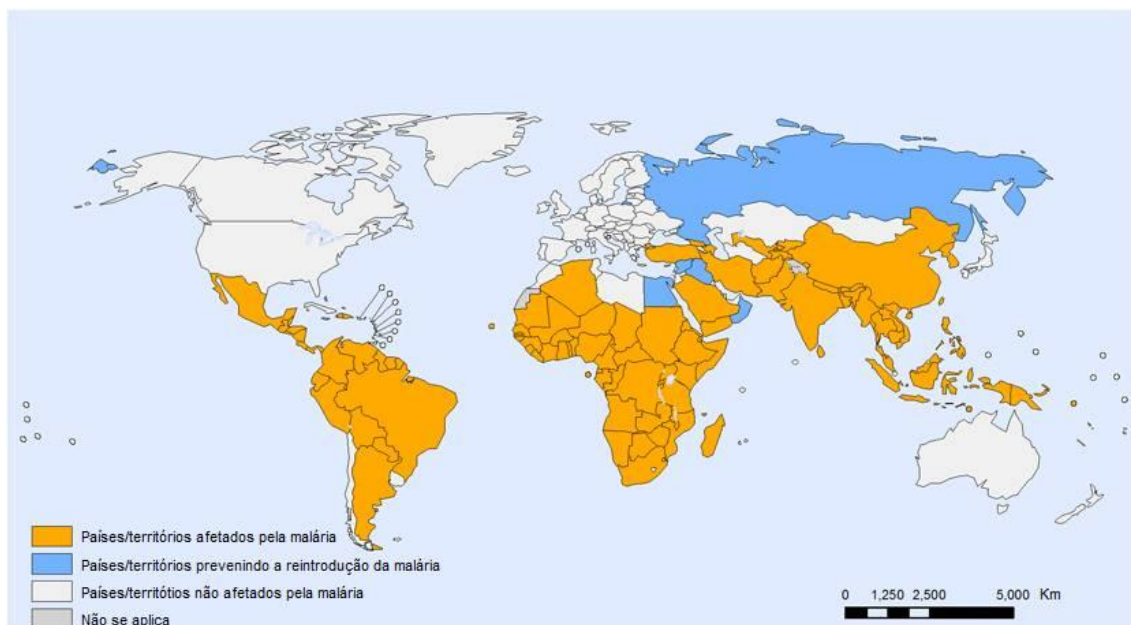


Figura 1. Países e territórios afetados pela malária. Em laranja estão os países ou territórios afetados pela doença; em azul, os que já eliminaram a doença e agora previnem a sua reintrodução; em branco estão os países ou territórios não afetados pela doença. Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2012.

A malária é transmitida ao homem através da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* (Carlton et al. 2008; Enomoto et al. 2012), as quais inoculam parasitos do gênero

Plasmodium no tecido epitelial e menos comumente direto na corrente sanguínea do hospedeiro. Das espécies de protozoários causadores da malária humana (*Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malarie* e *Plasmodium knowles*), o *P. vivax* é a espécie que apresenta maior distribuição mundial, sendo responsável por mais de 50% dos casos humanos diagnosticados fora da África (Carter and Mendis 2002; Mendis et al. 2001). No Brasil, *P. vivax* é responsável por mais de 80% dos casos de malária (Oliveira-Ferreira et al. 2010) e, apesar de *P. falciparum* causar as formas mais graves da doença, *P. vivax* provoca maior morbidade, visto que os pacientes podem ter várias recaídas devido a formas latentes do parasito que se desenvolvem durante o seu ciclo de vida (Carter and Mendis 2002; Hulden 2011).

No Brasil nove estados são endêmicos para a malária, sendo que 49 milhões de pessoas estavam em áreas de risco de transmissão da doença no ano de 2010 (figura 2), sendo confirmados 330.000 casos, com 5.000 hospitalizações (13% em crianças menores de 5 anos) e 72 óbitos neste mesmo ano.

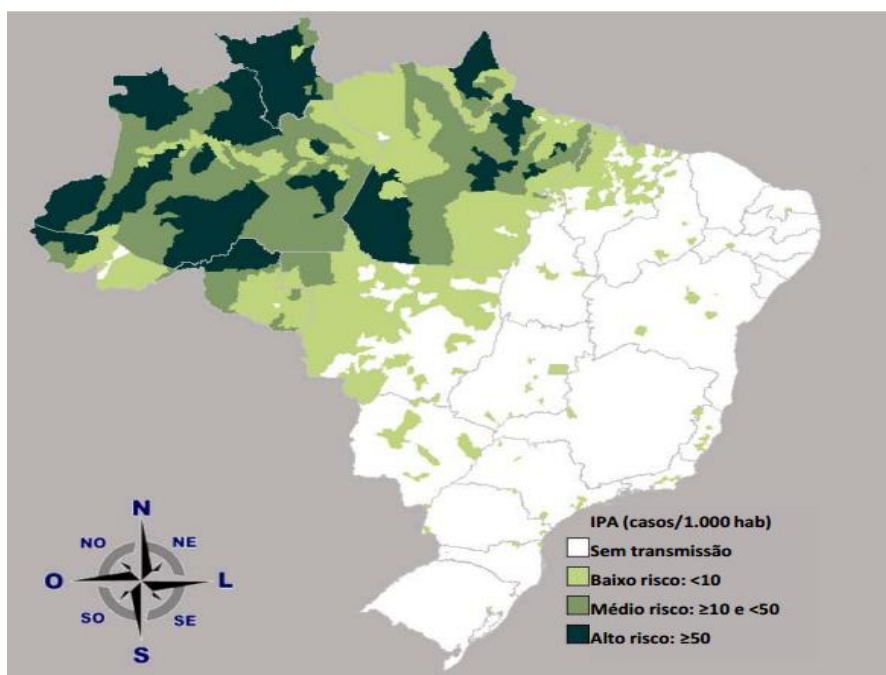


Figura 2. Risco de transmissão de malária no Brasil em 2010. Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2011.

1.2 Ciclo biológico

O ciclo biológico dos parasitos da malária humana compreende duas fases: uma fase de reprodução sexuada em fêmeas do mosquito e outra de reprodução assexuada que se desenvolve no hospedeiro vertebrado (figura 2). A transmissão da malária ao hospedeiro

vertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor, onde os esporozoítos presentes nas glândulas salivares do anofelino são depositados no tecido subcutâneo do hospedeiro, podendo aí permanecer por várias horas até encontrar um vaso sanguíneo (Yamauchi et al. 2007). Após atingirem o sistema circulatório estes esporozoítos migram para o fígado onde infectam os hepatócitos. Este processo resulta na formação de um vacúolo parasitóforo bem delimitado onde os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos que, após sucessivas divisões por esquizogonia, formam os esquizontes. Após alguns dias, os esquizontes maduros liberam os merozoítos por um processo de brotamento de vesículas denominadas merosomos (Amino et al. 2006a; Amino et al. 2006b). Os merosomos, repletos de parasitos, desprendem-se dos hepatócitos infectados para o lúmen dos capilares sinusóides do fígado (Sturm et al. 2006), onde finalmente os merozoítos são liberados e invadem os eritrócitos, dando início à fase sanguínea da doença. Nas infecções provocadas por *P. vivax* são geradas formas infectantes latentes, os hipnozoítos, que tornam-se reservatórios do parasito no organismo infectado, sendo responsáveis pelas recorrentes recaídas da doença (Carter and Mendis 2002; Hulden 2011). Cada merozoíto invade um eritrócito e se divide mitoticamente para formar um esquizonte eritrocítico (Wykes et al. 2011), o qual pode conter dezenas de merozoítos-filhos aptos a infectar novos eritrócitos. Este ciclo de sucessivas invasões de novos eritrócitos pelos merozoítos-filhos liberados pelos eritrócitos infectados é o responsável pelas manifestações clínicas da doença.. Após algumas gerações de desenvolvimento de merozoítos sanguíneos, alguns parasitos sofrem diferenciação em estágios sexuais, dando origem aos gametócitos masculino e feminino, os quais serão ingeridos pelo mosquito vetor durante o repasto sanguíneo, dando continuidade ao ciclo do parasito no aparelho digestivo do mosquito (Choe et al. 2005), onde os gametas masculino e feminino se fundem para formar um zigoto móvel denominado oocineto, que atravessa a parede intestinal do mosquito e se aloja na membrana basal, desenvolvendo-se em oocisto. No interior do oocisto ocorre diferenciação e divisão celular, culminando com a produção de esporozoítos, os quais são liberados na hemocele, onde parte deles migrará para as glândulas salivares do mosquito para dar início a um novo ciclo no hospedeiro vertebrado a partir de nova picada.

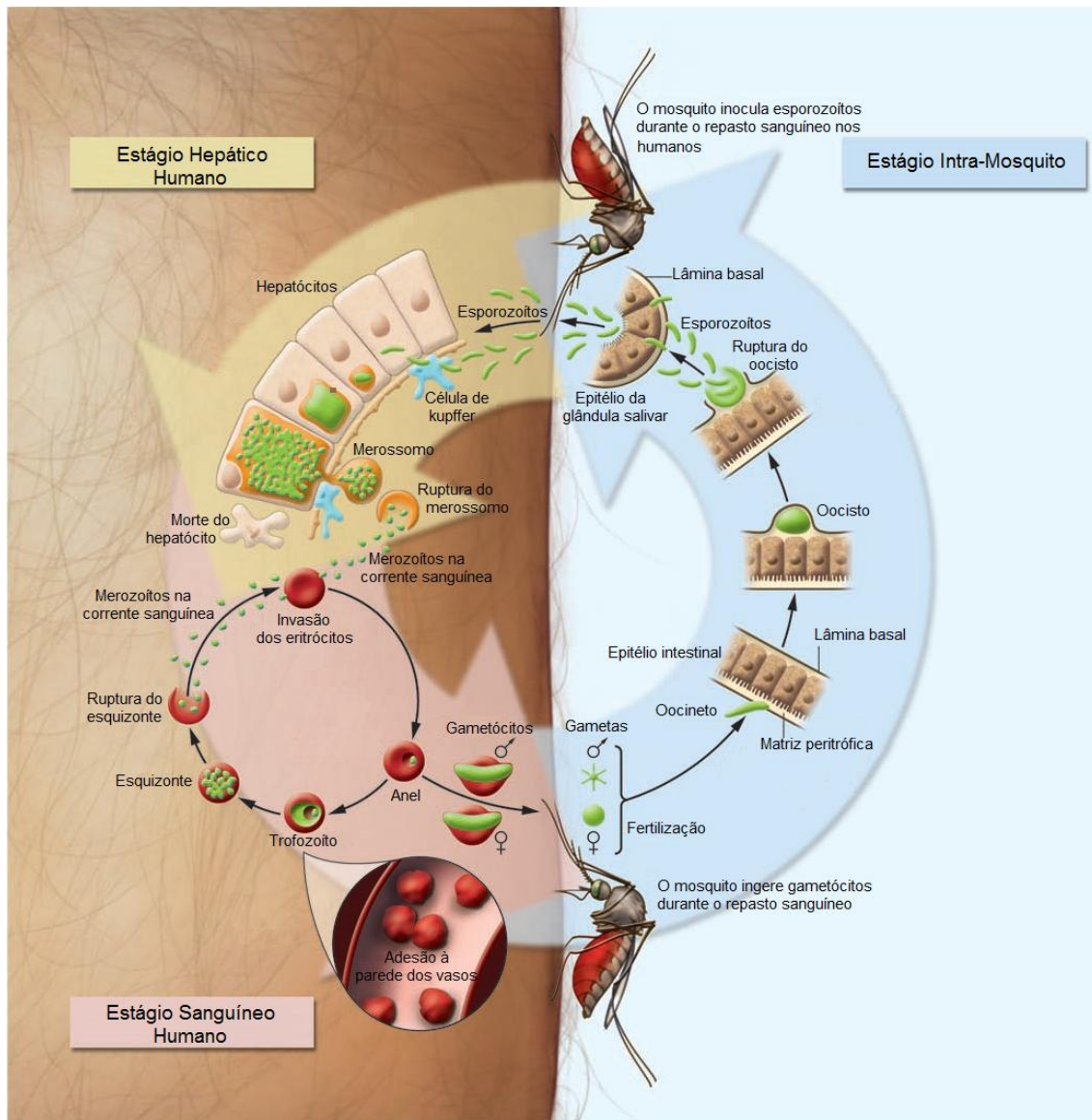


Figura 3. Ciclo de vida do *Plasmodium*. Os esporozoítos presentes nas glândulas salivares do mosquito são depositados no tecido subcutâneo do hospedeiro, atingindo depois o sistema circulatório, migrando para o fígado e infectando os hepatócitos, onde se diferenciam em trofozoítos, formando esquizontes. Após alguns dias, os esquizontes maduros liberam os merozoítos para o lúmen dos capilares sinusóides, onde invadem os eritrócitos, dando início à fase sanguínea da doença. Após algumas gerações de desenvolvimento de merozoítos sanguíneos, alguns parasitos sofrem diferenciação, dando origem aos gametócitos masculino e feminino, os quais serão ingeridos pelo mosquito vetor durante o repasto sanguíneo, dando continuidade ao ciclo do parasito no aparelho digestivo do mosquito, onde estes gametas se fundem para formar um zigoto móvel denominado oocineto, que atravessa a parede intestinal do mosquito e se aloja na membrana basal, desenvolvendo-se em oocisto, dentro do qual ocorre diferenciação e divisão celular, culminando com a produção de esporozoítos, os quais são liberados na hemocele, onde parte deles migrará para as glândulas salivares do mosquito para dar início a um novo ciclo. Modificado de Greenwood *et al.* 2008.

1.3 Principais antígenos vacinais

A procura por uma vacina efetiva no combate à malária mobiliza a comunidade científica há muitos anos, sendo que desde o início do século passado já vêm sendo conduzidos estudos com roedores e aves. Contudo, o mais significativo avanço nesta área ocorreu na década de 1960, quando Nussenzweig e colaboradores (Nussenzweig et al. 1967) conseguiram estimular imunidade efetiva em roedores após a inoculação de esporozoítos irradiados. Estudos subsequentes identificaram a proteína circunsporozoíta (CSP), uma proteína de superfície do esporozoíto, como um importante alvo para anticorpos (Aikawa et al. 1981; Kumar et al. 2006; Yoshida et al. 1980; Yoshida et al. 1981). Nos anos 1970, Clyde e colaboradores demonstraram em humanos que era possível obter proteção contra infecção após múltiplas inoculações de esporozoítos irradiados (Clyde 1975). A partir da década de 1980, o principal foco passou a ser a identificação de diferentes antígenos de superfície do esporozoíto como potenciais alvos vacinais (Nussenzweig and Long 1994), visto que a utilização de esporozoítos irradiados é inviável para a produção de uma vacina em larga escala.

As principais características desejáveis em uma vacina contra malária devem incluir um bom perfil de segurança juntamente com uma alta eficácia contra a infecção e a doença.

Embora grandes esforços tenham sido dedicados a encontrar uma vacina contra *P. falciparum*, o qual é responsável pela forma mais grave da doença, há um crescente interesse em desenvolver uma vacina contra *P. vivax*, o plasmódio de maior distribuição mundial. Porém, há poucos alvos vacinais potenciais identificados para esta espécie, quando comparada a *P. falciparum*, sendo os principais: proteína CS, SSD2(P), DBP, MSD1(P), AMA1, D2(P)5 e D2(P)8. No momento existem muitos testes pré-clínicos sendo realizados com proteínas de *P. vivax*, porém poucos chegaram à fase I dos ensaios clínicos, sendo o mais adiantado o de uma candidata à vacina baseada na proteína CS com o adjuvante AS01B (Garcia-Basteiro et al. 2012). A figura 3 destaca alguns dos antígenos do parasito utilizados em estudos de vacinas de subunidades até o momento, onde cada estágio da doença apresenta antígenos específicos, sendo que alguns deles também são espécie-específicos.

Michon e colaboradores (2000) verificaram que a população de áreas endêmicas para malária vivax adquire anticorpos capazes de bloquear a ligação da proteína DBP do parasito ao seu receptor na superfície dos eritrócitos, inviabilizando a continuidade do ciclo da doença no hospedeiro. O presente estudo baseia-se em duas variantes polimórficas da proteína de ligação ao antígeno Duffy (DBP) do *P. vivax*, utilizando-as em formulações

contendo apenas uma delas ou as duas variantes juntas. Estas formulações propostas também são comparadas a formulações contendo estas duas variantes juntamente com as proteínas AMA-1 (antígeno da membrana apical) e MSP-1 (proteína de superfície do merozoíto).

