



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS.

Sthefany Pagliari

Imunogenicidade e proteção frente ao desafio por parasitas transgênicos *Plasmodium berghei* [*CS vivax*] induzidas em camundongos pelo candidato vacinal antimalárico HBcAgPvCS formulado em diferentes adjuvantes.

FLORIANÓPOLIS
2019

Sthefany Pagliari

Imunogenicidade e proteção frente ao desafio por parasitas transgênicos *Plasmodium berghei* [CS vivax] induzidas em camundongos pelo candidato vacinal antimalárico HBcAgPvCS formulado em diferentes adjuvantes.

Tese submetida ao Programa de Pós graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biociências
Orientador: Prof. Dr. Oscar Bruna Romero.

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pagliari, Sthefany
Imunogenicidade e proteção frente ao desafio por
parasitas transgênicos *Plasmodium berghei* [CS vivax]
induzidas em camundongos pelo candidato vacinal
antimalárico HBcAgPvCS formulado em diferentes adjuvantes.
/ Sthefany Pagliari ; orientador, Oscar Bruna-Romero, 2019.
111 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Vacinas. 3.
Adjuvantes. 4. Virus Like-particles. 5. Malária. I. Bruna
Romero, Oscar. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.
III. Título.

Sthefany Pagliari

Imunogenicidade e proteção frente ao desafio por parasitas transgênicos *Plasmodium berghei* [CS vivax] induzidas em camundongos pelo candidato vacinal antimalárico HBcAgPvCS formulado em diferentes adjuvantes.

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a), Dr(a). Letusa Albrecht
Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz)

Prof.(a), Dr(a). Thais Cristine Marques Sincero
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Mário Steindel
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Biotecnologia e Biociência.

Prof. Dr.Glauber Wagner
Coordenador(a) do Programa

Prof. Dr.Oscar Bruna Romero
Orientador

Florianópolis 11 de setembro de 2019.

Dedico esta tese a todas as mulheres que lutaram pela igualdade e principalmente as cientistas que por muitos anos trabalharam sem o devido reconhecimento.

AGRADECIMENTOS

Sempre em primeiro lugar, agradeço a Deus pela vida e todas as conquistas alcançadas.

Aos meu pais, por toda dedicação, carinho, preocupação, cuidado e amor proporcionado. Pai obrigada por todo esforço em proporcionar a melhor educação para seus filhos. Mãe, obrigada por sempre me apoiar, incentivar e me acalmar. Obrigada por terem me escolhido, amo vocês. Esse título é nosso.

Ao meu irmão Matheus por ter ficado com meus pais, cuidando deles nesses mais de 10 anos da minha ausência.

Minha eterna gratidão ao Prof. Dr. Oscar Bruna Romero por ter aceitado me orientar, por sempre me incentivar a buscar novos horizontes e ainda por me abrir portas tão inesperadas, porém tão desejada. Profe, MUITO obrigada!!

Com todo carinho, gostaria de agradecer em especial ao Prof. Dr. Mauricio Mauricio Rodrigues (in memoriam), a Irene Soares e a Vítor e Ruth Nussenzweig (in memoriam) por todos os ensinamentos ao grupo, e por ceder reagentes da proteína CS de incalculável valor científico.

Ao mestre Thiago Pedro Malkowski pela ajuda nas edições nas figuras contidas neste trabalho e pela paciência durante esse percurso, você foi muito importante na minha vida pessoal e profissional (jamais te esquecerei), obrigada.

A minha amiguinha Camila Daminelli Schissi, pela amizade linda que construímos durante nossa jornada na UFSC e que continua atravessando a ilha. A Laurita Boff, minha outra amiguinha, obrigada pelo RU de todo dia. O LVA /corredor não tem graça sem vocês!

Ao Dr. Carlos Carrillo que me fez tanta companhia durante nossos dias de purificação de proteína no LIA!! Obrigada pela amizade e pelas inúmeras risadas!!

Aos colegas que passaram ou ainda estão pela UFSC, mas que levo para a vida: Lara, Naira, Wellington, Anna, Greice, Jessica, Aline, Livia, levo muito aprendizado de cada um de vocês.

Aos técnicos do LAMEB por sempre me receberem tão bem, por me ajudarem sempre, além das risadas, biscoitos e doces de leite durante esses anos.

À Leila (nosso braço direito e esquerdo do biotério), obrigada pelas conversas durante os dias de “castigo” ou melhor autoclavação!! Obrigada pela dedicação com nós e com os animais.

Ao professor Admir José Giachini, por ter gentilmente cedido a cepa de *E.coli* BL21(DE3).

Aos professores Aguinaldo Roberto Pinto, Carlos Rodrigo Zarate Blades por todo o aprendizado, pelas discussões em seminários de laboratório e por compartilhar tanto o espaço físico como insumos necessários para podermos fazer nossas pesquisas.

À Dr, Ana Paula Moraes, por ter disponibilizado os plasmídeos contendo a VLP HBcAgCS-VK210.

Aos professores do MIP, Mario Steindel, Edmundo Grisard, Patrícia Stocco e Glauber Wagner pela ajuda dada sempre que solicitada. Com certeza vocês também de alguma forma fazem parte dessa conquista.

Ao professor Daniel Mansur, por ter cedido alíquotas da citocina IL2.

Ao pessoal da Secretaria Integrada de Pós-Graduação (SIPG), que sempre prontamente resolveram meus problemas.

Ao professor Arturo Reyes-Sandoval primeiramente por aceitar me receber em seu laboratório e ainda por toda a atenção e preocupação dedicada durante meu estágio sanduiche. Foram 6 meses muito intensos, porém de extremo aprendizado e momentos memoráveis. Obrigada por todo conhecimento repassado, e ainda, por toda sensibilidade demonstrada em cada palavra direcionada a mim.

À Barbara Dema Jimenes e Lorena Preciado, minhas nice pretty girls, jamais serei grata o suficiente por tudo que fizeram por mim em Oxford. Minha vida pode ser dividida em antes de Oxford e depois de Oxford. Vocês são seres incríveis, OBRIGADA!!!

Ao Gerardo Montalvo, por ter me recebido tão bem, mesmo antes de eu ter chegado em Oxford. Obrigada pelas noites no college, pelos passeios no parque e por me fazer pegar o trem errado 4 vezes. Miss you gordinho!!!

Ao colegas de Oxford Gilles Augusto, Cesar Lopes Camacho, Young Chan David Kim, Ahmed Salman, Louisa Marie Rose, obrigada pela parceria, trabalho, amizade e conselhos científicos.

RESUMO

A prática da imunização influenciou grandemente o aumento da expectativa de vida mundial, representando a estratégia de intervenção com a melhor relação custo-benefício até hoje aplicada em saúde pública. Novas tecnologias vêm permitindo o desenvolvimento de vacinas mais seguras e eficazes, sendo o estudo de novos adjuvantes o que recebe na atualidade os maiores esforços de pesquisa. O uso de plataformas pseudo-virais não infecciosas (VLPs) como adjuvantes nanoparticulados carregadores de antígenos heterólogos pouco imunogênicos tem atraído muita atenção, resultando até o momento em três vacinas humanas já comercializadas. A vacina antimalárica RTS,S, a primeira contra esta doença disponível comercialmente, é um exemplo de uma vacina que alia uma VLP a outros adjuvantes para geração de intensa imunidade (apesar de baixa proteção) contra *Plasmodium falciparum*. A malária por *Plasmodium vivax*, segunda espécie epidemiologicamente mais relevante a nível mundial e que atinge ao Brasil mais diretamente, com cerca de 80% dos novos casos, não tem vacina. A fim de ajudar a reverter este problema, construímos um candidato vacinal contra *P. vivax* baseado na plataforma VLP do antígeno do cerne do vírus da Hepatite B (HBcAg) e na proteína circunsporozoita (CS) do parasito. Este candidato, HBcAgPvCS-VK247, dirigido contra a variante VK-247 do parasito foi capaz de gerar partículas pseudovirais com a estrutura tridimensional esperada e com reatividade imunológica equivalente àquela da proteína original parasitária. Quando aliado aos adjuvantes MPLA de *Bordetella pertussis* e Alhydrogel, tanto este candidato quanto um segundo candidato, o HBcAgPvCS-VK210 dirigido contra a segunda variante mais prevalente da proteína parasitaria, foram eficientes na geração de anticorpos IgG, e também de suas subclasses. Pela sua melhor caracterização prévia, a VLP HBcAgPvCS-VK210 foi testada em uma segunda formulação, com os adjuvantes Poly I:C e AddaVax. Os resultados mostram que as duas formulações foram muito eficientes para induzir anticorpos específicos IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 contra as repetições centrais da proteína CS, e também induziram a produção de citocinas TNF, IFN- γ , IL-5, IL-4 e IL-2 após estimulação específica. No ensaio mais crítico para uma vacina, isto é, ao avaliar a proteção frente ao desafio utilizando parasitas transgênicos *P. berghei* [CS *vivax*] vivos, o candidato HBcAgPvCS-VK210 foi capaz de proteger 83% dos animais vacinados, sendo a formulação que contem Poly I:C e AddaVax a mais eficaz. O conjunto de resultados obtidos *in vivo* são altamente promissores, e asseguram futuros estudos com as VLPs construídas a fim de conseguir uma formulação antimalárica universal contra a infecção por *P. vivax*.