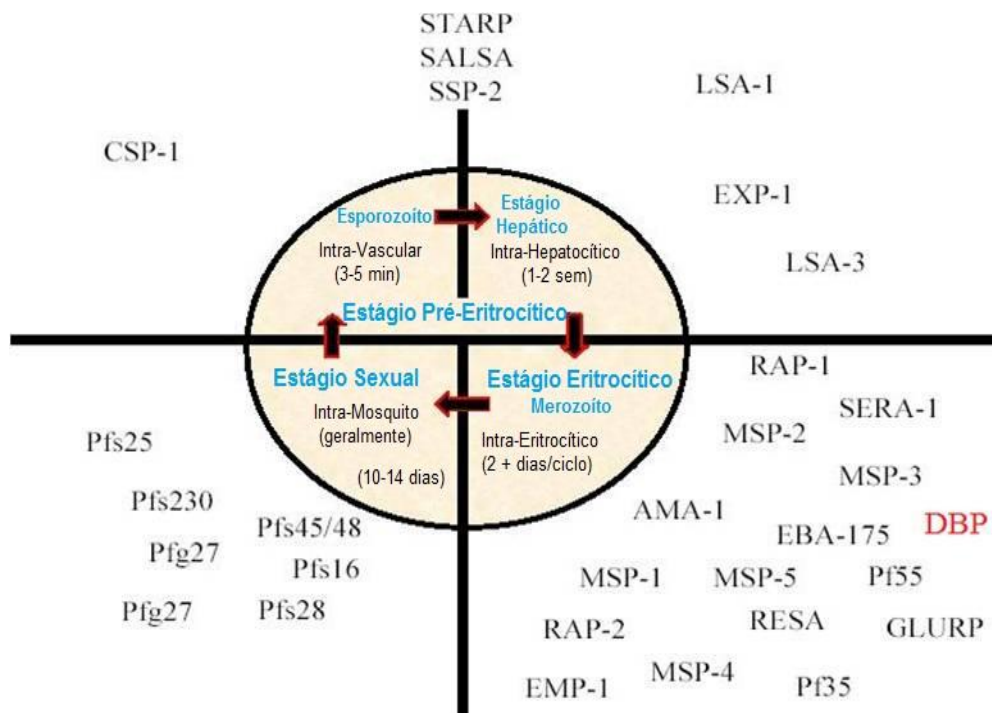


Figura 4. Alguns antígenos candidatos a vacinas contra a malária presentes nos estágios pré-eritrocítico, sanguíneo e sexual do desenvolvimento do parasito. A proteína de ligação ao antígeno Duffy do *P. vivax*, alvo deste estudo, encontra-se destacada em vermelho. Modificado de Dubovsky *et al* (2002).

1.4 A proteína DBP (*Duffy Binding Protein*)

Para que o merozoíto invada o eritrócito são necessárias interações específicas envolvendo proteínas do parasito e receptores presentes na superfície da célula hospedeira (Adams et al. 1992; Gaur et al. 2004; VanBuskirk et al. 2004). Na infecção provocada pelo *P. vivax* essa invasão é mediada principalmente pela interação entre a proteína de ligação ao antígeno Duffy (*Duffy Binding Protein* - PvDBP) e seu receptor na superfície dos eritrócitos Duffy-positivos, (Adams et al. 1992; Carter and Mendis 2002). O receptor para antígeno Duffy dos eritrócitos também é conhecido como receptor DARC para quimiocinas (*DARC, Duffy Antigen/Receptor for Chemokines*). DARC é uma proteína transmembrana com sete domínios que se liga a várias quimiocinas inflamatórias, provavelmente retirando-as do sangue (Choe et al. 2005).

A PvDBP é uma proteína de 140 kDa pertencente a uma família denominada DBL (*Duffy Binding Like*) de proteínas de ligação ao eritrócito (EBP-*Erythrocyte Binding Proteins*), localizada nos micronemas dos merozoítos. Essa superfamília de proteínas DBL-EBP possui como principal característica duas regiões conservadas ricas em cisteína, um domínio aminoterminal (região II), já identificado como a principal região de interação entre a proteína e o receptor DARC dos eritrócitos, e um domínio carboxiterminal (região VI). Os sítios de ligação mais importantes da PvDBPII estão localizados numa sequência de 170 aminoácidos compreendida entre as cisteínas 4 e 7 (figura 5). Embora os resíduos de cisteína sejam conservados nessa região, outros aminoácidos demonstraram ser altamente polimórficos, o que parece alterar o reconhecimento da DBP pelo sistema imune, sem alterar sua capacidade de ligação ao receptor DARC dos eritrócitos (Gosi et al. 2008; VanBuskirk et al. 2004).

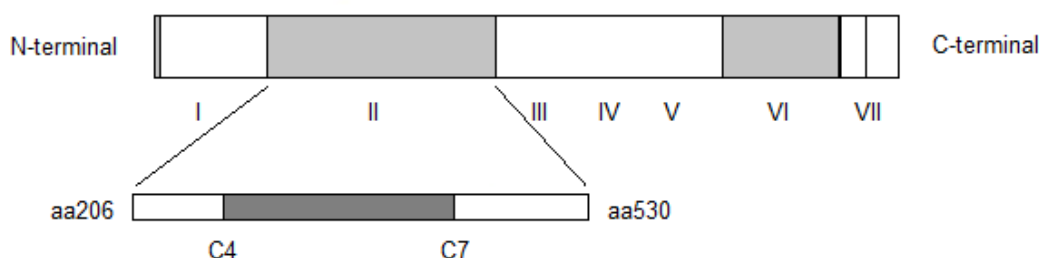


Figura 5. Representação esquemática da estrutura e domínios da DBP. Há seis domínios extracelulares e uma sétima região que consiste de um domínio transmembrana e um citoplasmático. O sítio de reconhecimento pelo receptor DARC encontra-se na região II, entre as cisteínas C4 e C7. Baseado em VanBuskirk *et al.* (2004).

Alguns desses resíduos polimórficos ocorrem frequentemente em associação, particularmente os resíduos 417, 437 e 503, como descrito por Sousa e colaboradores (2006) ao estudar os polimorfismos da PvDBP na região Amazônica brasileira, sugerindo que eles possam ser um epítipo descontínuo na DBP, demonstrando ser o principal alvo para a atuação de anticorpos. No estudo de Sousa e colaboradores (2006) da área endêmica brasileira, as três sequências polimórficas encontradas foram denominadas a partir do estado de origem dos pacientes: AM, MT e PA (figura 6). Essas regiões foram identificadas pela Dra. Taís Nóbrega de Sousa do Laboratório de Malária do Instituto de Pesquisas René-Rachou (Belo Horizonte) e utilizadas por nosso grupo para dar início a esse estudo (Casteluber 2010).

A sequência de aminoácidos referente ao polimorfismo AM difere de PA apenas no aminoácido 503 e não apresenta homologia com MT em nenhuma das três posições (417, 437 e 503), não parecendo ser relevante para a construção de uma vacina. Portanto, nossos estudos priorizaram os polimorfismos MT e PA devido a sua variação em conjunto e possível complementaridade, que parece ser mais importante para a formação de epítomos, fazendo da PvDBPII um alvo vacinal extremamente promissor, visto que estudos anteriores utilizando esta região da DBP (porém sem especificidade quanto a variações polimórficas) demonstraram produção de anticorpos funcionais (Yazdani et al. 2004b).

221 231 241 251 261 271 281 291 301 311 321 331 341 351

SRL1 GGNPYDIDRDKTISSAIINHHFLQNTYBONCHYKKGGEKRDQDCHTKQDVCIPORRYQLCMKELTNLVNNTOTNFHROITFRALYLKRRCLYDHRHTEGOLLULNRYRNYKDFCKDIPASLGFQFGIING
PA GGNPYDIDRDKTISSAIINHHFLQNTYBONCHYKKGGEKRDQDCHTKQDVCIPORRYQLCMKELTNLVNNTOTNFHROITFRALYLKRRCLYDHRHTEGOLLULNRYRNYKDFCKDIPASLGFQFGIING
AM GGNPYDIDRDKTISSAIINHHFLQNTYBONCHYKKGGEKRDQDCHTKQDVCIPORRYQLCMKELTNLVNNTOTNFHROITFRALYLKRRCLYDHRHTEGOLLULNRYRNYKDFCKDIPASLGFQFGIING
MT GGNPYDIDRDKTISSAIINHHFLQNTYBONCHYKKGGEKRDQDCHTKQDVCIPORRYQLCMKELTNLVNNTOTNFHROITFRALYLKRRCLYDHRHTEGOLLULNRYRNYKDFCKDIPASLGFQFGIING
Consensus GGNPYDIDRDKTISSAIINHHFLQNTYBONCHYKKGGEKRDQDCHTKQDVCIPORRYQLCMKELTNLVNNTOTNFHROITFRALYLKRRCLYDHRHTEGOLLULNRYRNYKDFCKDIPASLGFQFGIING

361 371 381 391 401 411 421 431 441 451 461 471 481 491

SRL1 TDMEGTYSKYYENNLRSIFGTDKXRRQRRQKQANE SKRQINIRBMSYKQKLKGNFJATCKLNYRVNTEPQIYRUIREMGDYYSELPTEVQVLEKEDGCKINTDKKCYKYPCCQNRCKSYDQALTRK
PA TDMEGTYSKYYENNLRSIFGTDKXRRQRRQKQANE SKRQINIRBMSYKQKLKGNFJATCKLNYRVNTEPQIYRUIREMGDYYSELPTEVQVLEKEDGCKINTDKKCYKYPCCQNRCKSYDQALTRK
AM TDMEGTYSKYYENNLRSIFGTDKXRRQRRQKQANE SKRQINIRBMSYKQKLKGNFJATCKLNYRVNTEPQIYRUIREMGDYYSELPTEVQVLEKEDGCKINTDKKCYKYPCCQNRCKSYDQALTRK
MT TDMEGTYSKYYENNLRSIFGTDKXRRQRRQKQANE SKRQINIRBMSYKQKLKGNFJATCKLNYRVNTEPQIYRUIREMGDYYSELPTEVQVLEKEDGCKINTDKKCYKYPCCQNRCKSYDQALTRK
Consensus TDMEGTYSKYYENNLRSIFGTDKXRRQRRQKQANE SKRQINIRBMSYKQKLKGNFJATCKLNYRVNTEPQIYRUIREMGDYYSELPTEVQVLEKEDGCKINTDKKCYKYPCCQNRCKSYDQALTRK

492 501 511 521 531 541 551

SRL1 KKKQDVL SRRFISYKXREKVTGGLVTPYDILKQELDEFNEVHFEMEINRQGRHYIELCYCS
PA KKKQDVL SRRFISYKXREKVTGGLVTPYDILKQELDEFNEVHFEMEINRQGRHYIELCYCS
AM KKKQDVL SRRFISYKXREKVTGGLVTPYDILKQELDEFNEVHFEMEINRQGRHYIELCYCS
MT KKKQDVL SRRFISYKXREKVTGGLVTPYDILKQELDEFNEVHFEMEINRQGRHYIELCYCS
Consensus KKKQDVL SRRFISYKXREKVTGGLVTPYDILKQELDEFNEVHFEMEINRQGRHYIELCYCS

Figura 6: Representação dos polimorfismos encontrados nos pacientes da área endêmica brasileira. Sal-I: Seqüência utilizada como padrão para os estudos de polimorfismo. PA: amostra do soro de paciente do estado do Pará. MT: Amostra do paciente do estado do Mato Grosso. AM: amostra do soro de paciente do estado do Amazonas que difere dos outros dois soros apenas no resíduo 503 (último aminoácido polimórfico). Em azul estão apontados os polimorfismos descritos em comparação à Sal-I. Retirado de Casteluber (2010).

1.5 Adenovírus como vetores vacinais

No presente estudo, além das proteínas purificadas, também foram utilizados adenovírus humanos do tipo 5 (HAd5) recombinantes não replicativos, os quais expressam os dois polimorfismos da proteína DBP do *Plasmodium vivax* (AdDBPII-MT e AdDBPII-PA) e HAd5 recombinante expressando proteínas de citomegalovírus (AdCMV) como controle negativo. Os adenovírus humanos são capazes de estimular eficientemente a resposta imune e induzir a formação de células de memória, sendo o HAd5 considerado o mais imunogênico (Schagen et al. 2004). Além disso, os vetores adenovirais induzem tanto a resposta imune inata como a resposta imune adaptativa em hospedeiros mamíferos, tornando-se com isso ferramentas bastante atraentes para uso em vacinas (Bangari and Mittal 2006).

Em seu trabalho de doutorado, a Dra. Marisa Cristina da Fonseca Casteluber conseguiu os melhores resultados utilizando um protocolo *prime-boost* quando utilizou adenovírus humanos tipo 5 recombinantes não replicativos na terceira dose (segundo reforço) vacinal (Casteluber 2010).

1.6 Adjuvantes vacinais

Os adjuvantes vacinais são substâncias que podem alterar a entrega do antígeno vacinal ou atuar como imunopotenciadores, influenciando tanto a qualidade quanto a quantidade da resposta imune adaptativa. Durante décadas o único adjuvante vacinal aprovado para uso humano foi o Alum e hoje em dia ainda existem poucos adjuvantes licenciados para o uso em humanos. MF59, uma emulsão óleo em água, e monofosforil lipídeo A (MPLA), presente no sistema adjuvante AS04, estão entre os adjuvantes vacinais recentemente licenciados (tabela 1). Algumas outras formulações estão sendo testadas em estudos clínicos e espera-se que em breve sejam aprovadas para uso em humanos (Coffman et al. 2010; Miyaji et al. 2011).

Tabela 1. Adjuvantes licenciados até o momento para uso humano (Miyaji et al. 2011)

Adjuvante	Componente ativo	Uso em vacinas
Alum	Sais de alumínio	Diversas
MF59	Esqualeno em emulsão óleo/água	Gripe sazonal e pandêmica
AS03	Esqualeno em emulsão óleo/água + α -tocoferol	Gripe pandêmica
AS04	MPL+Alum	HBV, HPV

MPL: monofosforil lipídeo A; HBV: vírus da hepatite B; HPV: papiloma vírus humano.

MONTANIDE ISA 720 é um adjuvante vacinal composto de um óleo metabolizável e um sistema surfactante desenhado para fazer uma emulsão água em óleo. Ele tem sido utilizado desde 1992 em mais de 50 estudos clínicos relacionados a vacinas terapêuticas contra várias doenças como malária e câncer. Estudos pré-clínicos com macacos do gênero *Aotus*, utilizando o adjuvante Montanide ISA 720 e frações da proteína CS de *P. vivax* demonstraram boa segurança e tolerabilidade, com bons resultados também quanto a sua antigenicidade e imunogenicidade (Arevalo-Herrera et al. 2011).

1.7 Protocolos *prime-boost* (dose-reforço) heterólogos

A estratégia básica dos protocolos *prime-boost* heterólogos consiste em estimular o sistema imune com uma primeira dose (*prime*) do antígeno alvo conjugada a um vetor e então seletivamente o re-estimular com a readministração (*boost*) do antígeno conjugado a um segundo vetor antigenicamente distinto do primeiro (figura 4). Esta estratégia de vacinação, descrita pela primeira vez em 1993 (Li et al. 1993), costuma atingir maiores níveis de imunidade do que protocolos de dose única ou de *prime-boost* homólogo, pois os principais mecanismos de indução da resposta imune de cada imunógeno podem ser complementares e/ou sinérgicos (Almeida and Bruna-Romero 2011). Enquanto as primeiras estratégias de *prime-boost* eram meramente aditivas, as novas estratégias (geralmente envolvendo *boost* com poxvírus ou adenovírus) potencializam o efeito sinérgico. Esse efeito no aumento da imunidade ao antígeno alvo é refletido no aumento de células T antígeno-específicas, enriquecimento seletivo das células T de alta avidéz e aumento na eficácia contra o patógeno (Woodland 2004). A ordem de inoculação das formulações também parece influenciar a resposta (Lu 2009) e a razão complementaridade/sinérgismo também pode ser diferente para cada vetor viral e adjuvante vacinal em questão, dependendo das características associadas a cada um deles (Almeida and Bruna-Romero 2011).