Palavras-chave: Vacinas 1. Adjuvantes 2. Virus Like-particles 3. Malária 4.

ABSTRACT

Immunization greatly influenced the global increase in life expectancy, representing the Public Health practice with the best cost-benefit balance applied until today. New technologies are allowing the development of safer and more efficient vaccines, and amongst them the study of new adjuvants involve most current research efforts. Virus-like particles (VLPs) are nanoparticulate carrier adjuvants for low immunogenicity heterologous antigens, and three human commercial vaccines are based on this platform. Malaria vaccine RTS,S, the first commercially-available candidate against this disease is an example of a VLP-based vaccine that generates intense immunogenicity (although limited protection) against *Plasmodium falciparum*. *Plasmodium vivax*, the second most-prevalent human malaria species that is responsible for nearly 80% of new malaria cases in Brazil, has no vaccine available. To reverse this problem, we generated a candidate vaccine against *P. vivax* based on hepatitis B virus core antigen (HBcAg) virus-like particles and the circumsporozoite protein of the parasite. The candidate, termed HBcAgPvCS-VK247, is directed against the parasite's VK-247 variant CS repeats. HBcAgPvCS-VK247 displayed a correct 3D structure by electron microscopy and an immune reactivity equivalent to that of the full-length parasite protein. When formulated into *Bordetella pertussis* MPLA plus Alhydrogel, both this candidate as well as a second one, HBcAgPvCS-VK210, built against the second more prevalent CS variant (VK-210), were very efficient in generating specific IgGs as well as most subclasses of antibodies. In face of a better previous characterization of the particle, HBcAgPvCS-VK210 was also tested in a second formulation with adjuvants Poly I:C e AddaVax. Results show that both formulations were very efficient in inducing specific IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 antibodies against CS's central repeats, and also induced TNF, IFN- γ , IL-5, IL-4 e IL-2 in mouse lymphocytes after specific restimulation. When tested in the most critical vaccine assay, i.e. a challenge with *P. berghei* [*CS vivax*] live transgenic parasites, HBcAgPvCS-VK210 was able to protect 83% of vaccinated animals when adjuvanted by Poly I:C e AddaVax, the most efficient formulation. As a whole, our *in vivo* results are highly promising and call for future studies with these VLPs combined in a search for a feasible *P. vivax*. universal vaccine.

Keywords: Vaccine 1. Adjuvants 2. Virus Like-particles 3. Malaria 4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Expectativa de vida ao nascer no Brasil; evolução de 1940 a 2016.	19
Figura 2. abordagem empírica ao desenvolvimento de vacinas	20
Figura 3. Abordagens modernas para o desenvolvimento das vacinas.	24
Figura 4. Classificação dos adjuvantes.	28
Figura 5. Mecanismo de ação do adjuvante MF59.	33
Figura 6. Representação esquemática da interação entre TLR-3/MDA5 e Poly I:C.	34
Figura 7. Representação da forma monomérica e da VLP HBcAg com 180 repetições.	38
Figura 8. Ciclo do <i>Plasmodium</i> spp. no hospedeiro humano.	41
Figura 9. Apresentação esquemática da proteína CS e seus diferentes domínios estruturais.	42
Figura 10. Representação esquemática das variantes formas alélicas da proteína CS de <i>P. vivax</i>	43
Figura 11. Linha do tempo das imunizações com a VLP HBcAgPvCS-VK247.	53
Figura 12. Linha do tempo dos animais imunizados no experimento 02.	54
Figura 13. Linha do tempo dos animais imunizados no experimento 02.	56
Figura 14. Desenho ilustrando a inserção dos epítomos B na região imunodominante “loop” da proteína HBcAg.	63
Figura 15. Estrutura secundária das proteínas HBcAg e HBcAgPvCS-VK247.	63
Figura 16. Purificação da VLP HBcAgPvCS-VK247 e HBcAgPvCS-VK210.	65
Figura 17. <i>Western Blotting</i> realizado com os eluatos das VLPs HBcAgPvCS-VK247 e HBcAgPvCS-VK210 purificada em condições nativas, detectadas com anticorpo monoclonal contra a cauda de histidina.	65
Figura 18. <i>Western Blotting</i> realizado com os eluatos da proteína HBcAgPvCS-VK47 e HBcAgPvCS-VK210 purificadas em condições nativas e detectadas com anticorpo monoclonal contra as repetições da CS de <i>P. vivax</i>	66
Figura 19. <i>Western Blotting</i> realizado com os eluatos da proteína inteira CS-VK247 e CS-VK210 purificada em condições nativas.	67
Figura 20. Manutenção da capacidade de formação da partícula viral (VLP) pela proteína HBcAgPvCS-VK247, após sua purificação.	68
Figura 21. Manutenção da capacidade de formação da partícula viral (VLP) pela proteína HBcAgPvCS-VK210, após sua purificação.	69
Figura 22. Controle negativo da microscopia após purificação da bactéria não transformada.	70
Figura 23. Imunogenicidade da VLP HBcAgPvCS-VK247.	72
Figura 24. Imunogenicidade das formulações vacinais.	74
Figura 25. Estratégia de <i>gates</i> utilizada para segmentar as populações de linfócitos T CD3+.	75
Figura 26. População de células TCD8 ⁺ frente as formulações.	76
Figura 27. Secreção de citocinas associadas aos estímulos CS-VK210 e HBcAgPvCS-VK210.	77

Figura 28. Alimentação dos mosquitos no camundongo infectado com parasitas transgênicos.....	79
Figura 29. Obtenção dos esporozoítos para ensaio do desafio.	79
Figura 30. Esporozoítos extraídos das glândulas salivares.....	80
Figura 31. Inoculação i.v. dos animais para o ensaio de desafio.	80
Figura 32. Esfregaço sanguíneo dos animais submetidos ao ensaio de desafio.	81
Figura 33. Curva de mortalidade das formulações frente ao desafio com esporozoítos transgênicos.....	82
Figura 34. A formulação HBcAgPvCS-VK210 Poly I:C AddaVax gera altos títulos de anticorpos sendo imunogenicamente similar ao candidato vacinal Rv21.	84
Figura 35. Eficácia da formulação HBcAgPvCS-VK210 PolyI:C/AddaVax frente ao desafio com esporozoítos de <i>P. berghei</i> [<i>CS vivax</i>] expressando a proteína CS-VK210... 	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição qualitativa dos adjuvantes AddaVax e MF59.....	31
Quadro 2. Vacinas comerciais baseadas na plataforma <i>Virus-Like particles</i>.....	37
Quadro 3. Verificação da imunogenicidade da VLP HBcAgPvCS-VK247.	53
Quadro 4. Grupos dos animais imunizados.	55
Quadro 5. Experimento 03- Grupos dos animais imunizados.....	56
Quadro 6. Painel de anticorpos para a citometria.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem dos camundongos protegidos contra a infecção induzida por <i>P. berghei</i> [<i>CS vivax</i>].	82
Tabela 2. Confirmação da porcentagem de proteção conferida pela formulação HBcAgPvCS-VK210-PolyI:C/AddaVax.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: micrograma	52
µL: microlitro	57
APCs: Células Apresentadora de Antígeno (Do inglês Antigen-Presenting Cell).....	26
AS04: Adjuvant System 04	31
ATP: Adenosina trifosfato (Do inglês: Adenosine triphosphate).....	32
BCG: Bacillus Calmette-Guérin.....	22
CD: cluster of differentiation.....	57
CD4: Células do grupo de diferenciação 4 (Do inglês Cluster of differentiation 4).....	30
CD8: Células do grupo de diferenciação 8 (Do inglês Cluster of differentiation 8).....	34
CTL: linfócitos T citotóxicos	34
DCs: Células Dendríticas (Do inglês Dendritic Cells).....	29
DNA: Ácido desoxirribonucleico (ADN, em português: ácido desoxirribonucleico; ou DNA, em inglês: deoxyribonucleic acid).....	26
DTP: Difteria, Tétano e Pertussis.....	23
FACS: Flow Cytometry Staining Buffer	58
FCA: Adjuvante Completo de Freund (Do inglês Freund's Complete adjuvant).....	27
FDA: Food and Drug Administration.....	25
g: Força G (Força Gravitacional).....	50
HPV: Papiloma vírus humano (Do inglês Human papillomavirus)	25
IFN-γ: Interferon-gamma	30
Ig: Imunoglobulina	45
IL: Interleucina (Do inglês Interleukin).....	30
kDa: kilodalton	37
LPS: Lipopolissacarídeo (Do inglês Lipopolysaccharides).....	30
M: molar	50
mA: miliampere.....	51
Mal: Molécula adaptadora	30
MD-2: Proteína mielóide diferenciadora 2 (Do inglês myeloid differentiation factor 2)	30
MDA5: Melanoma Differentiation Associated gene 5.....	33
mm: milímetro	52
mM: milimolar.....	50
MPLA: Monofosforil Lipídeo A (Do inglês Monophosphoryl Lipid A).....	30
MyD88: Molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88 (Do inglês Myeloid differentiation primary response 88)	30
NFκB: Fator Nuclear Kappa B (Do inglês Nuclear Factor κB)	30
PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos (Do inglês Pathogen-associated molecular pattern).....	30
PBS: phosphate buffered saline	51
Poly I:C: Polyinosinic:polycytidylic acid.....	33
RIG-1: Retinoic acid-Inducible Gene-1	33
RNA: Ácido ribonucleico (Do inglês: Ribonucleic acid).....	33
SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida.....	25
SUS: Sistema Único de Saúde.....	23
Th1: Célula T auxiliar 1 (Do inglês T helper cell 1)	30
Th2: Célula T auxiliar 2 (Do inglês T helper cell 2)	30
TLR: Receptor do tipo Toll (Do inglês Toll Like Receptors).....	30
TNF: Tumor necrosis factor	44