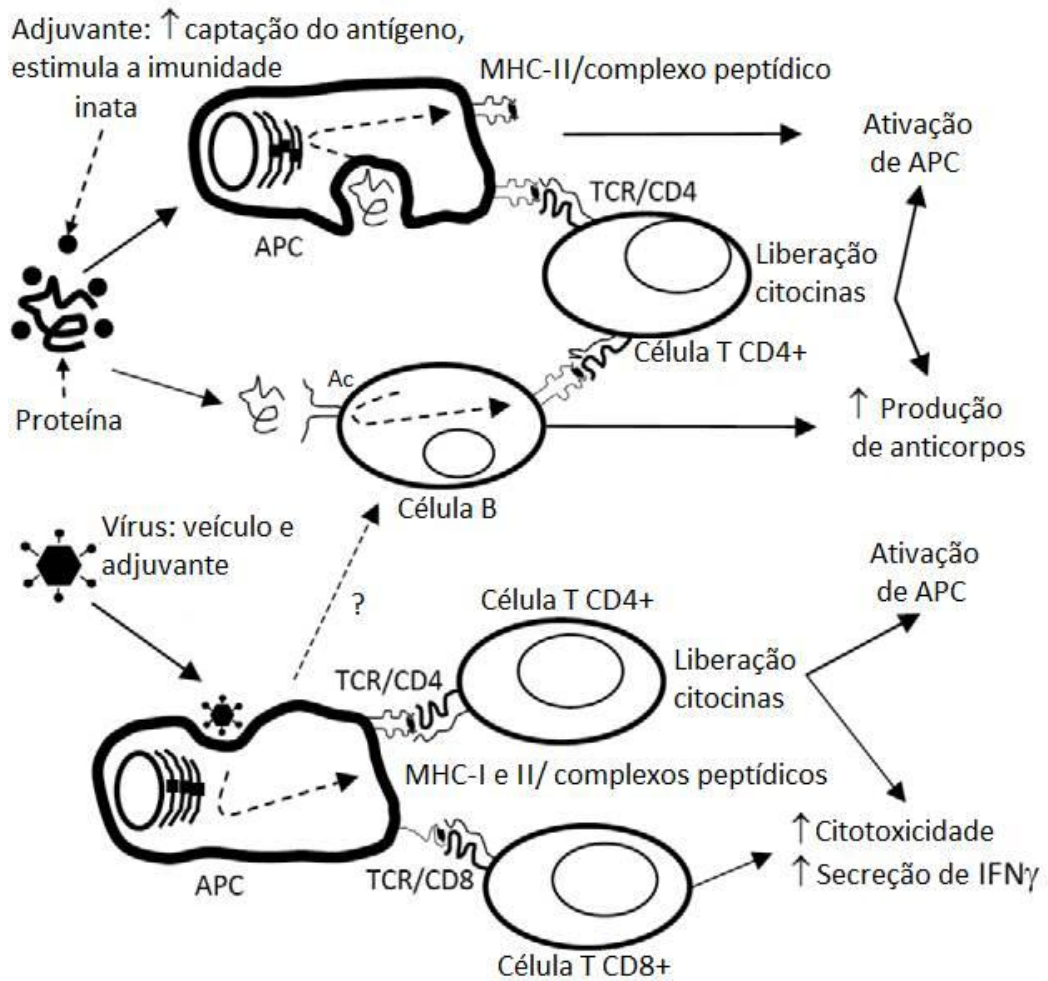


Figura 7: Principais eventos relacionados à aquisição de imunidade quando utiliza-se um protocolo *prime-boost* heterólogo. Resumo dos eventos relacionados ao desenvolvimento da imunidade adquirida através dos mecanismos de apresentação e processamento de antígenos após a administração de uma vacina proteínica em adjuvante ou com vetor viral recombinante. Como pode ser observado, os principais mecanismos induzidos por cada imunógeno podem ser complementares e/ou sinérgicos. Ac: anticorpo; APC: célula apresentadora de antígeno; IFN γ : interferon gama; MHC: complexo de histocompatibilidade principal; TCR: receptor de células T. Adaptado de Almeida and Bruna-Romero (2011).

Relevância e Justificativa da Realização do Projeto

A malária é uma doença parasitária que provoca muitas perdas econômicas e humanas devido à morbidade e à mortalidade da doença, visto que praticamente metade da população mundial encontra-se sob risco de contrair esta doença, sendo que a grande maioria das mortes ocorre em crianças menores de 5 anos de idade. Ainda que esta seja uma doença para a qual existe tratamento disponível, seu controle mostra-se difícil devido à crescente resistência tanto do mosquito vetor aos inseticidas quanto do plasmódio aos medicamentos disponíveis para o tratamento.

Ao longo das últimas décadas, muitos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de se criar uma vacina eficaz contra esta doença, porém a maior parte deles voltada ao *Plasmodium falciparum*, o qual é responsável pelas formas mais graves de malária, bem como pela grande maioria dos óbitos provocados pela mesma. Contudo, a alta morbidade e as frequentes recidivas da malária provocada pelo *Plasmodium vivax*, bem como a recente descrição de mortes provocadas por esta espécie, vem aumentando o interesse e a necessidade de se desenvolver uma vacina que proteja contra este parasito, visto que é a espécie mais prevalente fora da África, em especial no Brasil.

Devido à importância da proteína DBP para a invasão dos eritrócitos pelo *P. vivax* e seu consequente desenvolvimento no organismo do hospedeiro, esta proteína, em especial a sua região II, torna-se um alvo bastante promissor para o desenvolvimento de uma vacina que impeça a infecção pelo parasito.

Pesquisas realizadas por nosso grupo mostraram resultados extremamente promissores nesse sentido, conseguindo alcançar elevados índices de imunidade em animais experimentais utilizando polimorfismos diferentes da proteína DBP de *Plasmodium vivax* em estudos preliminares, demonstrando efetividade na produção de anticorpos quando administrada uma vacina contendo as duas variantes polimórficas da PvDBPII (MT e PA) tanto de forma isolada quanto em conjunto e/ou associadas a outras proteínas.

Somando-se a isso, a utilização do adenovírus humano tipo 5 como vetor vacinal vem se mostrando segura e altamente eficaz na indução de resposta imune, bem como o adjuvante montanide ISA 720 vem demonstrando a capacidade de estimular fortemente o sistema imune, apresentando segurança e tolerabilidade.

Objetivos

1.8 Objetivo geral

Avaliar os polimorfismos MT e PA da DBP (*Duffy-Binding Protein*) de *Plasmodium vivax* quanto à sua capacidade de gerar resposta imune quando administrados sob a forma de vacina, isoladamente ou como parte de uma formulação múltipla.

1.9 Objetivos específicos

1. Vacinar duas linhagens de animais experimentais (Swiss e BALB/c) com cada uma das variações polimórficas MT e PA da DBP isoladamente e em conjunto, utilizando o adjuvante montanide ISA 720.
2. Avaliar a resposta humoral através da dosagem de anticorpos.
3. Avaliar a funcionalidade da resposta obtida por meio de teste de inibição da ligação ao eritrócito.
4. Comparar a resposta obtida neste estudo com o uso do adjuvante montanide ISA 720 com as respostas obtidas em um estudo prévio de nosso grupo utilizando os adjuvantes MPLA e Alum em conjunto.

Metodologia

1.10 Clonagem e expressão das sequências polimórficas de PvDBP II

As sequências utilizadas neste estudo foram amostras de DNA purificadas do sangue de pacientes de áreas endêmicas brasileiras, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Malária do Instituto de Pesquisas René-Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. As amostras de PvDBP II-MT e PA englobam todos os polimorfismos encontrados na região endêmica brasileira, segundo estudo de Souza e colaboradores (2006). A clonagem e a expressão das sequências polimórficas foram realizadas pela Dra. Marisa Cristina da Fonseca Casteluber durante seu trabalho de doutorado em nosso laboratório.

As sequências de DNA de PvDBP II-MT e PvDBP II-PA foram amplificadas e clonadas no plasmídeo de transferência pAdCMV-link-1 para a construção dos adenovírus recombinantes (figura 7). Estes plasmídeos contendo as sequências inseridas (pAdCMV-link-1-PvDBP II-MT e pAdCMV-link-1-PvDBP II-PA) foram co-transfectados com pJM17 (plasmídeo que contém o genoma do adenovírus com as regiões E1 e E3 deletadas) em células HEK 293 e, após cerca de 15 dias, foi observado um efeito citopático, demonstrando que os adenovírus recombinantes produzidos foram capazes de infectar as células. As células infectadas com os adenovírus foram então testadas através de RT-PCR quanto à sua capacidade de transcrever os genes de PvDBP II. Para a expressão das proteínas PvDBP II-MT e PvDBP II-PA por bactérias *E. coli* M15, as sequências amplificadas foram clonadas no plasmídeo pQE32 e os clones de cada sequência obtidos foram induzidos com IPTG e as proteínas produzidas foram purificadas em coluna de quelato de níquel sob condições desnaturantes.

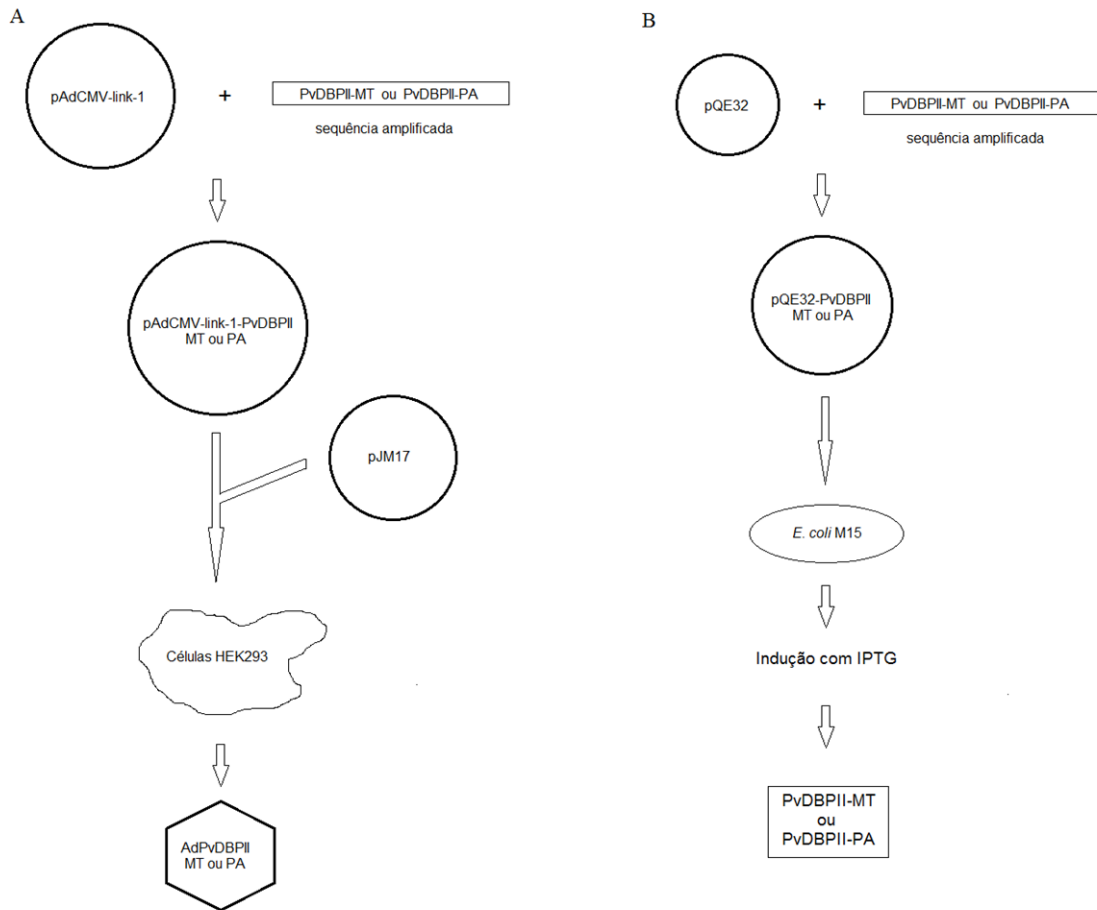


Figura 8: Representação esquemática da estratégia de clonagem da PvDBP II usada neste estudo. Estratégia de clonagem para a construção dos adenovírus recombinantes e de *E. coli* expressando PvDBP II-MT e PvDBP II-PA. (A) O plasmídeo de transferência utilizado para a construção dos adenovírus recombinantes foi pAdCMV. Este plasmídeo possui regiões do genoma do adenovírus humano sorotipo 5, um forte promotor de citomegalovírus e uma cauda de poliadenilação do vírus símio SV40. Este plasmídeo, adicionado a pJM17, foi transfectado em células HEK 293 (*Human Kidney Embryonic cells*) e os adenovírus produzidos foram testados e purificados para as imunizações. (B) Para a construção de *E. coli* M15 expressando PvDBP II, as sequências foram clonadas no plasmídeo pQE32. Após este processo, os clones foram induzidos com IPTG e as proteínas foram purificadas para a imunização dos animais. Estes procedimentos foram realizados pela Dra. Marisa Cristina da Fonseca Casteluber em seu trabalho de doutorado.

1.11 Estratégia de clonagem para a construção dos adenovírus recombinantes expressando PvDBP11-MT e PvDBP11-PA

Os adenovírus recombinantes expressando as proteínas PvDBP11-MT e PvDBP11-PA foram construídos e purificados pela Dra. Marisa Cristina da Fonseca Casteluber em seu trabalho de doutorado em nosso laboratório.

A seqüência nucleotídica codificando a variável PA foi amplificada por PCR e o produto da PCR foi clonado primeiramente no plasmídeo pCR2.1TOPO (Invitrogen).. Os plasmídeos contendo os insertos foram utilizados para transformar bactérias XL-1 *Blue*. Nesta clonagem originamos o pCR2.1TOPO-PvDBP11-PA, do qual a seqüência nucleotídica de interesse (PvDBP11-PA) foi retirada utilizando-se enzimas de restrição e inserida no plasmídeo pcDNA3.1Hass. Esse plasmídeo possui o peptídeo sinal HASS e foi digerido por enzimas de restrição para inserção do fragmento referente à seqüência da PvDBP11.

Confirmada a correta inserção da seqüência nucleotídica codificadora da PvDBP11, o plasmídeo contendo o inserto foi novamente digerido com enzimas de restrição para retirada do fragmento HASS-PvDBP11-PA. A seqüência digerida foi subclonada no plasmídeo de transferência adenoviral, pAdCMV-link-1. Os clones positivos encontrados foram sequenciados e utilizados para a construção do adenovírus expressando a proteína PvDBP11-PA.

No caso do paciente MT o pAdCMV-link-1 utilizado na clonagem já possuía o peptídeo sinal HASS previamente inserido. O produto da ligação foi utilizado para transformar E. coli-XL1 *Blue* e os clones positivos foram confirmados pela digestão com enzima de restrição. A clonagem foi posteriormente confirmada por sequenciamento e o seu produto utilizado para construção dos adenovírus recombinantes expressando a proteína PvDBP11-MT.

Para a geração do adenovírus expressando a PvDBP11 as células HEK293 (*Human Embryonary Kidney cells*) foram utilizadas, pois são permissivas ao crescimento de adenovírus não-replicativos. A geração dos adenovírus recombinantes ocorreu pelo processo de co-transfecção de plasmídeos e recombinação homóloga. Para isso foram utilizados os plasmídeos pJM17 e o pAdCMV-link-1 contendo a PvDBP11.

O pJM17 é um plasmídeo que contém o genoma do adenovírus humano tipo 5(HAd5V) modificado por uma inserção na região E1. Devido à inserção, esse genoma gera

adenovírus incapazes de replicar ou serem carregados em um capsídeo para formar uma partícula viral.

O plasmídeo de transferência pAdCMV-link-1 utilizado na co-transfecção com o pJM17 possui, além de um sítio de clonagem, um cassete de expressão para células eucariotas, flanqueado por seqüência de homologia com o genoma do adenovírus humano tipo 5, contendo o promotor do citomegalovirus (CMV) e uma seqüência de poliadenilação do vírus símio (SV40 Poli A). A co-transfecção do pJM17 com o pAdCMV-link-1 que contém a porção 5' do genoma do HAd5, com a região E1 mutada, pode produzir vírus infecciosos de forma eficiente por recombinação homóloga, levando à inserção do fragmento da DBP presente no plasmídeo pAdCMV-link-1.

Para realizar a RT-PCR o RNA das células infectadas com o adenovírus recombinante foi extraído através do *RNeasy Mini Kit* (QUIAGEN) e tratado com a enzima DNase RQ1 (Promega) conforme especificações do fabricante.