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa (Do inglês Tumoral Necrosis Factor α).....	30
TRIF-TRAM: Moléculas adaptadoras.....	30
μm : micrômetro	51

Sumário

1. Introdução	18
1.1. O dramático aumento da expectativa de vida populacional nos últimos 125 anos. ..	18
1.2 A origem das vacinas	19
1.2.1 O empiricismo como fonte das primeiras vacinas.	19
1.2.2 Das vacinas vivas atenuadas para as vacinas “racionais” do século 21.	22
1.3 Os adjuvantes imunológicos e sua utilidade na formulação de vacinas.	26
1.3.1 Sais de alumínio.	29
1.3.2 Monofosforil Lipídio A (MPLA).	30
1.3.3 AddaVax / MF59.	31
1.3.4 Poly I:C.	33
1.4 As “Virus-Like Particles” como indutora de resposta imune humoral e celular.	35
1.4.1 Antígeno do cerne do vírus da Hepatite B (HBcAg).	37
1.4.2 Aplicação da teoria das VLPs ao modelo da proteína CS de <i>P. vivax</i> para o desenvolvimento de um candidato vacinal contra malária humana.	39
2. JUSTIFICATIVA	46
3. Objetivos	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos específicos	47
4. Materiais e métodos	48
4.1 Estratégia de trabalho.	48
4.2 Desenho da VLP HBcAgPvCS-VK247.	49
4.4 Obtenção das proteínas CS recombinantes de <i>P. vivax</i>.	50
4.4.1 Transformação bacteriana por choque térmico.	50
4.4.2 Expressão das Proteínas Circumsporozoíta Recombinantes de <i>Plasmodium vivax</i>.	50
4.4.3 Purificação das Proteínas Circumsporozoíta Recombinantes sob condições nativas.	51
4.4.4 Caracterização das proteínas em SDS-PAGE.	51
4.4.5 Confirmação da expressão das proteínas por Western Blotting (W.B.).	51
4.4.6 Confirmação da expressão das VLPs pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).	52
4.5 Protocolo de imunização dos camundongos com as formulações vacinais contra <i>P. vivax</i> baseadas na plataforma VLP.	53
4.6. Resposta Imune Humoral contra a repetição central da CS.	56
4.6.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISAs) para detecção de anticorpos do tipo IgG total utilizando soros de camundongos imunizados.	56
4.6.2 ELISA - subclasses de IgG.	57
4.7. Avaliação da resposta Imune Celular gerada após vacinação.	58

4.7.1 Isolamento de linfócitos, coloração na superfície celular e coloração intra-celular (ICS).....	58
4.7.2 Determinação de citocinas por citometria de fluxo (Cytometric Bead Array - CBA).	59
4.8 Ensaio de desafio.....	60
4.8.1 Infecção dos mosquitos <i>Anopheles stephensi</i> com <i>P. berghei</i> [CS vivax].....	60
4.8.2 Determinação da curva de parasitemia.	60
4.9 Análises estatísticas	61
5. Resultados	62
5.1. Geração e análise molecular e estrutural dos candidatos vacinais baseados na proteína HBcAgPvCS.....	62
5.1.1 Desenho da VLP HBcAgPvCS-VK247.	62
5.2 Predição da estrutura conformacional da proteína recombinante.	63
5.3 Obtenção das proteínas recombinantes.....	64
5.4 Estudos imunológicos e de proteção com os candidatos vacinais produzidos.	71
5.4.1 Desenvolvimento de um protocolo de imunização otimizado e avaliação da resposta humoral.	71
5.5 Avaliação da resposta imune celular	75
5.5.1 Resposta imune celular dos linfócitos frente ao estímulo da proteína CS.....	75
5.5.2 Produção de citocinas Th1/Th2 frente aos estímulos CS-VK210 e HBcAgPvCS-VK210.	76
5.6 Ensaios de desafio	78
6. Discussão	87
7. Conclusão	96
8. Considerações finais e perspectivas futura	97
Referências	98

1. Introdução

1.1. O dramático aumento da expectativa de vida populacional nos últimos 125 anos.

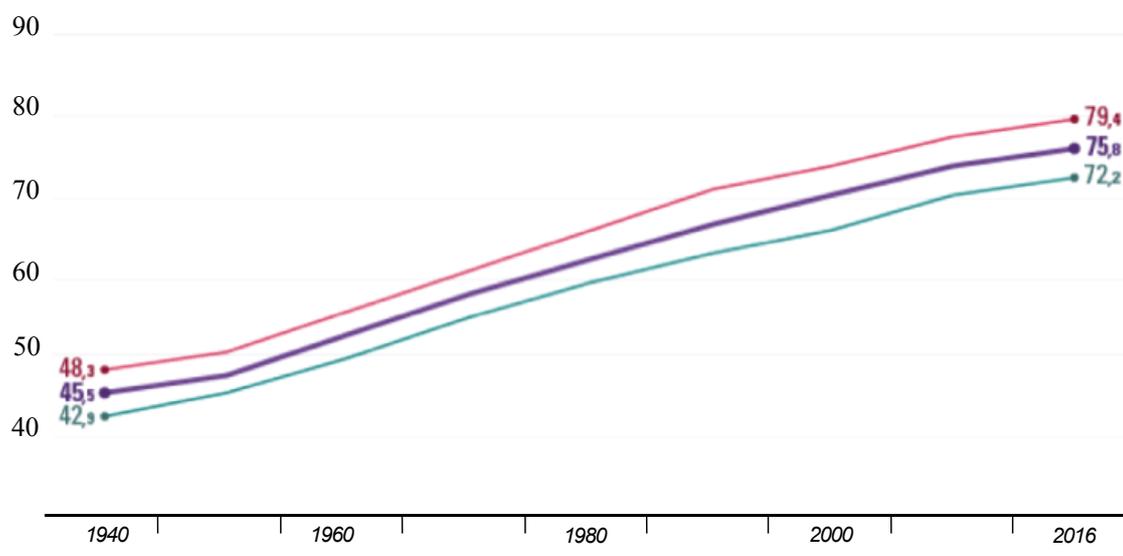
A melhora na saúde pública e na qualidade de vida da população mundial que hoje desfrutamos foi alcançada graças aos esforços realizados durante a “Primeira Revolução da Saúde Pública”, final dos anos 1800 e início de 1900. Este período foi marcado pelo sucesso no controle das doenças infecciosas pelo aperfeiçoamento das condições de saneamento, tratamento de água, gerenciamento de esgoto, coleta de lixo, inspeção de alimentos e ainda os avanços sociais que levaram à diminuição da mortalidade. No entanto, este exame histórico não estaria completo sem o reconhecimento do impacto dos antibióticos e das vacinas na melhoria da saúde e da expectativa de vida.

Graças à descoberta da penicilina por Fleming (1929), juntamente com as práticas de saneamento básico e ainda o desenvolvimento das vacinas, a expectativa de vida aumentou tanto em países de alta quanto baixa renda, eliminando muitas doenças que, historicamente, mataram milhões de pessoas. As vacinas são amplamente consideradas como a estratégia de intervenção médica mais segura e eficaz, com melhor custo benefício. Em conjunto com a introdução de antibióticos e higiene, as vacinas contribuíram significativamente para um declínio constante na mortalidade e morbidade causada por doenças infecciosas.