A análise da expressão da PvDBP II pelos adenovírus nas células HEK 293 infectadas foi realizada através de *Western Blotting*, utilizando como anticorpo primário um *pool* de soros de pacientes residentes na área endêmica de malária do Brasil (município de Terra Nova do Norte-MT) gentilmente cedido pelo Laboratório de Malária do Instituto de Pesquisas René-Rachou em Belo Horizonte-MG. Como anticorpo secundário, foi utilizado o HRP-Goat Anti-Human IgG Conjugate (ZyMax™ Grade) da marca Zymed Laboratories. Em outro teste também foi utilizado um *pool* de soros de camundongos imunizados com HAd5PvDBP II como anticorpo primário. Como anticorpo secundário foi utilizado HRP-Goat Anti-mouse IgG Conjugate (ZyMax™ Grade). A revelação foi realizada utilizando o *kit ECL-Plus* (Amersham Biosciences) e filme Kodak, segundo o protocolo do fabricante.

Para a purificação do adenovírus recombinante, 12 garrafas de cultura celular de 150 cm² contendo células HEK293A com cerca de 90% de confluência foram infectadas com HAd5-PvDBP II-MT e HAd5-PvDBP II-PA separadamente. Após 48 horas, as células se desprendiam da monocamada e por isso foram coletadas e centrifugadas a 1500 r.p.m. e 4 °C em tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL e o sobrenadante foi armazenado a 4 °C. O sedimento resultante foi ressuspensionado em 8 mL de Tris-HCl 0,01 M estéril e congelado a -80 °C. O sedimento foi descongelado e purificado de acordo com o protocolo de purificação viral sugerido pelo fabricante do *Kit Vivaspin* (VivaScience).

Após a purificação o adenovírus foi armazenado em tubos com capacidade para 1500 μL . Um tubo foi separado para a titulação do adenovírus recombinante e foram feitas diluições seriadas em meio DMEM incompleto. Alíquotas de 200 μL de cada uma das diluições foram adicionadas às células HEK293A confluentes, em triplicata, a cada um dos poços de uma placa de cultura de 24 poços. Um controle apenas com células foi feito. A placa foi incubada por uma semana a 37°C e 5% CO_2 . Após esse período foi observada a formação de placas de lise nas diluições e essas placas foram contadas.

1.12 Indução da síntese e purificação das proteínas expressadas em *E. coli* M15

As bactérias *E. coli* M15 transformadas para expressar as proteínas PvDBP_{II}-MT e PvDBP_{II}-PA foram obtidas por nosso grupo através do trabalho da Dra. Marisa Cristina da Fonseca Casteluber.

Para a indução da expressão da PvDBP_{II}, as células de *E. coli* M15 contendo a sequência da proteína MT ou PA inserida no plasmídeo pQE32, foram ativadas em 5mL de meio LB líquido para expressão da proteína recombinante. Após atingir uma A_{600} de 0,4- 0,6 foi adicionado o reagente IPTG (isopropil-1-tio- β -D-galactosídeo) 1mM para indução da síntese da proteína. A cada hora foi coletado 1 mL do meio, até completar 3-4 horas de indução (Figura 8). O volume coletado foi utilizado para análise por eletroforese em gel SDS-PAGE e *Western Blot*. As proteínas reconhecidas pelos anticorpos foram utilizadas para imunizar os animais experimentais e nos testes de ligação ao eritrócito.

Essas proteínas expressadas em *E. coli* foram purificadas utilizando-se o *kit His Gravi Trap* (GE Healthcare), o qual é utilizado para purificar proteínas com cauda de 6 histidinas. Sendo assim, PvDBP_{II} foi purificada sob condições desnaturantes conforme sugerido por Yasdani e colaboradores (2004a). Para realizar a lise bacteriana, o sedimento de 50 mL de cultura foi ressuspense em 8 mL de tampão de lise guanidina (0,2 mg/mL lizozima, 1 mM aprotinina e guanidina 6 M) pH 7,5. Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos, em agitador orbital. O lisado obtido foi sonificado em gelo (6 pulsos de 10 segundos, 30 amperes) e centrifugado durante 30 minutos, a 6000 rpm. Este lisado bacteriano foi adicionado à coluna para a ligação das proteínas e, em seguida, esta foi lavada com 10 mL de tampão desnaturante de ligação. A eluição da proteína foi feita adicionando-se 3 mL de tampão de eluição desnaturante (fornecido pelo kit) e frações de 1mL foram coletadas. Após o processo de purificação a proteína sofreu diálise contra PBS 1X a 4°C.

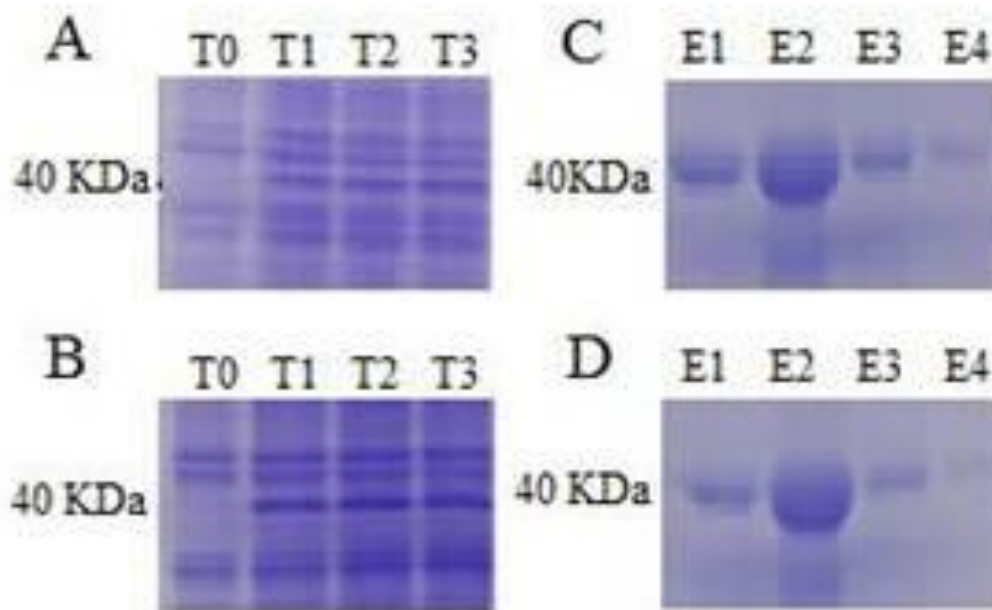


Figura 9: Expressão de PvDBP II em bactérias após indução com IPTG e purificação das proteínas expressadas. (A, B) Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, uma banda de 40 kDa pode ser observada. T0 – cultura não induzida; T1-T3 – cinética de indução com IPTG; (A) PvDBP II-MT e (B) PvDBP II-PA. (C, D) Proteínas purificadas em colunas cromatográficas de afinidade, em condições desnaturantes; (C) PvDBP II-MT purificada, (D) PvDBP II-PA purificada. E1-E4 correspondem às quatro eluições das proteínas purificadas. A expressão e a purificação dessas proteínas foram feitas pela Dra. Marisa Cristina da Fonseca Casteluber em seu trabalho de doutorado em nosso laboratório.

1.13 Caracterização das proteínas em SDS-PAGE

Após a purificação as proteínas foram separadas em gel desnaturante de poliacrilamida bifásico. As alíquotas das proteínas em tampão de amostra [20% (v/v) de glicerol; 20% (p/v) SDS; 0,375 M Tris pH 8,8; 0,75 M de β -mercaptoetanol e 0,25 % (v/v) de azul de bromofenol] foram aquecidas a 95°C e aplicadas no gel de poliacrilamida a 12% (acrilamida/bisacrilamida na proporção 30: 0,8) em tampão Tris-glicina (Tris-Base 25 mM, pH 8,3; glicina 250 mM e SDS 0,1%) e tensão de 100 V. Para analisar o padrão de bandas das proteínas foi utilizado um marcador de tamanho molecular. Para a visualização das bandas, o gel foi corado durante 1 hora por *Coomassie Blue* [0,25% (p/v) do corante *Coomassie Blue* R-250 (Sigma)]. Para descorar, o gel foi mergulhado na solução 1 (40% metanol, 10% ácido acético glacial, 50% água) durante 2 horas e transferido para a solução 2 (10% etanol, 5% ácido acético, 85% água destilada) até a visualização das bandas. Procedimento realizado pela Dra. Marisa Cristina da Fonseca Casteluber em sua tese de doutorado.

1.14 Vacinação dos animais experimentais

Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG e todos os procedimentos experimentais seguiram de acordo com as normas do CETEA (Comitê de Ética e Experimentação Animal – UFMG), registrado sob o número de protocolo 140/2005. Foram vacinadas as linhagens de camundongos Swiss e BALB/c com as proteínas PvDBPII-MT, PvDBPII-PA e uma combinação de ambas na mesma proporção, utilizando o adjuvante vacinal Montanide ISA 720.

A triagem inicial foi feita com a linhagem Swiss e após resultados preliminares foi avaliada também a linhagem BALB/c. Para ambas as linhagens foram utilizados camundongos com 6-8 semanas de vida, o adjuvante Montanide ISA 720 e os polimorfismos MT e PA da PvDBPII.

Os protocolos de vacinação utilizados foram de dose-reforço (*prime-boost*), sendo a primeira e a segunda dose de proteína (D1_(P) e D2_(P)) e um reforço de adenovírus (D3_(Ad)). Os animais foram imunizados por via subcutânea na base da cauda, com 100 μ l da vacina ou adenovírus, sendo administrados 50 μ l de cada lado da cauda.

Para a linhagem Swiss foram utilizados 5 μ g de proteína nas duas primeiras doses vacinais, seguindo o protocolo de imunização estabelecido em estudo anterior envolvendo as

proteínas AMA-1, MSP-1, DBP-MT e DBP-PA, onde ficou evidenciado que esta concentração proteica era suficiente para sensibilizar o sistema imune dos camundongos experimentais. Para a linhagem BALB/c foram utilizados 20µg de proteína nas duas primeiras doses vacinais, seguindo o protocolo de imunização de estudo prévio da Dra. Marisa Casteluber, onde iniciou-se o estudo do sinergismo vacinal das variantes polimórficas utilizadas no presente trabalho, a fim de que estes resultados pudessem ser comparados aos resultados anteriores, visto que foi utilizada a mesma linhagem de camundongos.

1.14.1 Esquema vacinal da linhagem Swiss

O protocolo de imunização utilizado para esta linhagem foi do tipo dose-reforço, com uma dose inicial (D1_(P)) e dois reforços (D2_(P) e D3_(Ad)). Os animais foram divididos em quatro grupos de cinco animais cada, sendo que o grupo controle recebeu apenas adjuvante Montanide emulsificado com PBS 1X na primeira e na segunda dose e AdCMV na terceira. Os outros grupos receberam as proteínas PvDBP_{II}-MT, PvDBP_{II}-PA e PvDBP_{II}-MT+PvDBP_{II}-PA emulsificadas com Montanide nas primeiras duas doses e os adenovírus correspondentes (AdPvDBP_{II}-MT, AdPvDBP_{II}-PA e AdPvDBP_{II}-MT+AdPvDBP_{II}-PA) na terceira.

A imunização foi realizada a uma concentração de 70% adjuvante + 30% proteína, como mostra a tabela 2 para D1_(P) e D2_(P), e 1x10⁹ pfu de adenovírus para D3_(Ad), como mostra a tabela 3.

Tabela 2. Camundongos linhagem Swiss – D1_(P) e D2_(P)

Grupo	Montanide	PvDBP _{II} -MT	PvDBP _{II} -PA	PBS 1X
Controle	70 µl	-	-	30 µl
DBP-MT	70 µl	5 µg	-	qsp 100 µl
DBP-PA	70 µl	-	5 µg	qsp 100 µl
DBP-MT + DBP-PA	70 µl	2,5 µg	2,5 µg	qsp 100 µl

Tabela 3. Camundongos linhagem Swiss – D3_(Ad)

Grupo	AdCMV	AdPvDBP _{II} -MT	AdPvDBP _{II} -PA	PBS 1X
Controle	1x10 ⁹ pfu	-	-	qsp 100 µl
DBP-MT	-	1x10 ⁹ pfu	-	qsp 100 µl
DBP-PA	-	-	1x10 ⁹ pfu	qsp 100 µl
DBP-MT + DBP-PA	-	0,5x10 ⁹ pfu	0,5x10 ⁹ pfu	qsp 100 µl

1.14.2 Esquema vacinal da linhagem BALB/c

O protocolo de imunização utilizado para esta linhagem foi do tipo dose-reforço, com uma dose inicial ($D1_{(P)}$) e dois reforços ($D2_{(P)}$ e $D3_{(Ad)}$). Os animais foram divididos em quatro grupos de cinco animais cada, sendo que o grupo controle recebeu apenas adjuvante Montanide emulsificado com PBS 1X na primeira e na segunda dose e AdCMV na terceira. Os outros grupos receberam as proteínas PvDBP_{II}-MT, PvDBP_{II}-PA e PvDBP_{II}-MT+PvDBP_{II}-PA emulsificadas com Montanide nas primeiras duas doses e os adenovírus correspondentes (AdPvDBP_{II}-MT, AdPvDBP_{II}-PA e AdPvDBP_{II}-MT+AdPvDBP_{II}-PA) na terceira, como mostram as tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Camundongos linhagem BALB/c – $D1_{(P)}$ e $D2_{(P)}$

Grupo	Montanide	PvDBP _{II} -MT	PvDBP _{II} -PA	PBS 1X
Controle	70 μ l	-	-	30 μ l
DBP-MT	70 μ l	20 μ g	-	qsp 100 μ l
DBP-PA	70 μ l	-	20 μ g	qsp 100 μ l
DBP-MT + DBP-PA	70 μ l	10 μ g	10 μ g	qsp 100 μ l

Tabela 5. Camundongos linhagem BALB/c – $D3_{(Ad)}$

Grupo	AdCMV	AdPvDBP _{II} -MT	AdPvDBP _{II} -PA	PBS 1X
Controle	1×10^9 pfu	-	-	qsp 100 μ l
DBP-MT	-	1×10^9 pfu	-	qsp 100 μ l
DBP-PA	-	-	1×10^9 pfu	qsp 100 μ l
DBP-MT + DBP-PA	-	$0,5 \times 10^9$ pfu	$0,5 \times 10^9$ pfu	qsp 100 μ l

1.15 Avaliação da resposta imune

1.15.1 ELISA para análise dos anticorpos produzidos

As respostas imunes induzidas pelas vacinações foram analisadas por ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), onde foram pesquisados anticorpos IgG específicos para os antígenos vacinais no soro retirado dos camundongos imunizados. Neste teste, cada poço das placas de 96 poços foi sensibilizado com 0,5µg de PvDBPII purificada. Foram utilizadas placas com três sensibilizações diferentes: 0,5µg de DBP-MT, 0,5µg de DBP-PA e 0,25µg de DBP-MT + 0,25µg de DBP-PA. O soro dos camundongos foi utilizado como anticorpo primário, diluído a partir da concentração de 1:200. Como anticorpo secundário foi utilizado Rabbit anti-mouse IgG (H+L) conjugado à peroxidase (Invitrogen), diluído a uma concentração de 1:10000. A revelação foi feita com Tetrametilbenzidina (TMB *single solution ready to use* - Invitrogen) e a leitura realizada a 450 nm.

1.15.2 Inibição da ligação ao eritrócito

Teste *in vitro* para avaliar a inibição da ligação da PvDBPII aos eritrócitos. Objetiva verificar se os anticorpos induzidos após a imunização são capazes de bloquear a ligação aos eritrócitos. Neste experimento foram utilizadas células denominadas COS-7, uma linhagem estável de células de rim de macaco verde africano (Fraser et al. 2001). Essas células foram distribuídas nos poços de uma placa de cultura de seis poços a uma concentração de 2×10^5 céls/poço e incubadas (37°C, 5% CO₂) por 12–14 horas. Para transfectar as células COS-7 foi utilizado o plasmídeo recombinante pEGFP-Sal-I (gentilmente cedido pela Pesquisadora Luzia Helena de Carvalho do Laboratório de Malária do Instituto de Pesquisas René-Rachou - FIOCRUZ/BH), o qual expressa a proteína verde fluorescente intracelular (GFP) e a PvDBPII-Sal-I na superfície celular. Esta última é homóloga à PvDBPII utilizada neste estudo. Como controle negativo foi utilizado o plasmídeo pEGFP vazio, transfectado em outros dois poços da placa. No protocolo de transfecção foi utilizado 2µg de DNA plasmidial em cada poço de transfecção. O teste de ligação ao eritrócito foi feito 48 horas após a transfecção (Ceravolo et al. 2008). Para isso o soro dos camundongos imunizados com PvDBPII foi diluído na concentração de 1:40. As placas foram lavadas 3 vezes com meio DMEM incompleto. O soro dos camundongos, já diluído, foi adicionado para um volume final de 1 mL em cada um dos poços das placas, as quais foram previamente incubadas a 37°C, 5% CO₂ durante uma hora. Após a incubação foram adicionados 200 µl de eritrócitos Duffy-positivos a 10% em DMEM sem soro, previamente lavados com meio DMEM, nos seis poços de cada uma das placas, as quais foram novamente incubadas à temperatura ambiente por 2 horas para a adesão dos eritrócitos à monocamada celular. Os eritrócitos

não-aderidos foram removidos lavando-se as células COS-7 com PBS 1X, pH 7,4 por 5 vezes. Adicionou-se 2 mL de PBS 1X em cada poço da placa. As células COS-7 com os eritrócitos aderidos (rosetas) foram contadas em microscópio invertido de fluorescência e foram consideradas positivas as células que possuíam mais de 50% da sua superfície coberta de eritrócitos.

1.16 Estudo comparativo da imunogenicidade dos polimorfismos da PvDBP, em formulações isoladas/associadas e em formulações multi-antígenos

Os resultados obtidos neste estudo foram comparados a alguns resultados de um estudo anterior realizado por nosso grupo, onde a linhagem de camundongos BALB/c foi imunizada com uma mistura de quatro proteínas (PvDBPII-MT + PvDBPII-PA + AMA-1 + MSP-1), utilizando os adjuvantes montanide ISA 720 e a mistura dos adjuvantes MPLA+Alum, e com um reforço utilizando os quatro adenovírus correspondentes (AdPvDBPII-MT + AdPvDBPII-PA + AdAMA-1 + AdMSP-1).

No estudo utilizando as quatro proteínas, cada camundongo recebeu 5µg de cada uma das proteínas em estudo, totalizando uma concentração total de 20µg de proteína por dose vacinal na primeira dose (D1_(P)) e no primeiro reforço (D2_(P)), 30 dias após D1_(P). Sessenta dias após D1_(P), os camundongos receberam um segundo reforço vacinal com adenovírus humano do tipo 5 expressando cada uma das proteínas na concentração de 1x10⁸ pfu de cada adenovírus por animal. Os adjuvantes vacinais foram utilizados em D1_(P) e D2_(P), na concentração de 70% de montanide ISA 720 por dose vacinal no grupo montanide e na concentração de 60% de Alum + 5% de MPL-A por dose vacinal no grupo MPL-A+Alum.

Para a detecção de anticorpos com ensaio de ELISA, as placas de 96 poços foram sensibilizadas com uma mistura das quatro proteínas em estudo, na concentração de 0,125µg de cada uma delas, totalizando 0,5µg de proteína total por poço.

Foram utilizados os resultados dos títulos de IgG total deste estudo envolvendo as quatro proteínas para comparação com o presente estudo, e o soro dos camundongos imunizados foi utilizado para o ensaio de inibição da ligação ao eritrócito.

Resultados

1.17 Avaliação da resposta imune

1.17.1 Análise da resposta humoral após imunização com os candidatos vacinais

Os resultados a seguir mostram que soros obtidos de duas linhagens de camundongos imunizadas apresentaram reatividade intensa contra as proteínas utilizadas nas inoculações. Estes resultados são mostrados na figura 9 para a linhagem Swiss (outbreed) e nas figuras 10,11,12 e 13 para a linhagem BALB/c (isogênica). O soro dos animais de cada grupo foi testado em placas com três sensibilizações diferentes: uma placa sensibilizada com a proteína PvDBPII-MT, uma placa sensibilizada com PvDBPII-PA e outra com ambas na mesma proporção.

1.17.1.1 Linhagem Swiss

Na linhagem Swiss as melhores dosagens de IgG foram obtidas com as placas sensibilizadas com as duas variantes polimórficas em conjunto. O grupo que recebeu somente PvDBPII-MT demonstrou melhor resposta de anticorpos do que os outros grupos vacinais em todas as doses, exceto 6 meses depois de $D3_{(Ad)}$ (figura 9). Quinze dias após $D1_{(P)}$ os camundongos que receberam PvDBPII-MT atingiram títulos de anticorpos de 6400 e 15 dias após $D2_{(P)}$ todos os grupos tiveram títulos de 51200. Quinze dias após $D3_{(Ad)}$, os camundongos imunizados com PvDBPII-MT atingiram títulos de 204800 enquanto os outros grupos apresentaram metade disso. Seis meses após $D3_{(Ad)}$, os camundongos imunizados com PvDBPII-PA e com PvDBPII-MT e PvDBPII-PA juntas obtiveram títulos de 102400 e os camundongos imunizados com PvDBPII-MT, 51200. O grupo controle (recebeu PBS emulsificado com adjuvante em $D1_{(P)}$ e $D2_{(P)}$, e AdCMV em $D3_{(Ad)}$) obteve os títulos de 200 em $D1_{(P)}$, 800 em $D2_{(P)}$ e 1600 em $D3_{(Ad)}$. Seis meses após $D3_{(Ad)}$ o título de anticorpos manteve-se em 1600. Um resumo dessas dosagens pode ser visto na tabela 6.

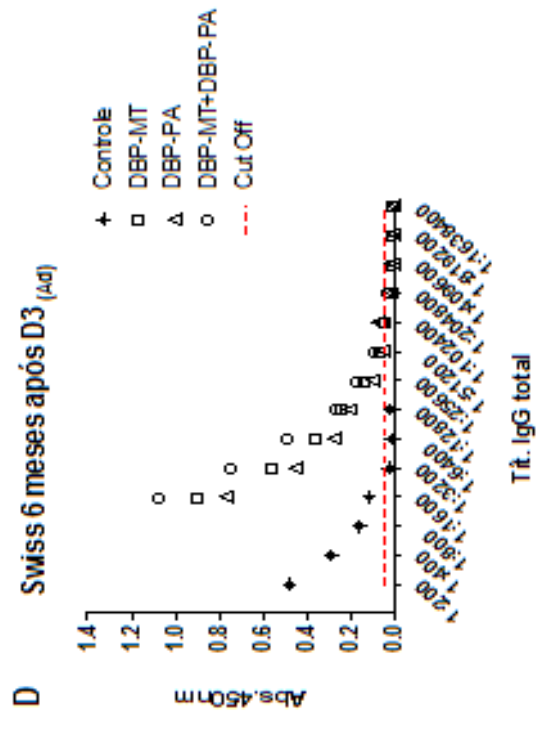
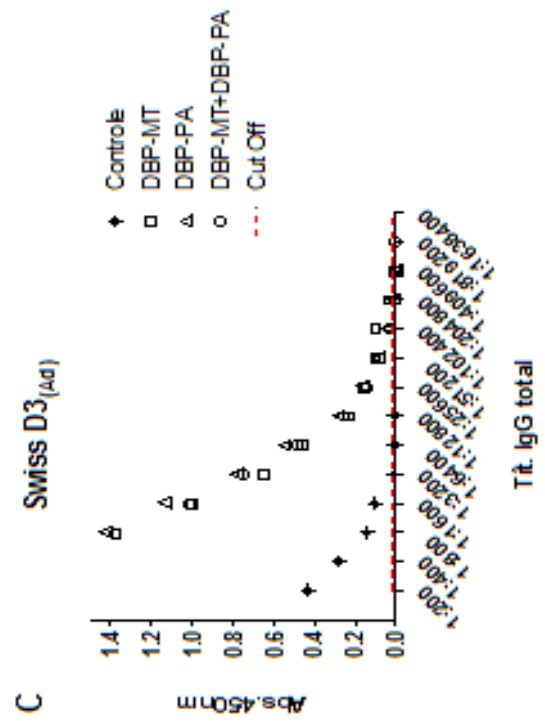
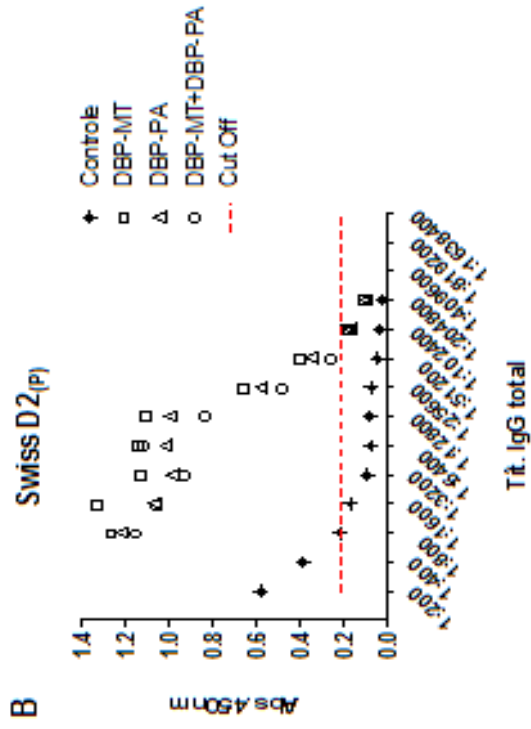
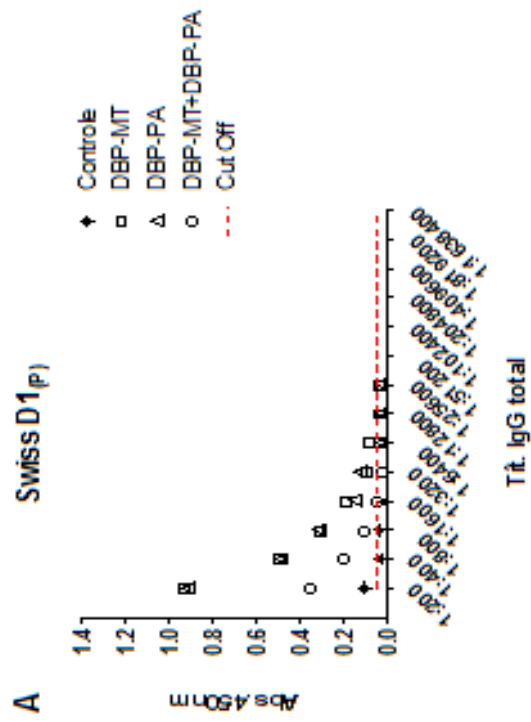


Figura 10. Imunogenicidade dos polimorfismos da PvDBP_{II} em camundongos Swiss. Dosagem de anticorpos IgG: (A) 15 dias após D1_(P); (B) 15 dias após D2_(P); (C) 15 dias após D3_(Ad) e (D) 6 meses após D3_(Ad). O grupo controle foi imunizado com PBS e montanide em D1_(P) e D2_(P) e com AdCMV em D3_(Ad). O grupo DBP-MT foi imunizado com os antígenos vacinais administrados sob a forma de proteína recombinante PvDBP_{II}-MT em D1_(P) e D2_(P), e com o vetor adenoviral humano tipo 5 AdDBP_{II}-MT em D3_(Ad). O grupo DBP-PA foi imunizado com proteína recombinante PvDBP_{II}-PA em D1_(P) e D2_(P), e com o vetor adenoviral humano tipo 5 AdDBP_{II}-PA em D3_(Ad). O grupo DBP-MT+DBP-PA foi imunizado com as proteínas recombinantes PvDBP_{II}-MT e PvDBP_{II}-PA juntas em D1_(P) e D2_(P), e com os vetores adenovirais humanos tipo 5 AdDBP_{II}-MT e AdDBP_{II}-PA em D3_(Ad). **D1_(P)**: primeira dose vacinal com proteína recombinante. **D2_(P)**: segunda dose vacinal utilizando proteína recombinante. **D3_(Ad)**: terceira dose vacinal, com adenovírus recombinante. Todas as dosagens foram feitas em placas sensibilizadas com as proteínas PvDBP_{II}-MT e PvDBP_{II}-PA em conjunto.

Tabela 6: Resumo dos títulos de IgG total em camundongos da linhagem Swiss em placas sensibilizadas com as duas variantes polimórficas

Grupo	Título de Ac/Dose vacinal			
	D1 _(P)	D2 _(P)	D3 _(Ad)	D3 _(Ad) (6 meses)
Controle	200	800	1600	1600
DBP-MT	6400	51200	204800	51200
DBP-PA	3200	51200	102400	102400
DBP-MT+ DBP-PA	800	51200	102400	102400

D1_(P): 15 dias após a primeira dose vacinal; D2_(P): 15 dias após o primeiro reforço vacinal; D3_(Ad): 15 dias após o reforço com adenovírus; 6 meses: 6 meses após o reforço com adenovírus.

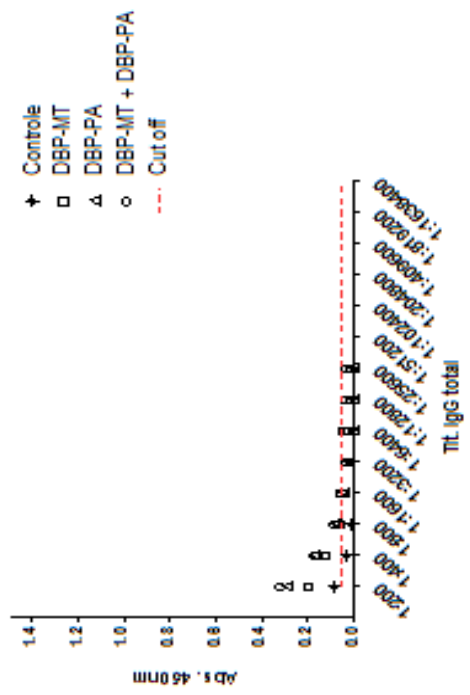
1.17.1.2 Linhagem BALB/c

Na linhagem BALB/c as placas sensibilizadas com as duas proteínas juntas apresentaram a melhor detecção de anticorpos de maneira geral, obtendo maiores títulos em todos os grupos vacinais. Quinze dias após D1_(P) os camundongos imunizados com PvDBPII-MT e com PvDBPII-PA isoladamente obtiveram títulos de anticorpos de 1600 e os camundongos imunizados com PvDBPII-MT+PvDBPII-PA obtiveram títulos de 3200. Quinze dias após D2_(P), os camundongos imunizados com PvDBPII-MT e com as duas proteínas juntas alcançaram títulos de 204800 e os imunizados com PvDBPII-PA atingiram 102400. Quinze dias após D3_(Ad), os camundongos imunizados com PvDBPII-PA e com a combinação das duas proteínas alcançaram títulos de anticorpos de 819200 e os imunizados com PvDBPII-MT atingiram 409600.

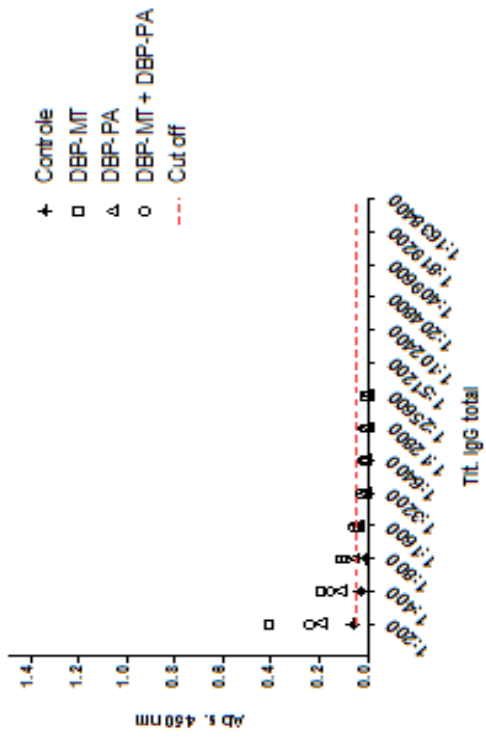
Seis meses após D3_(Ad), os camundongos imunizados com a combinação das duas proteínas atingiram maiores títulos de anticorpos do que os outros grupos vacinais em todas as sensibilizações de placas, sendo que desta vez as placas sensibilizadas apenas com PvDBPII-MT detectaram maiores títulos de anticorpos, atingindo 102400 para a combinação de proteínas, enquanto os outros grupos vacinais apresentaram metade deste título (Figuras 10, 11, 12 e 13). E mesmo os títulos apresentando-se mais baixos em outras sensibilizações, os mesmos apresentaram-se todos na mesma proporção entre os grupos vacinais.