Nos Estados Unidos, a expectativa de vida em 1900 era de 47,3 anos e doenças como pneumonia, influenza, tuberculose, difteria, smallpox (varíola), pertussis (coqueluche), sarampo e febre tifóide eram as principais causas de mortalidade (ARIAS, 2012). Durante o século 20 somente a varíola foi responsável pela morte de cerca de 300 milhões de pessoas e hoje, graças ao desenvolvimento da vacina, não existe nenhuma morte ocasionada pelo vírus, tendo sido erradicada oficialmente em 1980 (FENNER, F.; HENDERSON, D. A.; ARITA, I.; JEZEK, Z.; LADNYI, 1988). Um estudo realizado por van Panhuis et al. (2013), concluiu que durante o período de 1888 a 1924 as vacinas foram capazes de prevenir 40 mil casos de difteria, 35 milhões de casos de sarampo e um total de 103 milhões de casos de doenças infecciosas que acometeram crianças nos Estados Unidos. Atualmente, a expectativa de vida nos EUA é de 78,6 anos e as doenças como câncer, alzheimer, diabetes, doenças respiratórias crônicas, doença cardíaca e acidente vascular encefálico são as responsáveis pelos maiores índices de mortalidade nos anos de 2016 e 2017 (MURPHY et al., 2018).

No Brasil, entre os anos de 1940 e 1998 a redução de óbitos principalmente por doenças infecciosas preveníveis por vacinas fez elevar a expectativa de vida ao nascer em cerca de 30 anos (BALLALAI, 2017a). A vacinação infantil diminuiu a circulação de agentes infecciosos entre a população, impactando positivamente na saúde de adultos e idosos elevando consequentemente a expectativa de vida no Brasil, que segundo o IBGE é de 72,5 anos para homens e 79,6 para as mulheres no ano de 2017 (Figura 1) (BALLALAI, 2017).

Figura 1. Expectativa de vida ao nascer no Brasil; evolução de 1940 a 2016.



Fonte: Adaptado de IBGE- Diretoria De Pesquisa, 2018. Crescente expectativa de vida dos Brasileiros sendo representada pela linha verde a média de vida entre os homens, em vermelho a linha representa a média de vida entre as mulheres e em roxo a linha traz a representação da média entre homens e mulheres.

A redução da mortalidade infantil e a facilitação do acesso universal às vacinas seguras, de eficácia comprovada, é uma obrigação moral para as comunidades internacionais e um direito humano para que todos tenham individualmente a oportunidade de viver com mais saúde e por mais tempo (ANDRE et al., 2008).

1.2 A origem das vacinas

1.2.1 O empiricismo como fonte das primeiras vacinas.

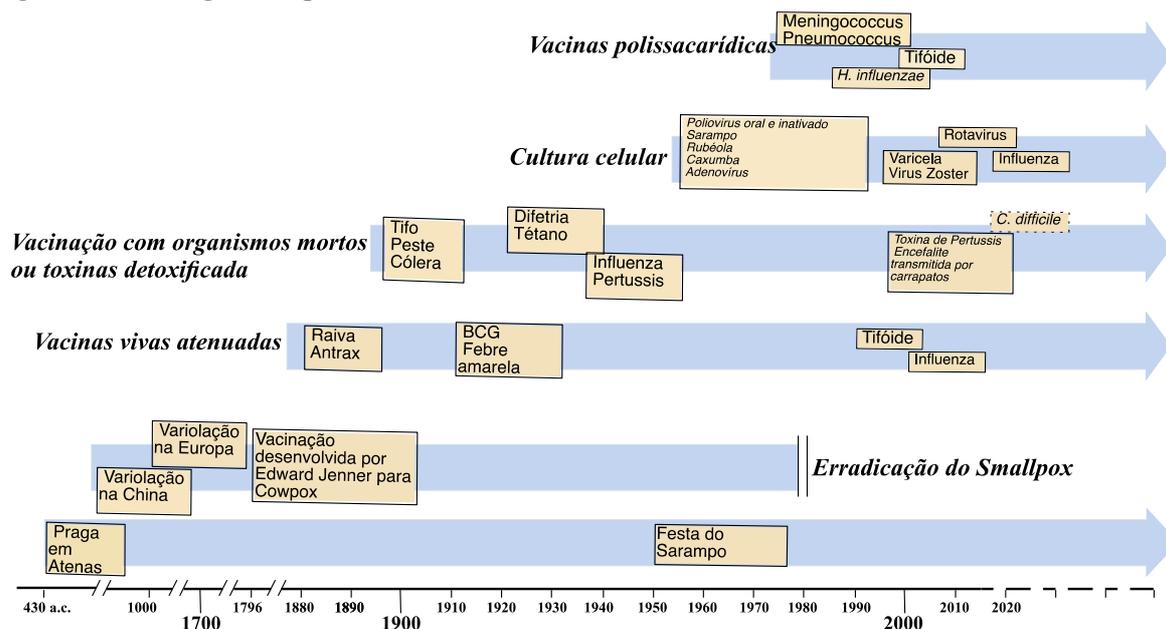
Os primeiros esforços realizados para o controle das doenças por imunizações ocorreram na China, no século 10 depois de Cristo (Figura 2). Naquele tempo a técnica denominada como variolação, consistia em utilizar crostas de feridas de pessoas infectadas pelo vírus smallpox em indivíduos saudáveis na esperança de serem protegidos contra a

doença. O pó obtido das crostas de pústulas, eram soprados nas narinas daqueles a serem protegidos, e isto causava uma infecção, por vezes intensa, que caso fosse resolvida pelo indivíduo, resultava em proteção. Outros tipos de inoculação surgiram nos séculos seguintes, mantendo porém, o mesmo princípio (D'AMELIO; SALEMI; D'AMELIO, 2015).

Disseminador da variolação e bom observador, Edward Jenner revolucionou a saúde da população ao demonstrar formalmente o efeito da imunização e proteção cruzada, mesmo sem conhecimento científico e noção de tal efeito. Jenner comprovou a veracidade do senso comum a respeito da proteção cruzada, na qual mulheres ordenhadeiras infectadas com o vírus da varíola bovina (causada pelo vírus cowpox) eram protegidas da varíola humana (causada pelo vírus smallpox). Em 1796, Jenner demonstrou esse efeito ao infectar um garoto de 8 anos (James Phipps) com o vírus do cowpox obtidos das lesões de Sarah Nelmes (ordenhadeira infectada pelo cowpox) e o desafiou posteriormente com a inoculação do smallpox. Passados alguns dias o garoto não apresentou qualquer sintoma severo da doença, levando Jenner a concluir que a infecção prévia com o cowpox fornecia imunidade completa ao smallpox, sem o risco de desenvolver a doença. Apesar do longo caminho a ser percorrido e esclarecido, as descobertas de Jenner marcaram oficialmente o nascimento da vacinação.

O termo variolação foi então substituído por Richard Dunning para vacinação, cuja origem vem do latim *vaccinus* que pode ser entendido como “derivado da vaca” (STEFAN, 2005; WILLIS, 1997).

Figura 2 abordagem empírica ao desenvolvimento de vacinas



Fonte: Adaptado de De Gregorio; Rappuoli (2014). Uma linha do tempo da história das vacinas mostrando a tecnologias que permitiram seu desenvolvimento. A pesquisa de vacinas pode ser dividida em dois períodos

principais, sendo o primeiro a abordagem empírica, baseada no isolamento, inativação e injeção dos microrganismos causadores da doença. As caixas fechadas indicam vacinas licenciadas ou práticas de vacinação já empregadas; caixas com borda pontilhada indicam vacinas que ainda estão em desenvolvimento.

O processo de vacinação foi disseminado e adotado nos continentes Europeu e Americano sendo posteriormente conduzido ao redor do mundo em campanhas de vacinação em massa. O último registro de varíola contraído de forma natural ocorreu na Somália em 1977. Desde então, somente o acidente de laboratório que levou a morte de uma pessoa em Birmingham, na Inglaterra, foi registrado sendo a varíola oficialmente erradicada em 1980 (CDC, 2016).

Apesar da conquista histórica de Jenner, mais de um século se passou sem um novo avanço no desenvolvimento de novas vacinas. Jenner não tinha conhecimento da origem microbiana das infecções e não tinha noção do mecanismo de ação da sua vacina. O conhecimento científico das vacinas, ocorreu somente no final do século XIX, graças às conquistas na área de microbiologia e imunologia alcançadas por Louis Pasteur e Robert Koch.