O grupo controle apresentou títulos de 200 em D1_(P), 400 em D2_(P), 800 em D3_(Ad) e de 200 seis meses após D3_(Ad). A tabela 7 apresenta um resumo dos maiores títulos alcançados pelos camundongos da linhagem BALB/c, onde são apresentados os títulos de IgG total detectados nas placas sensibilizadas com as duas proteínas juntas em D1_(P), D2_(P) e D3_(Ad); 6 meses após D3_(Ad) a melhor detecção foi encontrada nas placas sensibilizadas apenas com a proteína PvDBPII-MT.

A Placas sensibilizadas com DBP-MT



B Placas sensibilizadas com DBP-PA



C Placas sensibilizadas com DBP-MT + DBP-PA

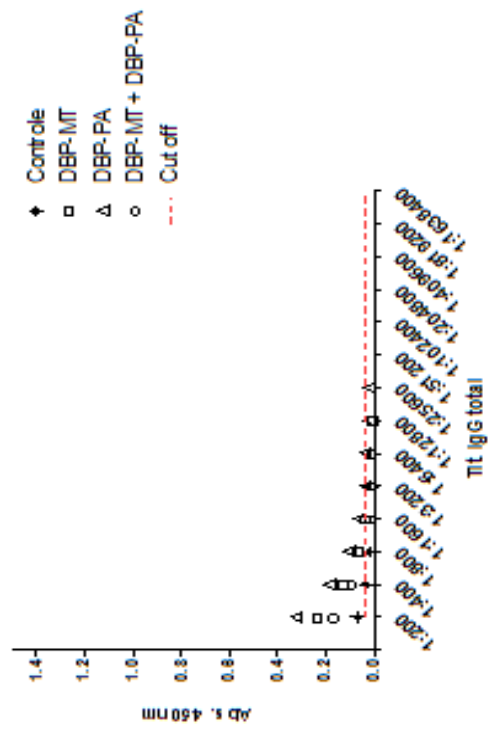


Figura 11. Títulos de IgG total em camundongos BALB/c 15 dias após a primeira dose vacinal. (A) Placas sensibilizadas com a proteína recombinante PvDBP_{II}-MT. (B) Placas sensibilizadas com a proteína recombinante PvDBP_{II}-PA. (C) Placas sensibilizadas com PvDBP_{II}-MT+PvDBP_{II}-PA. O eixo X representa o título de IgG total, que é a diluição máxima onde foram detectados anticorpos antes de atingir o *cut-off* (média das absorvâncias dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão dessas absorvâncias). O eixo Y representa os valores de absorvância em 450 nm. O grupo controle foi imunizado com PBS e Montanide (70%) em D1_(P) e D2_(P), e com AdCMV em D3_(Ad). O grupo DBP-MT foi imunizado com os antígenos administrados sob a forma de proteína recombinante PvDBP_{II}-MT em D1_(P) e D2_(P) e com o vetor adenoviral humano tipo 5 AdDBP_{II}-MT em D3_(Ad). O grupo DBP-PA foi imunizado com a proteína recombinante PvDBP_{II}-PA em D1_(P) e D2_(P) e com o vetor adenoviral AdDBP_{II}-PA em D3_(Ad). O grupo DBP-MT+DBP-PA foi imunizado com as proteínas recombinantes PvDBP_{II}-MT e PvDBP_{II}-PA juntas em D1_(P) e D2_(P) e com os vetores adenovirais AdDBP_{II}-MT e AdDBP_{II}-PA em D3_(Ad).

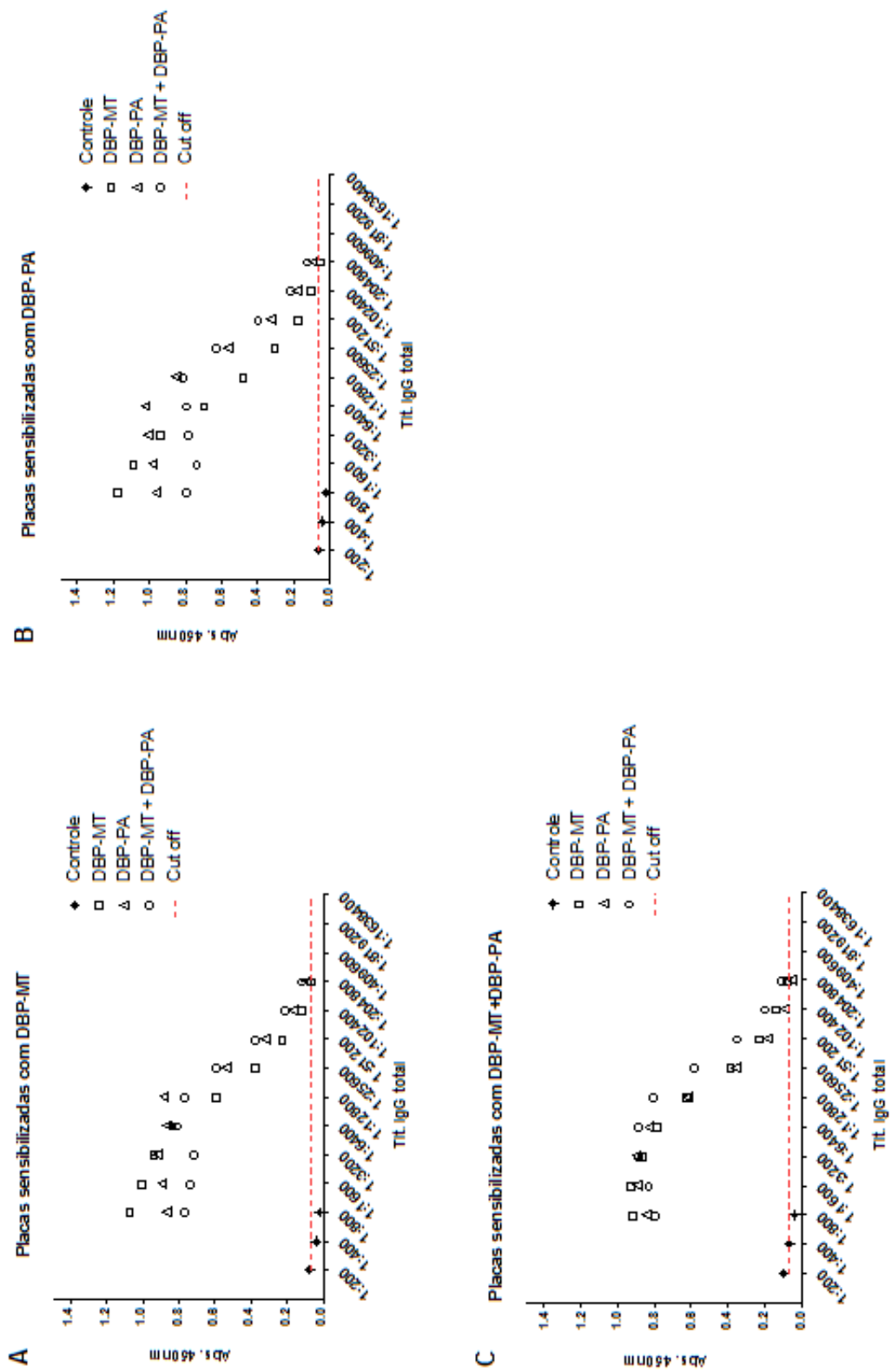


Figura 12. Títulos de anticorpos 15 dias após a segunda dose vacinal em camundongos da linhagem BALB/c. (A) Placas sensibilizadas com a proteína recombinante PvDBP_{II}-MT. (B) Placas sensibilizadas com a proteína recombinante PvDBP_{II}-PA. (C) Placas sensibilizadas com PvDBP_{II}-MT+PvDBP_{II}-PA. O eixo X representa o título de IgG total, que é a diluição máxima onde foram detectados anticorpos antes de atingir o *cut-off* (média das absorvâncias dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão dessas absorvâncias). O eixo Y representa os valores de absorvância em 450 nm. O grupo controle foi imunizado com PBS e Montanide (70%) em D1_(P) e D2_(P), e com AdCMV em D3_(Ad). O grupo DBP-MT foi imunizado com os antígenos administrados sob a forma de proteína recombinante PvDBP_{II}-MT em D1_(P) e D2_(P) e com o vetor adenoviral humano tipo 5 AdDBP_{II}-MT em D3_(Ad). O grupo DBP-PA foi imunizado com a proteína recombinante PvDBP_{II}-PA em D1_(P) e D2_(P) e com o vetor adenoviral AdDBP_{II}-PA em D3_(Ad). O grupo DBP-MT+DBP-PA foi imunizado com as proteínas recombinantes PvDBP_{II}-MT e PvDBP_{II}-PA juntas em D1_(P) e D2_(P) e com os vetores adenovirais AdDBP_{II}-MT e AdDBP_{II}-PA em D3_(Ad).

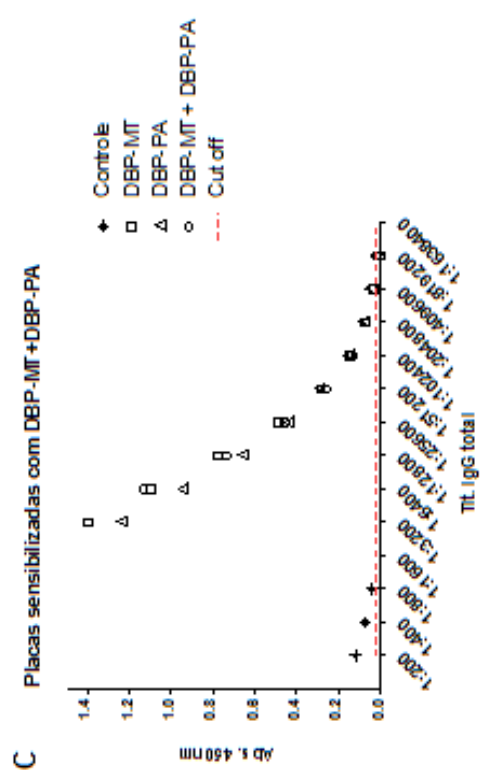
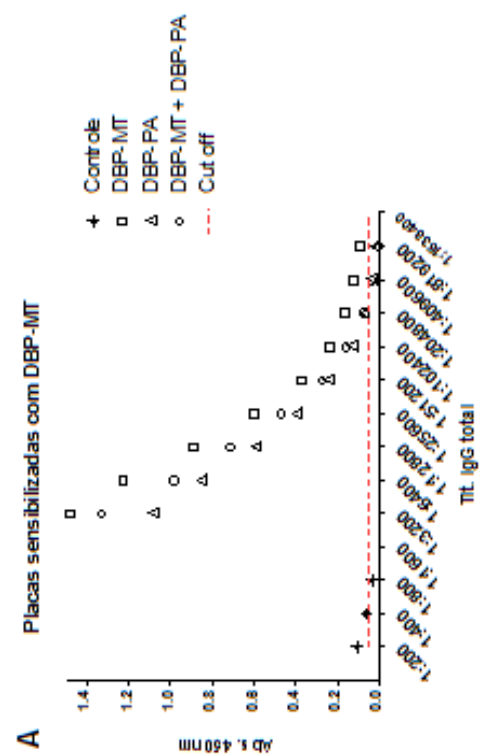
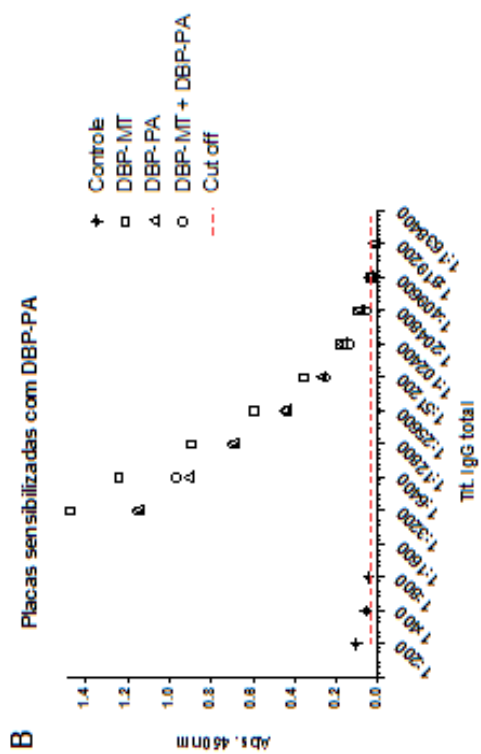


Figura 13. Títulos de anticorpos 15 dias após a terceira dose vacinal (reforço com adenovírus) em camundongos da linhagem BALB/c. (A) Placas sensibilizadas com a proteína recombinante PvDBP_{II}-MT. (B) Placas sensibilizadas com a proteína recombinante PvDBP_{II}-PA. (C) Placas sensibilizadas com PvDBP_{II}-MT+PvDBP_{II}-PA. O eixo X representa o título de IgG total, que é a diluição máxima onde foram detectados anticorpos antes de atingir o *cut-off* (média das absorvâncias dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão dessas absorvâncias). O eixo Y representa os valores de absorvância em 450 nm. O grupo controle foi imunizado com PBS e Montanide (70%) em D1_(P) e D2_(P), e com AdCMV em D3_(Ad). O grupo DBP-MT foi imunizado com os antígenos administrados sob a forma de proteína recombinante PvDBP_{II}-MT em D1_(P) e D2_(P) e com o vetor adenoviral humano tipo 5 AdDBP_{II}-MT em D3_(Ad). O grupo DBP-PA foi imunizado com a proteína recombinante PvDBP_{II}-PA em D1_(P) e D2_(P) e com o vetor adenoviral AdDBP_{II}-PA em D3_(Ad). O grupo DBP-MT+DBP-PA foi imunizado com as proteínas recombinantes PvDBP_{II}-MT e PvDBP_{II}-PA juntas em D1_(P) e D2_(P) e com os vetores adenovirais AdDBP_{II}-MT e AdDBP_{II}-PA em D3_(Ad).

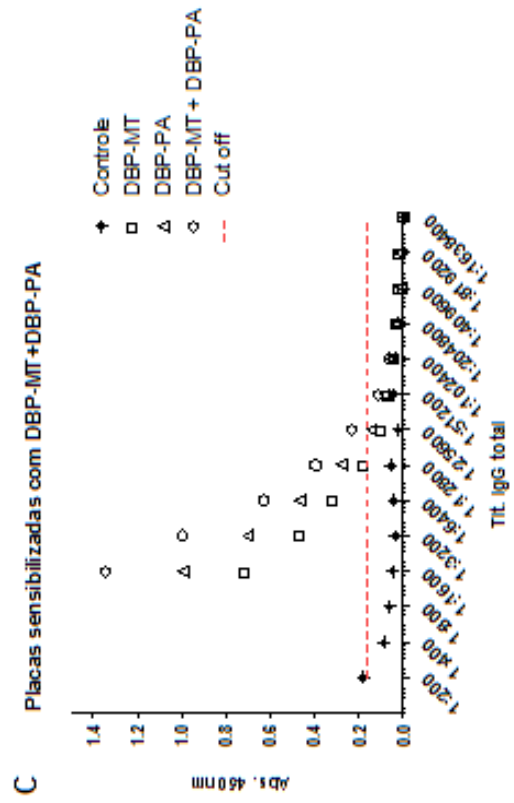
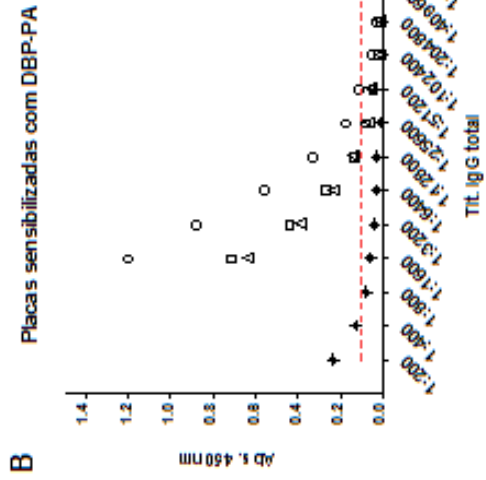
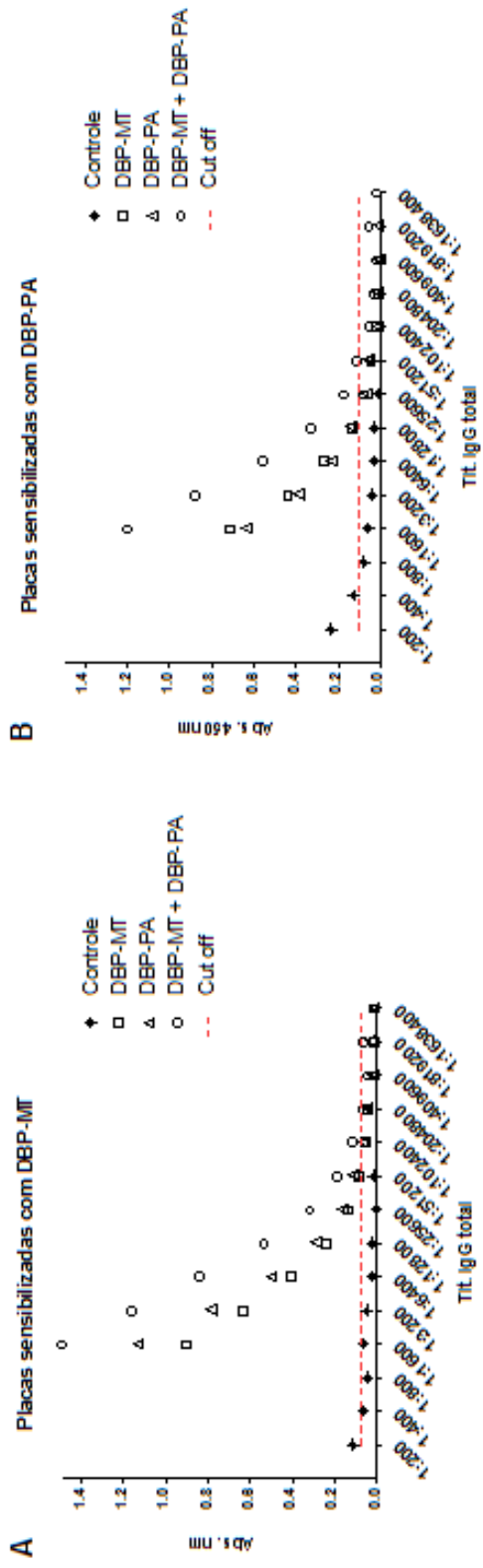


Figura 14. Títulos de anticorpos 6 meses após a terceira dose vacinal (reforço com adenovírus) em camundongos da linhagem BALB/c. (A) Placas sensibilizadas com a proteína recombinante PvDBPII-MT. (B) Placas sensibilizadas com a proteína recombinante PvDBPII-PA. (C) Placas sensibilizadas com PvDBPII-MT+PvDBPII-PA. O eixo X representa o título de IgG total, que é a diluição máxima onde foram detectados anticorpos antes de atingir o *cut-off* (média das absorvâncias dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão dessas absorvâncias). O eixo Y representa os valores de absorvância em 450 nm. O grupo controle foi imunizado com PBS e Montanide (70%) em D1_(P) e D2_(P), e com AdCMV em D3_(Ad). O grupo DBP-MT foi imunizado com os antígenos administrados sob a forma de proteína recombinante PvDBPII-MT em D1_(P) e D2_(P) e com o vetor adenoviral humano tipo 5 AdDBPII-MT em D3_(Ad). O grupo DBP-PA foi imunizado com a proteína recombinante PvDBPII-PA em D1_(P) e D2_(P) e com o vetor adenoviral AdDBPII-PA em D3_(Ad). O grupo DBP-MT+DBP-PA foi imunizado com as proteínas recombinantes PvDBPII-MT e PvDBPII-PA juntas em D1_(P) e D2_(P) e com os vetores adenovirais AdDBPII-MT e AdDBPII-PA em D3_(Ad).

Tabela 7: Resumo dos títulos de IgG total em camundongos da linhagem BALB/c em placas sensibilizadas com as duas variantes polimórficas

Grupo	Título de Ac/Dose vacinal				
	D1 _(P)	D2 _(P)	D3 _(Ad)	D3 _(Ad) (6 meses)	D3 _(Ad) (6 meses)*
Controle	200	400	800	200	200
DBP-MT	1600	204800	409600	12800	51200
DBP-PA	1600	102400	819200	12800	51200
DBP-MT+ DBP-PA	3200	204800	819200	25600	102400

D1_(P): 15 dias após a primeira dose vacinal; D2_(P): 15 dias após o primeiro reforço vacinal; D3_(Ad): 15 dias após o reforço com adenovírus; D3_(Ad)(6 meses): 6 meses após o reforço com adenovírus.*Resultados das placas sensibilizadas apenas com PvDBPII-MT.

1.17.1.3 Comparação da resposta imune humoral entre os estudos realizados

A comparação dos títulos de IgG total encontrados nos dois estudos analisados foi feita baseando-se nos resultados das placas sensibilizadas com todas as proteínas utilizadas nas imunizações, as quais apresentaram a melhor detecção de anticorpos. Para os grupos do presente estudo foram utilizadas as dosagens com as sensibilizações de placa com as proteínas DBP-MT+DBP-PA (placas sensibilizadas com 0,25µg de cada proteína por poço) e para o estudo envolvendo as quatro proteínas foram utilizadas as sensibilizações com DBP-MT+DBP-PA+AMA-1+MSP-1 (placas sensibilizadas com 1,25µg de cada proteína por poço).

Os grupos analisados foram **DBP-MT** (recebeu PvDBPII-MT em D1_(P) e D2_(P), AdPvDBPII-MT em D3_(Ad)), **DBP-PA** (recebeu PvDBPII-PA em D1_(P) e D2_(P), AdPvDBPII-PA em D3_(Ad)) e **DBP-MT+DBP-PA** (recebeu PvDBPII-MT+PvDBPII-PA em D1_(P) e D2_(P), AdPvDBPII-MT+AdPvDBPII-PA em D3_(Ad)) provenientes deste estudo e os grupos **4 proteínas+montanide** (recebeu PvDBPII-MT+PvDBPII-PA+AMA-1+MSP-1 em D1_(P) e D2_(P), AdPvDBPII-MT+AdPvDBPII-PA+AdAMA-1 +AdMSP-1 em D3_(Ad), utilizando o adjuvante montanide ISA 720) e **4 proteínas+MPLA+Alum** (recebeu PvDBPII-MT+PvDBPII-PA+AMA-1+MSP-1 em D1_(P) e D2_(P), AdPvDBPII-MT+AdPvDBPII-PA+AdAMA-1+AdMSP-1 em D3_(Ad), utilizando os adjuvantes MPLA+Alum) provenientes do estudo envolvendo as quatro proteínas.

Quinze dias após D1_(P) os maiores títulos de anticorpos foram atingidos pelo grupo DBP-MT+DBP-PA (3200), seguido pelos grupos DBP-MT e DBP-PA (1600 para ambos). Os grupos 4 proteínas+montanide e 4 proteínas+MPLA+Alum atingiram títulos de IgG total de 800. Quinze dias após D2_(P), os grupos DBP-MT e DBP-MT+DBP-PA obtiveram títulos de IgG de 204800, seguidos por DBP-PA com 102400, 4 proteínas+montanide com 51200 e 4 proteínas+MPLA+Alum com 25600. Quinze dias após D3_(Ad) os grupos DBP-PA e DBP-MT+DBP-PA alcançaram títulos de 819200, o grupo DBP-MT obteve 409600, 4 proteínas+montanide obteve 204800 e, por último, 4 proteínas+MPLA+Alum atingiu o título de 102400.

Não foi possível comparar os títulos de IgG total seis meses após a última dose vacinal, pois esta dosagem não foi feita no estudo envolvendo a associação das quatro proteínas. Um resumo desses resultados pode ser visto na figura 14.

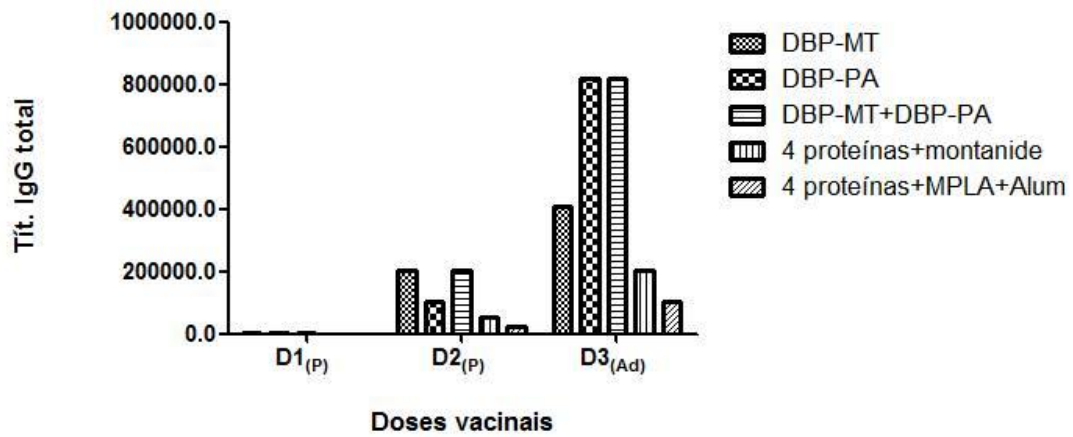


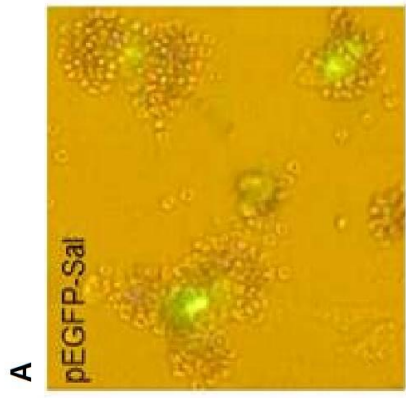
Figura 15. Comparação dos títulos de IgG total entre os grupos vacinais deste estudo e do estudo com as quatro proteínas. D1_(P) mostra os títulos 15 dias após a primeira dose vacinal, D2_(P) mostra os títulos de IgG 15 dias após a segunda dose vacinal e D3_(Ad) mostra os títulos 15 dias após o reforço vacinal com adenovírus.

1.17.2 Inibição da ligação ao eritrócito

Devido à impossibilidade de desafiar com *P. vivax* os camundongos imunizados, foi feito um teste funcional de inibição da capacidade de ligação da proteína DBP aos eritrócitos. Para isto foram utilizadas células COS-7 transfectadas com o plasmídeo pEGFP-Sall, o qual é capaz de expressar a proteína PvDBPII-Sall, homóloga à PvDBPII, na superfície das células transfectadas e a proteína fluorescente GFP em seu interior. Este teste foi qualitativo e realizado apenas para os camundongos da linhagem BALB/c.

O ensaio foi realizado 48 horas após a transfecção das células COS-7. Os soros utilizados foram os de 15 dias após D3_(Ad) para todos os grupos vacinais deste estudo (DBP-MT, DBP-PA e DBP-MT+DBP-PA) e também o soro de 15 dias após D3_(Ad) de camundongos imunizados com as quatro proteínas (PvDBPII-MT+PvDBPII-PA+AMA-1+MSP-1) com o adjuvante montanide ISA 720 .

As células transfectadas com o plasmídeo pEGFP vazio expressaram a proteína verde fluorescente GFP em seu interior, mas não houve ligação aos eritrócitos pois não expressaram PvDBPII-Sall em sua superfície. Nas células transfectadas com pEGFP-Sall e não tratadas com soro dos camundongos imunizados foi possível observar a ligação dos eritrócitos, apesar de muitos deles haverem se desprendido durante o manuseio das lâminas de microscopia, não sendo possível observar rosetas clássicas. Nas células transfectadas com pEGFP-Sall e tratadas com o soro dos camundongos imunizados não ocorreu ligação aos eritrócitos em nenhum dos grupos vacinais estudados, indicando que os anticorpos induzidos pela vacinação foram capazes de bloquear a ligação da proteína PvDBPII aos eritrócitos Duffy positivos (figura 15).



Exemplo de roseta típica

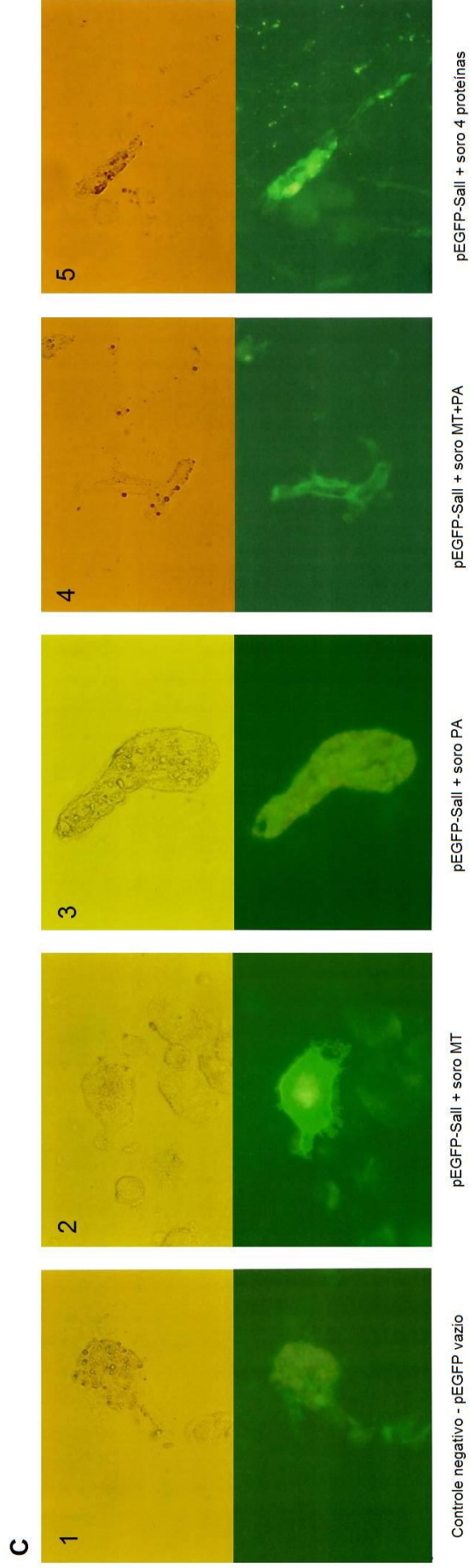
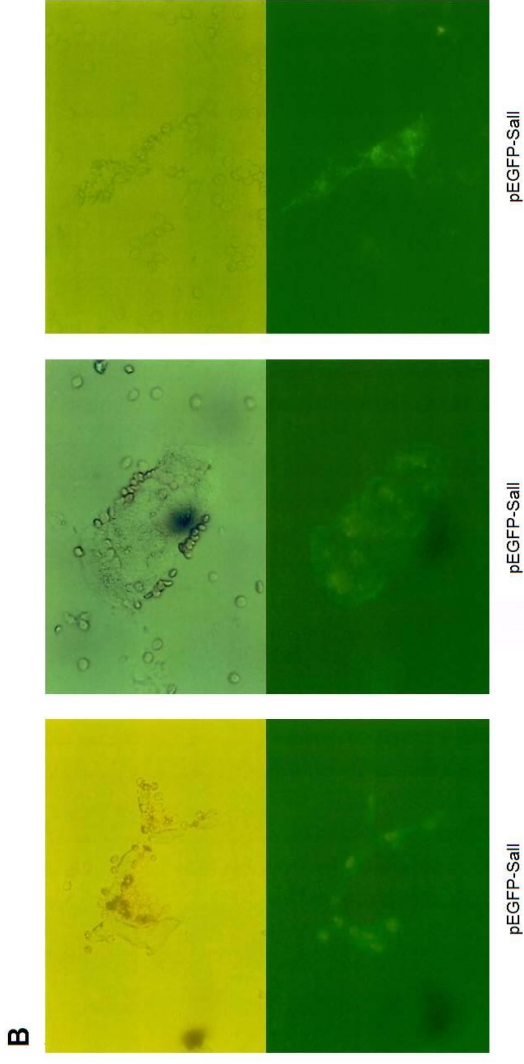


Figura 16: Ensaio de inibição da ligação ao eritrócito. (A) Exemplo de células transfectadas com o plasmídeo pEGFP-Sall. As células expressam a proteína GFP em seu interior e a proteína PvDBP-II-Sall na superfície, ocorrendo ligação aos eritrócitos Duffy positivos, com consequente formação de rosetas (resultado do trabalho da Dra. Marisa Cristina da Fonseca Casteluber). B e C são resultados do presente estudo. (B) Células transfectadas com o plasmídeo pEGFP-Sall. Ocorre expressão de GFP no interior da célula e PvDBP-II-Sall na superfície, onde é possível verificar a ligação dos eritrócitos Duffy positivos. (C) Células transfectadas com pEGFP (C.1) e pEGFP-Sall tratadas previamente com soro dos camundongos imunizados com a proteína PvDBP-II-MT (C.2), com soro dos camundongos imunizados com a proteína PvDBP-II-PA (C.3), com soro dos camundongos imunizados com as proteínas PvDBP-II-MT+PvDBP-II-PA (C.4) e com as proteínas PvDBP-II-MT+PvDBP-II-PA+AMA-1+MSP-1 (C.5). Em C.1 as células expressam GFP em seu interior, porém não há expressão de PvDBP-II-Sall na superfície, não ocorrendo ligação aos eritrócitos. Em C.2-C.5 as células expressam GFP em seu interior e PvDBP-II-Sall na superfície, mas não ocorre ligação aos eritrócitos, demonstrando que os anticorpos presentes no soro foram capazes de inibir essa ligação. Em B e C a parte superior da figura mostra as células sob microscopia óptica simples, enquanto a parte inferior mostra as mesmas células sob microscopia de fluorescência.