As descobertas de Pasteur na área de microbiologia, como a presença de organismos fermentadores e o desenvolvimento do processo de pasteurização levou Pasteur a ser selecionado como membro da Academia de Medicina, em 1873, onde defendeu a tese que parte das doenças contagiosas e dos processos infecciosos devia-se à ação de microrganismos.

Em 1876, Koch realizou a primeira demonstração do ciclo de vida do bacilo antraz, cujos esporos foram localizados na terra onde os animais eram enterrados. Koch, conseguiu ainda isolar o microrganismo em culturas, sendo o primeiro a demonstrar o agente causador da doença (KOCH, 1876).

Em 1878, Pasteur recebeu de Henry Toussaint uma cepa bacteriana causadora da *chicken cholera* (cólera do frango- *Pasteurella multocida*), e juntamente com seu assistente Émile Roux, desenvolveram o método de atenuação de patógenos que levou ao desenvolvimento da primeira vacina atenuada (PASTEUR, 1880a, 1880b).

Percebendo a descoberta da técnica que poderia ser estendida a outras doenças, Pasteur retornou ao estudo do antraz e no verão de 1880 Pasteur e Toussaint disputaram o desenvolvimento de diferentes abordagens para a criação de uma vacina contra o antraz. Enquanto Pasteur tentava a atenuação do antraz para o desenvolvimento da vacina, Toussaint desenvolveu a primeira vacina inativada, sendo oficialmente reconhecido como o pioneiro no desenvolvimento da vacina contra antraz, pelo aquecimento por 10 min a 55°C dos bacilos.

Pasteur começou a atenuar microrganismos em laboratório, secando, aquecendo, expondo-os a oxigênio ou passando-os em diferentes hospedeiros animais (PASTEUR, 1880). Um marco muito importante na história das vacinas, foi o desenvolvimento da primeira vacina humana em 1885, onde Pasteur aplicou sua técnica de atenuação de patógenos e desenvolveu a primeira vacina viral atenuada e o tratamento contra a raiva (PASTEUR, 1885). Em 1888, o Instituto Pasteur foi estabelecido como centro de tratamento contra raiva, pesquisa de doenças infecciosas e instituto de treinamento (DE GREGORIO; RAPPUOLI, 2014; RAPPUOLI, 2014).

1.2.2 Das vacinas vivas atenuadas para as vacinas “racionais” do século 21.

Sucessões de avanços ocorreram permitindo o aprimoramento e a geração de novas técnicas para o desenvolvimento de novas vacinas.

Após a descoberta de que a difteria e o tétano são causados por toxinas bacterianas, Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato descobriram que o soro de animais que haviam sido inoculados com essas toxinas poderia proteger os humanos da doença (VON BEHRING; KITASATO, 1890). Com base na experiência de Pasteur, Albert Calmette e Camille Guérin, passaram uma estirpe de *Mycobacterium bovis*, 230 vezes em meio de cultura, para obter uma vacina atenuada (BCG) contra a tuberculose (CALMETTE; GUERIN, 1899).

O desenvolvimento das primeiras vacinas humanas inativadas foram contra o bacilo da difteria (*Corynebacterium diphtheriae*), febre tifoide (*Salmonella typhi*) e contra a bactéria causadora da peste negra (*Yersinia pestis*), e amplamente utilizada até a primeira metade do século XX (GIRARD et al., 2006).

Em 1924, Gaston Ramon produziu a primeira vacina contra a Difteria (*C. diphtheriae*) graças ao aprimoramento da técnica desenvolvida por Alexander Glenny e Barbara Hopkins, na qual a toxina diftérica foi convertida em toxóide pela ação da formalina, levando a uma significativa redução dos números de casos de difteria e a quase completa eliminação da doença nos países industrializados (GLENNY; HOPKINS, 1923). Notavelmente, a mesma vacina toxóide contra a difteria que foi descoberta na década de 1920 ainda está em uso, tendo sido feitos apenas alguns refinamentos (RAPPUOLI; MALITO, 2014; RELYVELD, 2011). Esse mesmo procedimento de obtenção do toxóide foi aplicado posteriormente para a produção da vacina contra tétano (*Clostridium tetani*) por Ramon e Zoeller em 1926 (RAMON; ZOELLER, 1926).

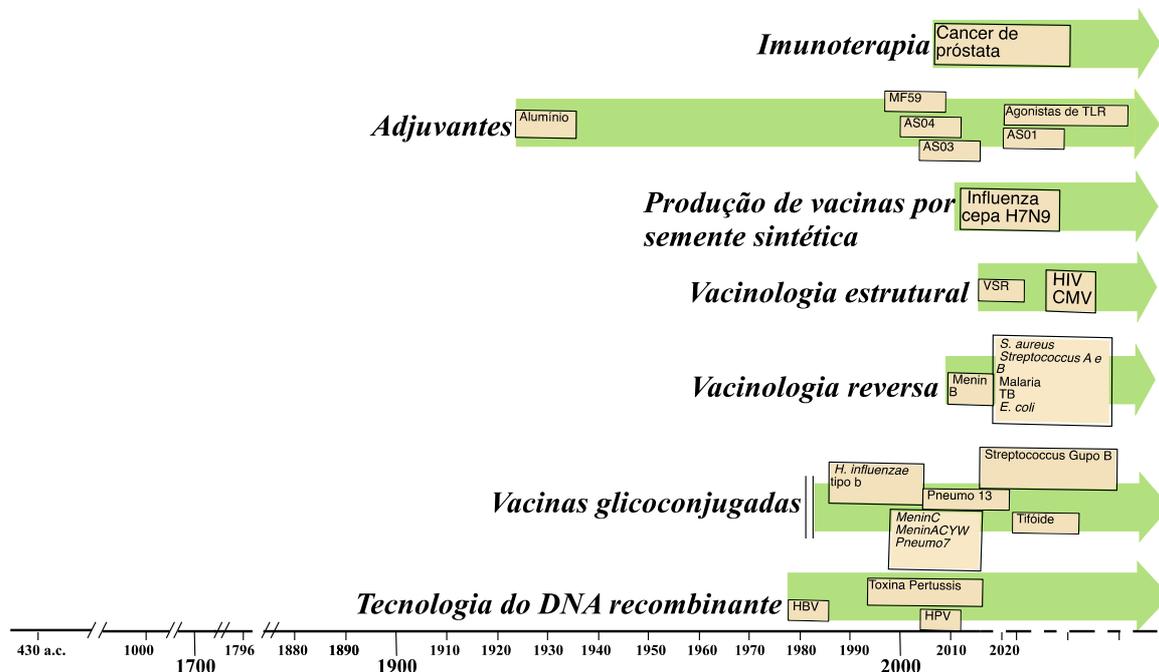
As vacinas contra influenza foram desenvolvidas em meados da década de 1930, quando se descobriu que o vírus da influenza podia ser cultivado em ovos embrionados, procedimento que ainda hoje é usado para fabricar a maioria das vacinas contra influenza (STANLEY, 1945).

Posteriormente ao desenvolvimento da primeira vacina contra pertussis (*Bordetella pertussis*), as primeiras vacinas formuladas com a combinação de diferentes agentes foram elaboradas. Com a introdução das vacinas combinadas, houve a diminuição do número de injeções necessárias e conseqüentemente notou-se um aumento da cobertura vacinal. Desde 1940, crianças de países industrializados são rotineiramente imunizadas com a vacina DTP (RAPPUOLI; MALITO, 2014; RELYVELD, 2011). Atualmente, no Brasil, a vacina é utilizada em uma combinação pentavalente (Difteria, Tétano, Pertussis, Hepatite B+ *Haemophilus influenzae* tipo b), sendo implementada em 2012 ao Calendário Básico de Vacinação pelo SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Na metade do século 20 as técnicas de cultura *in vitro* foram adaptadas para crescimento e cultivo de vírus. Thomas Weller; Frederick Robbins; John Enders, (1949) desenvolveram a técnica de cultivo do vírus (Polio) e por esse fato receberam, em 1954 o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia, por possibilitar o isolamento, manutenção e atenuação de cepas virais para o desenvolvimento de vacinas em cultura de diferentes tipos de tecidos. Impulsionados pela segunda guerra mundial e a necessidade de aumentar a disponibilidade de vacinas para militares, as vacinas contra influenza, encefalite japonesa e tifo começaram a ser produzidas em grande escala. Nesse período ocorreu ainda, o desenvolvimento da vacina contra Polio (Poliovírus- 1955), Rubéola (Rubella vírus) e Caxumba (Paramyxovirus) (HIELLMAN et al., 1968; KOPROWSKI; JERVIS; NORTON, 1952; SALK; PITTSBURGH, 1959).

Em 1980 surgiam duas novas eras importantes para o desenvolvimento das vacinas, a era das vacinas conjugadas e da engenharia genética (Figura 3).

Figura 3. Abordagens modernas para o desenvolvimento das vacinas.