Discussão

A malária é uma doença parasitária que atinge muitos países, sendo um dos maiores desafios da saúde pública mundial. No Brasil, a doença é provocada principalmente pelo *Plasmodium vivax*, o qual necessita de interações específicas entre proteínas do parasito e receptores da superfície celular para que ocorra a invasão dos eritrócitos, sendo crucial a participação da DBP neste processo (Adams et al. 1992; Gaur et al. 2004; VanBuskirk et al. 2004), o que faz desta proteína do parasito um alvo vacinal bastante promissor. Os estudos de Sousa e colaboradores (2006) verificaram a existência de diferentes variações polimórficas no sítio de ligação da DBP ao receptor DARC dos eritrócitos na região Amazônica brasileira (AM, MT e PA). Em seu trabalho de doutorado em nosso grupo, a Dra. Marisa Cristina da Fonseca Casteluber propôs a utilização dos polimorfismos MT e PA para o desenvolvimento de uma vacina, visto que a variação AM contribuía com apenas um resíduo polimórfico, o qual não parecia ser relevante para a formação de epítopo para reconhecimento por anticorpos.

Uma vacina de eficácia duradoura deve estimular tanto respostas humorais quanto celulares de memória. Para isso, foi escolhido um protocolo de vacinação dose-reforço heterólogo, onde os animais receberam duas doses de proteína recombinante conjugada ao adjuvante Montanide ISA 720, e um reforço vacinal com adenovírus humano recombinante tipo 5 expressando a DBP. Neste tipo de protocolo vacinal, a formulação da proteína em adjuvante é capaz de ativar células apresentadoras de antígenos (APCs), dentre elas as células B produtoras de anticorpos, que junto a outros componentes do sistema imune (macrófagos e células dendríticas) são capazes também, ainda que em menor medida, de estimular respostas mediadas por células T CD4+ (liberação de citocinas que dão suporte aos linfócitos B) e CD8+ (cujas funções são a lise de células com MHC-I infectadas, de menor importância no caso da DBP pois essa só é expressa em eritrócitos, que não possuem MHC) efetoras e de memória. O adenovírus expressando a proteína exógena também ativa APCs, levando neste caso a uma maior atividade das células T (maior secreção de citocinas proliferativas e citotóxicas, dentre elas o IFN γ e o TNF, e maior citotoxicidade (Almeida and Bruna-Romero 2011). Esta atuação sinérgica proteína-adenovírus também gera uma maior memória imune (Bouillet et al. 2011), que é o tipo de resposta imune mais relevante em qualquer processo de vacinação.

No presente estudo, de maneira geral, é possível afirmar que os grupos vacinais DBP-PA e DBP-MT+DBP-PA equipararam-se quanto aos títulos de IgG total produzidos. Porém, seis meses após a última dose vacinal, os camundongos imunizados com a combinação das duas proteínas apresentaram os maiores títulos de anticorpos em ambas as linhagens. Na linhagem Swiss, 15 dias após D3_(Ad) os maiores títulos de anticorpos foram atingidos pelo grupo que recebeu apenas a proteína PvDBPII-MT, porém 6 meses após D3_(Ad) estes títulos caíram. Por outro lado, os camundongos imunizados apenas com PvDBPII-PA e com a combinação das duas proteínas apresentaram títulos uma diluição mais baixos do que DBP-MT 15 dias após D3_(Ad), mas mantiveram este mesmo título após 6 meses, enquanto os camundongos imunizados com PvDBPII-MT isoladamente apresentaram uma queda de duas diluições no título de anticorpos apresentado. Na linhagem BALB/c, os camundongos imunizados com PvDBPII-PA e com PvDBPII-MT+PvDBPII-PA obtiveram os maiores títulos de anticorpos 15 dias após D3_(Ad). Porém, 6 meses após D3_(Ad) os títulos de anticorpos de todos os grupos vacinais analisados caíram, e o grupo que recebeu a combinação das duas proteínas apresentou títulos maiores do que DBP-MT e DBP-PA. Desta forma podemos concluir que, apesar de não apresentar uma diferença significativa nos títulos de anticorpos produzidos, a combinação das duas proteínas parece exercer um efeito sinérgico, mostrando-se mais eficaz na manutenção dos níveis de anticorpos produzidos, corroborando os resultados de Casteluber (2010). A explicação imunológica e molecular deste efeito sinérgico inesperado dos dois polimorfismos (porquanto que a quantidade total de proteína inoculada em todos os animais foi equivalente em todos os casos) constituirá objeto de estudo de futuros trabalhos.

Como nem sempre altos títulos de anticorpos se traduzem em imunidade protetora, foi necessário utilizar um teste adicional para verificar se os anticorpos produzidos eram funcionais. O teste de inibição da ligação aos eritrócitos foi um teste qualitativo aplicado para os soros dos camundongos da linhagem BALB/c 15 dias após D3_(Ad). Neste teste foi analisada a capacidade de bloqueio da ligação da proteína DBP ao receptor DARC na superfície dos eritrócitos Duffy positivos pelos anticorpos produzidos após o último reforço vacinal. Os três protocolos de imunização testados foram capazes de estimular a produção de anticorpos capazes de inibir a interação da DBP de *P. vivax* com o receptor DARC dos eritrócitos, demonstrando que esses anticorpos eram funcionais. O mesmo já havia sido observado por Casteluber (2010). Os anticorpos produzidos pelos animais que receberam a formulação contendo a associação das quatro proteínas (PvDBPII-MT+PvDBPII-PA+AMA-1+MSP-1) com o adjuvante montanide ISA 720 também foram capazes de inibir a ligação da proteína aos eritrócitos Duffy positivos. Cerávolo e colaboradores (2008) utilizaram este mesmo ensaio para verificar que os anticorpos anti-PvDBP presentes no soro de pacientes

de áreas endêmicas da Amazônia brasileira eram capazes de bloquear a interação PvDBPII com o receptor DARC dos eritrócitos. Yazdani e colaboradores (2004b) também verificaram que camundongos BALB/c imunizados com PvRII (região II recombinante da DBP de *P. vivax*, sem especificação de polimorfismos) e o adjuvante montanide ISA 720 foram capazes de produzir anticorpos funcionais que bloqueavam esta ligação.

No que diz respeito à comparação entre os adjuvantes montanide ISA 720 e MPLA+Alum, as dosagens de anticorpos IgG produzidos nos mostraram que o adjuvante montanide foi capaz de intensificar o estímulo ao sistema imune mais fortemente do que a associação dos adjuvantes MPLA e Alum. Em um estudo comparando montanide ISA 720 e outros adjuvantes com a proteína MSP-1, Hui e Hashimoto (2008) encontraram as maiores respostas de anticorpos nos adjuvantes montanide e MF59, tanto em camundongos BALB/c selvagens, quanto em camundongos *knock out* para a produção de IFN γ ou de IL-4, MPL também foi incluído no estudo citado, obtendo menor resposta, mas não estava conjugado a Alum. Em estudo utilizando a região II da DBP de *P. vivax*, Yazdani e colaboradores (2004b) encontraram maiores títulos de anticorpos utilizando o adjuvante montanide ISA 720, seguido de AS02A e Alum. Porém, como a resposta humoral é apenas parte da resposta imune protetora, não seria prudente nos basearmos somente nos títulos de anticorpos para afirmar que um adjuvante vacinal seja melhor que o outro, mas isto já se mostra um bom indicativo de uma maior capacidade de interação com o sistema imune.

Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que:

- O antígeno é imunógeno e entre as duas variantes utilizadas neste estudo, PA parece sensibilizar de forma mais intensa o sistema imune, porém verificou-se que a administração dos dois polimorfismos em conjunto é capaz de manter os níveis de resposta mais altos do que a administração das duas formas separadas, corroborando resultados anteriores obtidos por nosso grupo (Casteluber 2010).
- A sensibilização das placas com os dois polimorfismos em conjunto apresentou uma sensibilidade maior para a detecção dos anticorpos produzidos após as imunizações.
- Os anticorpos produzidos após a administração de vacinas contendo as variantes polimórficas MT e PA da proteína DBP de *Plasmodium vivax* utilizando o adjuvante vacinal montanide ISA 720 e o vetor adenoviral humano do tipo 5 são funcionais.
- O uso do adjuvante vacinal montanide ISA 720 é capaz de estimular a resposta imune de forma mais intensa do que os adjuvantes MPLA e Alum, levando a crer que este adjuvante deveria ser considerado mais uma opção para o desenvolvimento de novas vacinas, visto que em nossas mãos sempre apresentou boa tolerância e segurança nos modelos estudados.

Perspectivas

Novas imunizações deveriam ser realizadas para estudar a resposta celular de memória promovida por estes protocolos vacinais, pesquisando-se o perfil de citocinas produzidas e a proliferação de linfócitos após as imunizações, a fim de que se possa determinar se os antígenos em questão possuem a capacidade de ativar os linfócitos T CD4 específicos.

Referências Bibliográficas

- Adams, J. H., et al. (1992), 'A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (15), 7085-9.
- Aikawa, M., et al. (1981), 'The protective antigen of malarial sporozoites (*Plasmodium berghei*) is a differentiation antigen', *J Immunol*, 126 (6), 2494-5.
- Almeida, A. P. and Bruna-Romero, O. (2011), 'Synergism/complementarity of recombinant adenoviral vectors and other vaccination platforms during induction of protective immunity against malaria', *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106 Suppl 1, 193-201.
- Amino, R., et al. (2006a), 'Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host', *C R Biol*, 329 (11), 858-62.
- (2006b), 'Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal.', *Nature Med.*, 12, 220-24.
- Arevalo-Herrera, M., et al. (2011), 'Preclinical vaccine study of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein derived-synthetic polypeptides formulated in montanide ISA 720 and montanide ISA 51 adjuvants', *Am J Trop Med Hyg*, 84 (2 Suppl), 21-7.
- Bangari, D. S. and Mittal, S. K. (2006), 'Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity', *Curr Gene Ther*, 6 (2), 215-26.
- Bouillet, L. E., et al. (2011), 'Long-term humoral and cellular immune responses elicited by a heterologous *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 protein prime/adenovirus boost immunization protocol', *Infect Immun*, 79 (9), 3642-52.
- Carlton, J. M., et al. (2008), 'Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*', *Nature*, 455 (7214), 757-63.

- Carter, R. and Mendis, K. N. (2002), 'Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria', *Clin Microbiol Rev*, 15 (4), 564-94.
- Casteluber, Marisa Cristina da Fonseca (2010), *Tese de Doutorado* (Belo Horizonte, MG, Brasil).
- Ceravolo, I. P., Souza-Silva, F. A., and Fontes, C. J. (2008), 'Inhibitory properties of the antibody response to Plasmodium vivax Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission', *Scandinavian Journal of Immunology*, 3 (67), 270-78.
- Choe, H., et al. (2005), 'Sulphated tyrosines mediate association of chemokines and Plasmodium vivax Duffy binding protein with the Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC)', *Mol Microbiol*, 55 (5), 1413-22.
- Clyde, D. F. (1975), 'Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites', *Am J Trop Med Hyg*, 24 (3), 397-401.
- Coffman, R. L., Sher, A., and Seder, R. A. (2010), 'Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work', *Immunity*, 33 (4), 492-503.
- Dubovsky, F., Moree, M., and Rabinovich, R. (2002), 'Malaria vaccines: orphans in transition', *Dev Biol (Basel)*, 110, 47-53.
- Enomoto, M., et al. (2012), 'Blockage of Spontaneous Ca²⁺ Oscillation Causes Cell Death in Intraerythrocytic Plasmodium falciparum', *PLoS One*, 7 (7), e39499.
- Fraser, T. S., Kappe, S. H. I., and Narum, D. L. (2001), 'Erythrocyte-binding activity of Plasmodium yoelli apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 49-59.
- Garcia-Basteiro, A. L., Bassat, Q., and Alonso, P. L. (2012), 'Approaching the target: the path towards an effective malaria vaccine', *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 4 (1), e2012015.

- Gaur, D., Mayer, D. C., and Miller, L. H. (2004), 'Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by Plasmodium merozoites', *Int J Parasitol*, 34 (13-14), 1413-29.
- Gosi, P., et al. (2008), 'Polymorphism patterns in Duffy-binding protein among Thai Plasmodium vivax isolates', *Malar J*, 7, 112.
- Hui, G. S. and Hashimoto, C. N. (2008), 'Adjuvant formulations possess differing efficacy in the potentiation of antibody and cell mediated responses to a human malaria vaccine under selective immune genes knockout environment', *Int Immunopharmacol*, 8 (7), 1012-22.
- Hulden, L. (2011), 'Activation of the hypnozoite: a part of Plasmodium vivax life cycle and survival', *Malar J*, 10, 90.
- Kumar, K. A., et al. (2006), 'The circumsporozoite protein is an immunodominant protective antigen in irradiated sporozoites', *Nature*, 444 (7121), 937-40.
- Li, S., et al. (1993), 'Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (11), 5214-8.
- Lu, S. (2009), 'Heterologous prime-boost vaccination', *Curr Opin Immunol*, 21 (3), 346-51.
- Mendis, K., et al. (2001), 'The neglected burden of Plasmodium vivax malaria', *Am J Trop Med Hyg*, 64 (1-2 Suppl), 97-106.
- Michon, P., Fraser, T., and Adams, J. H. (2000), 'Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the Plasmodium vivax Duffy binding protein', *Infect Immun*, 68 (6), 3164-71.
- Miyaji, E. N., et al. (2011), 'Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants', *Braz J Med Biol Res*, 44 (6), 500-13.

- Nussenzweig, R. S. and Long, C. A. (1994), 'Malaria vaccines: multiple targets', *Science*, 265 (5177), 1381-3.
- Nussenzweig, R. S., et al. (1967), 'Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei', *Nature*, 216 (5111), 160-2.
- Oliveira-Ferreira, J., et al. (2010), 'Malaria in Brazil: an overview', *Malar J*, 9, 115.
- Schagen, F. H., et al. (2004), 'Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion', *Crit Rev Oncol Hematol*, 50 (1), 51-70.
- Sousa, T. N., et al. (2006), 'The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among Plasmodium vivax isolates from the Brazilian Amazon area', *Mol Biochem Parasitol*, 146 (2), 251-4.
- Sturm, A., et al. (2006), 'Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids', *Science*, 1287-90.
- VanBuskirk, K. M., Sevova, E., and Adams, J. H. (2004), 'Conserved residues in the Plasmodium vivax Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (44), 15754-9.
- WHO (2012), *World Health Organization - Global Health Observatory (GHO)*.
- Woodland, D. L. (2004), 'Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age', *Trends Immunol*, 25 (2), 98-104.
- Wykes, M. N., et al. (2011), 'Rodent blood-stage Plasmodium survive in dendritic cells that infect naive mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (27), 11205-10.
- Yamauchi, L. M., et al. (2007), 'Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site', *Cell Microbiol*, 9 (5), 1215-22.

Yazdani, S. S., Shakri, A. R., and Chitnis, C. E. (2004a), 'A high cell density fermentation strategy to produce recombinant malarial antigen in *E. coli*', *Biotechnol Lett*, 26 (24), 1891-5.

Yazdani, S. S., et al. (2004b), 'Evaluation of immune responses elicited in mice against a recombinant malaria vaccine based on *Plasmodium vivax* Duffy binding protein', *Vaccine*, 22 (27-28), 3727-37.

Yoshida, N., et al. (1981), 'Biosynthesis of Pb44, the protective antigen of sporozoites of *Plasmodium berghei*', *J Exp Med*, 154 (4), 1225-36.

--- (1980), 'Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite', *Science*, 207 (4426), 71-3.