Fonte: Adaptado de, De Gregorio; Rappuoli, 2014. A abordagem moderna para o desenvolvimento de vacinas. A segunda abordagem moderna começou na década de 1980, quando novas tecnologias permitiram avanços no desenvolvimento de vacinas que não seriam possíveis usando a abordagem empírica. As caixas fechadas indicam vacinas licenciadas ou práticas de vacinação já empregadas; caixas com borda pontilhada indicam vacinas que ainda estão em desenvolvimento.

Os primeiros trabalhos sobre conjugação química iniciaram após a verificação de que a cadeia de polissacarídeo utilizada nas vacinas não era suficiente para gerar uma resposta imunogênica satisfatória, sendo necessário a ligação desses açúcares com uma proteína carreadora. Os polissacarídeos capsulares consistem em epítomos repetitivos que não são processados pelas células apresentadoras de antígenos, mas que interagem diretamente com as células B, induzindo síntese de anticorpos na ausência de linfócitos T e consequentemente a ausência da indução de memória imunológica (ADA; ISAACS, 2003; GOLDBLATT, 2000; STEIN, 1992). Apesar das limitações das vacinas polissacarídeas, a vacina contra pneumococo não conjugada é ainda utilizada, porém apenas como imunobiológico especial, para determinados grupos de pacientes que apresentam suscetibilidade aumentada à infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A ideia de utilizar uma proteína acoplada à cápsula antigênica, na tentativa de melhorar a imunogenicidade da vacina, foi notada pela primeira vez por Oswald Avery e Walther Goebel em 1929, no entanto somente em 1987, Robbins e Rachel Schneerson,

juntamente com seus colaboradores, lançaram as vacinas conjugadas através da ligação do toxóide diftérico ao polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b (AVERY; GOEBEL, 1931; RODRIGUES LP, SCHNEERSON R, 1971). As vacinas glicoconjugadas de hoje estão disponíveis contra *H. influenzae* tipo b, vacina conjugada contra pneumococo, e vacina conjugada contra meningococo tipo A, C, W e Y (DE GREGORIO; RAPPUOLI, 2014; DELANY; RAPPUOLI; DE GREGORIO, 2014).

A revolução na área de engenharia genética no final do século 20, impactou diretamente o desenvolvimento de novas vacinas e com melhoria no perfil de segurança. O primeiro fruto dessa revolução permitiu a origem da segunda geração da vacina contra Hepatite B Engerix-, produzida a partir da inserção do gene do antígeno S (antígeno de superfície) em leveduras capazes de expressar esse antígeno (VALENZUELA et al., 1982). Outra importante vacina gerada graças a essa tecnologia, foi o desenvolvimento da vacina contra o papilomavírus humano (HPV) (FRAZER; COX, 2006; ZHOU et al., 1991).

Todas as vacinas descritas acima, são direcionadas à uma população saudável na busca pela prevenção de doenças (vacinas profiláticas). No entanto, algumas vacinas têm surgido na tentativa de aliviar o sofrimento daqueles que já estão com a doença. Grande esforço vem sendo dedicado ao desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra tumores, SIDA, Hepatite B e tuberculose e possivelmente contra as bactérias que causam úlceras gástricas. Em 2010 a FDA aprovou a primeira vacina terapêutica contra o câncer de próstata (PROVENGE) (SELA; HIELLMAN, 2004).

Nos últimos anos, tivemos a introdução da mais moderna tecnologia aplicada na produção de vacinas. Impulsionada pelos avanços na era genômica e o completo sequenciamento de patógenos, a vacinologia reversa surge fundamentada na identificação de novos candidatos a vacinas meningocócicas, baseada na sequência do genoma da cepa do sorogrupo B de *Neisseria meningitidis* (ADU-BOBIE et al., 2003). A partir do sequenciamento de *N. meningitidis*, foi possível a seleção de aproximadamente 570 possíveis alvos vacinais. Desses 570 alvos, 350 proteínas recombinantes tiveram a capacidade de serem expressas em *Escherichia coli*. Após a imunização de animais com esses candidatos, 91 novas proteínas foram confirmadas como sendo expressas na superfície da membrana e 28 foram encontradas para induzir anticorpos. Ao decorrer de análises mais aprofundadas, cinco proteínas foram selecionadas para formular uma vacina multicomponente (GIULIANI et al., 2006).

A vacinologia reversa juntamente com as vacinas de ácidos nucléicos e vacinas sintéticas, são promissoras em iniciar uma nova era vacinal (RAPPUOLI et al., 2011).

Abordagens empíricas têm sido utilizadas desde a era Pasteur para a produção de vacinas, utilizando dessa forma antígenos atenuados, componentes antigênicos parcialmente purificados (vacinas de subunidades) e toxinas ou polissacarídeos detoxificados. No entanto, durante os últimos 30 anos, novas tecnologias têm tornado possível o desenvolvimento de novas vacinas, o que antes seria impossível com a aplicação das abordagens empíricas. Essas tecnologias como visto anteriormente incluem DNA recombinante, glicoconjugação, vacinologia reversa, identificação de novos antígenos alvos e ainda como veremos adiante o desenvolvimento de novas classes de adjuvantes que possam promover respostas imunes humorais e celulares mais eficazes (DELANY; RAPPUOLI; DE GREGORIO, 2014; RAPPUOLI et al., 2011).

A compreensão de quais as respostas são desejáveis e necessárias para a proteção e como podem ser induzidas por uma vacina irá derrubar uma barreira para o desenvolvimento racional e efetivo das próximas gerações de vacinas, possibilitando número maior de vacinas contra diferentes doenças infecciosas em diferentes grupos populacionais (DELANY; RAPPUOLI; DE GREGORIO, 2014).

1.3 Os adjuvantes imunológicos e sua utilidade na formulação de vacinas.

Muitas das novas vacinas possuem um número limitado de antígenos purificados que geralmente tem levado a um perfil mais seguro quando comparado com antígenos atenuados, por exemplo, porém ao mesmo tempo têm-se notado uma menor imunogenicidade devido à remoção das diferentes características dos organismos. Este fato evidencia a necessidade da adição de uma substância capaz de amplificar a resposta imune aos antígenos vacinais, alcançando assim o principal objetivo das imunizações que é a indução da imunidade protetora (AWATE; BABIUK; MUTWIRI, 2013; O'HAGAN, 2000; PASQUALE et al., 2015). Essas substâncias capazes de potencializar a resposta imune aos antígenos são denominadas adjuvantes e apesar da frequente presença na maioria das formulações vacinas, o desenvolvimento de novos potencializadores de resposta imune ainda permanece lento.

A palavra adjuvante deriva do verbo em Latim *adjuvare*, que significa socorrer ou reforçar podendo ser utilizados para múltiplos propósitos, como por exemplo:

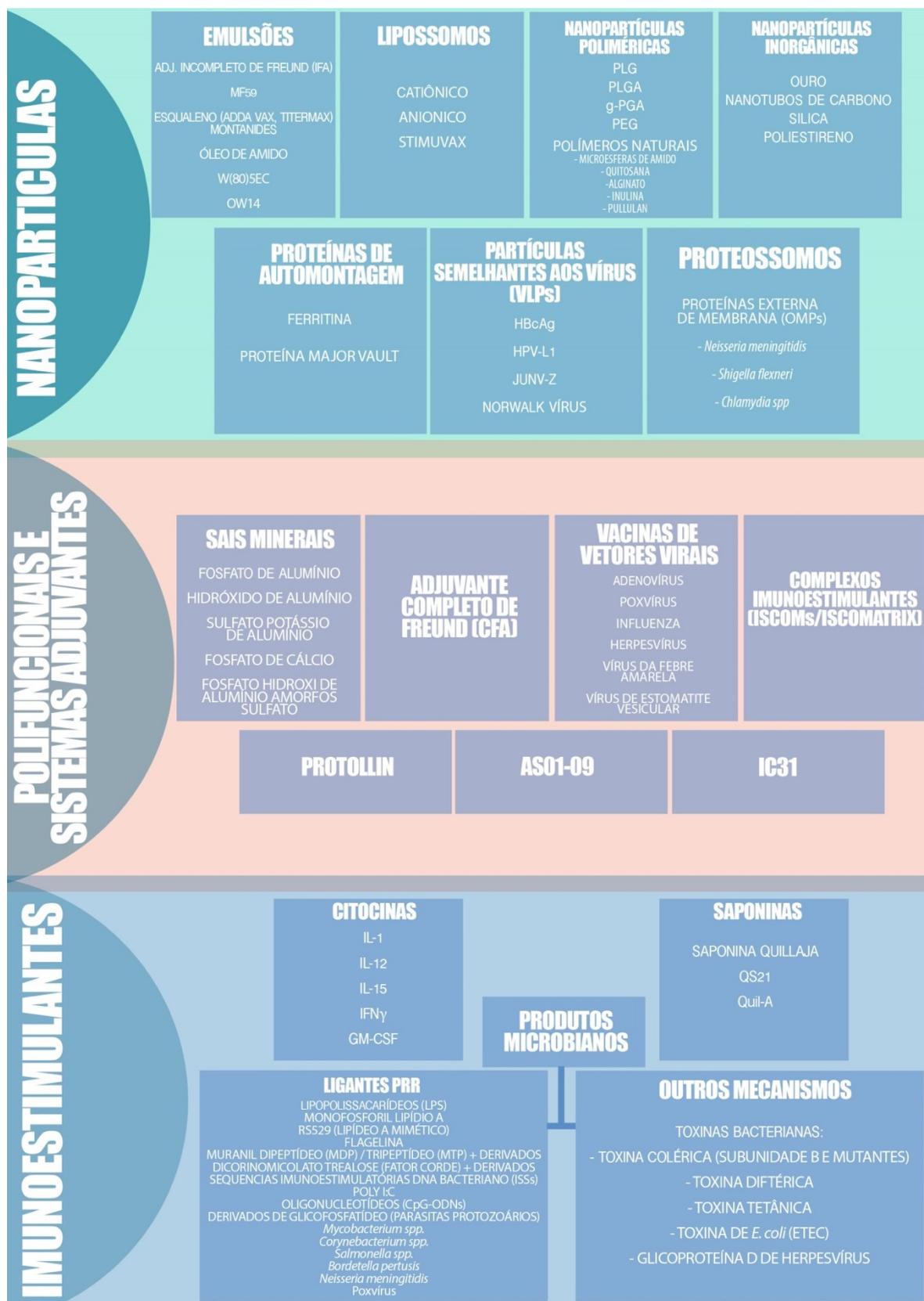
- Aumentar a imunogenicidade de imunógenos fracos, como antígenos recombinantes ou altamente purificados;
- Aumentar a meia vida biológica e ou imunológica da vacina antigênica;

- Promover o recrutamento celular;
- Direcionar a resposta imune apropriada para a vacina;
- Melhorar a entrega dos antígenos pelas APCs
- Ativar ou maturar as APCs;
- Induzir a produção de citocinas imunomoduladoras;
- Ativar inflamossomas e induzir a inflamação local;
- Reduzir a quantidade de antígenos assim como da frequência de imunizações;
- Melhorar a eficácia das vacinas em indivíduos imunocomprometidos, imunologicamente imaturos ou senescentes (COFFMAN; SHER; SEDER, 2010; VOGEL, 2000).

Os adjuvantes foram descritos pela primeira vez por Gaston Ramon em 1924, um veterinário francês que observou o aumento do título de anticorpo anti-tétano e anti-difteria em animais que apresentavam abscesso no local da vacinação. Ao induzir abscessos utilizando tapioca, farelo de pão ou amido juntamente com a toxina inativada, Ramon confirmou a hipótese de que a adição de substâncias capazes de induzir uma inflamação no local da injeção é eficiente para a geração de uma resposta imune mais robusta (RAMON, 1924). Ao mesmo tempo, Glenny et al. (1926), descobriram o efeito dos sais de alumínio como adjuvantes e desde então seu uso vêm sendo administrado em vacinas virais e bacterianas, como as vacinas contra difteria, tétano e coqueluche, vacinas contra os vírus das hepatites A e B, raiva, dentre outras. Já em 1930 Jules Freund desenvolveu o adjuvante completo de Freund (FCA), um poderoso composto formado por uma emulsão de água em óleo mineral contendo *Mycobacterium*. Apesar de ser um dos mais efetivos adjuvantes conhecidos, o uso de FCA em vacinas humanas não é permitido devido à alta reatogenicidade provocada no local da injeção (FREUND; CASALS; HOSMER, 1937).

Embora com o mesmo propósito de aumentar a resposta imune, os adjuvantes são diversos quanto à constituição química e estrutural, à atividade e ao modo de ação e de uma maneira geral podemos classifica-los em três grandes grupos: os adjuvantes de nanopartículas, os polifuncionais, sistemas de adjuvantes e ainda os imunoestimulantes (Figura 4):

Figura 4 Classificação dos adjuvantes.



Fonte: A autora. A grande variedade de adjuvantes sendo classificados de acordo com o principal mecanismo de ação. Em verde encontram-se os adjuvantes pertencente a classe das nanoparticulas; em rosa encontram-se os adjuvantes pertencente a classe dos polifuncionais e sistemas adjuvantes; em azul encontram-se os adjuvantes pertencente a classe dos imunoestimulantes.

1.3.1 Sais de alumínio.

Os sais de alumínio têm sido amplamente utilizados como adjuvantes sendo os primeiros a serem licenciados para uso em humanos. Esta classe de adjuvantes inclui o fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio e hidroxifosfato de alumínio e desde 1920 e durante os 70 anos seguintes, foram os únicos adjuvantes comercialmente disponíveis (DE GREGORIO; CAPRONI; ULMER, 2013; REED; ORR; FOX, 2013).

O efeito adjuvante dos alumínio foi descoberto acidentalmente por Glenny et al. (1926), quando ao precipitar o toxóide diftérico utilizando potássio de alumínio ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$), produziu uma mistura capaz de aumentar a resposta imune contra o antígeno. Devido a problemas de reprodutibilidade encontrado durante o processo de produção, o sulfato de alumínio utilizado até então, foi completamente substituído por hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio nas vacinas comerciais.

Apesar do uso generalizado destes adjuvantes, ainda não existe total entendimento sobre seu mecanismo de ação que parece envolver múltiplas vias: a) a formação de um depósito pelo qual os antígenos são entregues lentamente aumentando dessa forma a produção de anticorpos; b) a indução da inflamação que leva ao recrutamento das células apresentadoras de antígenos (APCs) e captura dos antígenos; c) a conversão de antígenos solúveis em partículas que serão fagocitadas pelas APCs, como os macrófagos, células dendríticas (DCs) e linfócitos B (MARRACK; MCKEE; MUNKS, 2009).

A princípio acreditava-se que o mecanismo de ação se dava pelo efeito depósito, como postulado por Glenny, sendo que a associação do antígeno com o adjuvante promovia a persistência do antígeno por um período maior e a entrega se tornava mais lenta levando a um maior período de exposição para a apresentação ao sistema imune. No entanto, nas últimas duas décadas, pesquisadores iniciaram diversos estudos que revelaram os múltiplos papéis desempenhados pelos adjuvantes de alumínio e que desafiam a teoria de depósito para o seu efeito adjuvante (GLENNY et al., 1926; WEN; SHI, 2016). Hutchison et al. (2012), demonstraram que a retirada do local da injeção contendo alumínio no período entre 2-24 horas após a inoculação, o resultado da resposta imune não é alterado, indicando que o efeito depósito não se faz necessário, ou que pelo menos não é o único mecanismo responsável pela ação do adjuvante. O complexo antígeno-alumínio pode desaparecer após algumas semanas e o efeito prolongado é atribuído às células inatas que são atraídas mais rapidamente para o local da imunização onde iniciam a captura do antígeno (MANNHALTER et al., 1985).

Em resposta à presença do alumínio, monócitos inflamatórios e DCs são ativados de forma indireta, pela produção de sinais de perigo como o ácido úrico, que aumentam o recrutamento celular e a ativação de neutrófilos e monócitos inflamatórios, e induzem a diferenciação das DCs inflamatórias. Rapidamente engolfam o antígeno e migram do local da injeção para os linfonodos para a apresentação antigênica às células T.

Os sais de alumínio também induzem a morte celular, e consequente liberação do DNA além disso, a produção de ácido úrico também vem sendo atribuída como um mecanismo de ação desempenhado que culmina com a ativação dos PAMPs e tem sido reportado como responsável pela resposta imune do tipo Th2 característica desse adjuvante.

1.3.2 Monofosforil Lipídeo A (MPLA).

O adjuvante Monofosforil Lipídeo A (MPLA) é um produto derivado dos Lipopolissacarídeos (LPS) encontrado como constituinte majoritário das paredes das bactérias Gram-negativas. O MPLA utilizado no presente trabalho foi obtido a partir da remoção de um resíduo de fosfato que resulta em uma menor toxicidade, cerca de 0,1% da toxicidade inflamatória da molécula do LPS.

A baixa toxicidade do MPLA é atribuída ao recrutamento preferencial por TRIF na ativação dos *Toll-like* 4 (TLR-4) que resultam em uma diminuição da indução das citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β e TNF- α e aumento de IL-10 pelos macrófagos. A estimulação via TLR-4 pode contribuir para a ativação da resposta imune inata, pela ativação da atividade transcricional de NF κ B e subsequente expressão de citocinas pró-inflamatórias como, TNF- α e IL-6. A produção dessas citocinas pode melhorar a resposta imune adaptativa pela estimulação da maturação das APCs (DIDIERLAURENT et al., 2009).

O reconhecimento do LPS precisa tanto do TLR-4 quanto MD-2, levando a uma expressão das citocinas pró-inflamatórias pela via de transcrição NF κ B pela ativação da via de ativação MyD88-Mal, assim como a expressão de interferon tipo 1 via transcrição do fator IRF3 através da ativação de TRIF-TRAM. Por outro lado MPLA só ativa a via TRIF-TRAM o qual conta com a propriedade adjuvante com baixa toxicidade (QUINTILIO et al., 2009).

O MPLA de *Salmonella Minnesota* tem sido comumente utilizado em estudos por suas características adjuvante, como agonista de TLR-4 e pela capacidade de promover a produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺, levando a um perfil de resposta do tipo Th1 requerida para patógenos intracelulares. Vacinas aprovadas para uso em humanos como, por

exemplo, a vacina contra Hepatite B e contra o HPV contém em sua formulação o adjuvante AS04 que corresponde à associação entre o adjuvante MPLA e o adjuvante hidróxido de alumínio Al(OH)₃ (DIDIERLAURENT et al., 2009; KUNDI, 2007).

Para o presente trabalho, o MPLA selecionado foi produzido pelo Instituto Butantan como um subproduto obtido a partir da remoção da endotoxicidade do LPS da bactéria *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), no processo produtivo da vacina Tríplice Bacteriana Difteria-Tétano-Pertussis (DTP_{low}) e gentilmente cedido pela Dr^a Flavia Saldanha Kubrusly (DIAS et al., 2007). Durante a produção da vacina DTP_{low}, é realizada a hidrólise ácida do LPS, sendo gerado um subproduto, que é o monofosforil lipídio A. Em um estudo realizado por Quintilio et al., (2009), a utilização do MPL de *B. pertussis* como adjuvante na vacina contra gripe sazonal, ficou demonstrado a capacidade desse produto em induzir e produzir interferon β , além do aumento da ativação de linfócitos T sem a indução da resposta inflamatória. Os resultados demonstraram ainda, a indução de altos títulos de inibição de hemaglutinação em camundongos, mesmo com a redução no número de reforços vacinais (QUINTILIO et al., 2009).

1.3.3 AddaVax / MF59.

O adjuvante AddaVax é uma emulsão de óleo (esqualeno) em água produzido pela empresa InvivoGen muito semelhante ao adjuvante MF59 Novartis (atual GlaxoSmithKline-GSK) (Quadro 1) que é licenciado na Europa e nos Estados Unidos e está presente nas vacinas contra influenza para uso em humanos.

Quadro 1. Composição qualitativa dos adjuvantes AddaVax e MF59.

AddaVax	MF59
Tamanho 160nm	Tamanho 160nm
Esqualeno 5%	Esqualeno 4,3%
Citrato de sódio - 10mM	Citrato de Sódio 10mM
Tween 80 - 0.5%	Tween 80 - 0.5%
SPAN 85 - 0.5%	SPAN 85 - 0.5%

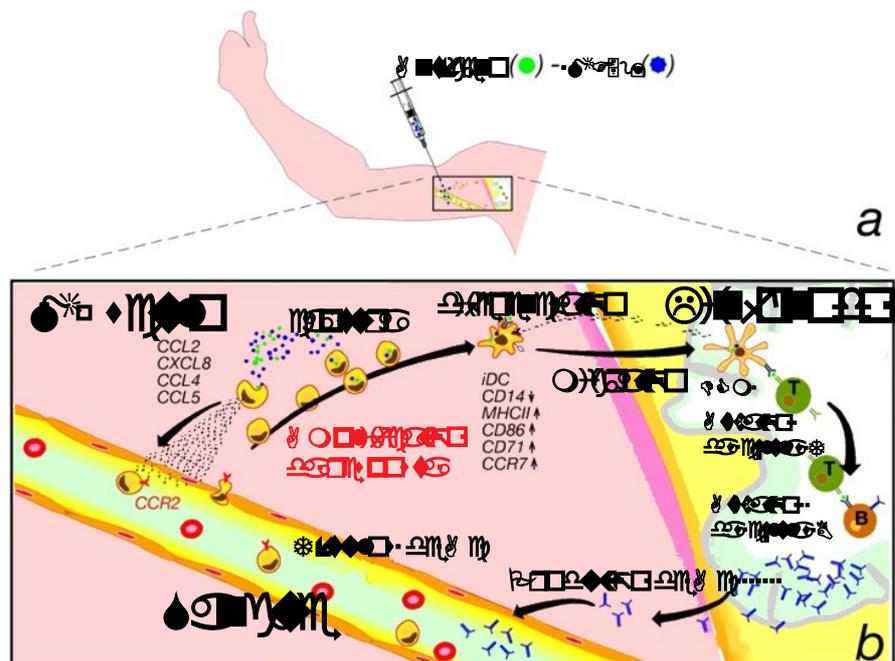
Fonte: A autora. Comparação entre os componentes contidos nos adjuvantes Addavax e MF59.

O MF59 foi originalmente desenvolvido no final de 1980 pela companhia Chiron Corporation (California, USA), após o período da revolução do DNA recombinante que tornou possível a produção de vários antígenos proteicos recombinantes. Naquele período buscava-se a criação de um novo adjuvante que tivesse a segurança similar ao alumínio, porém com a potente imunogenicidade do adjuvante de Freund, uma vez que a maioria dos antígenos recombinantes eram monômeros solúveis de fraca imunogenicidade, mesmo ao combiná-los com alumínio. Finalmente, após muitos esforços e 70 anos depois da licença do primeiro adjuvante para uso em humanos, o novo adjuvante denominado MF59 foi aprovado em 1997, na Itália, sendo incluído nas vacinas contra Influenza (FLUAD) e autorizado posteriormente nos EUA e outros 38 países da Europa (NEST et al., 2013).

Inicialmente acreditava-se que o efeito adjuvante do MF59 era pela formação de um depósito de antígeno. No entanto, mesmo sem a completa elucidação dos mecanismos de ação do MF59, estudos conduzidos por Dupuis et al., (2001), utilizando MF59 marcado revelaram que após a injeção intramuscular ocorre uma rápida drenagem do adjuvante e antígeno para os linfonodos e somente 10% permanece no local da inoculação, criando um “microambiente imunocompetente” que prepara as células para o encontro com os antígenos e que favorece o desenvolvimento da resposta imune antígeno específica (DE GREGORIO; CAPRONI; ULMER, 2013; O’HAGAN et al., 2012; OTT et al., 1995).

Estudos conduzidos com células humanas *in vitro* demonstraram que o MF59 induz uma maior fagocitose e pinocitose, aumentando, portanto, a captura de antígenos pelas APCs. Após a injeção intramuscular, o MF59 atua ativando principalmente os monócitos, macrófagos, granulócitos e células dendríticas (Figura 5), que resulta na indução da secreção de quimiocinas e receptores de quimiocinas (CCL2, CXCL8, CCL4, CCL5) envolvidas no recrutamento celular (MOSCA et al., 2008; SEUBERT et al., 2008). O resultado disso tudo é um sinal amplificado e um significativo influxo de células fagocíticas que proporciona um transporte mais eficiente de antígenos para os linfonodos drenantes (SEUBERT et al., 2008). O mecanismo pelo qual a administração do MF59 leva a liberação dessas quimiocinas e citocinas ainda não está bem esclarecido, mas acredita-se que a inoculação via intramuscular pode induzir um sinal, através da liberação de ATP pelas células musculares do local imunizado. Apesar do MF59 não ativar nenhum receptor do tipo *Toll-like*, a ação adjuvante é dependente de MyD88, sendo possivelmente o ATP responsável em ativar eventos desencadeados pelos receptores purinérgicos necessários para a adjuvanticidade (NEST et al., 2013; SEUBERT et al., 2008; VONO et al., 2013).

Figura 5. Mecanismo de ação do adjuvante MF59.



Fonte: Adaptado de Kommareddy; Singh; O'hagan, 2017. (A) O adjuvante em combinação com antígeno injetado no músculo. (B) No músculo, monócitos, macrófagos e células dendríticas residentes em tecidos são ativados e respondem induzindo uma mistura de quimioquinas (CCL2, CXCL8, CCL4, CCL5), o que resulta em um influxo significativo de células fagocíticas que absorvem o antígeno e se diferenciam em células apresentadoras de antígeno (células dendríticas). Essas células são responsáveis pelo transporte eficiente do antígeno para os linfonodos, onde a resposta imune é desencadeada pela ativação das células T e B e pela produção de anticorpos

1.3.4 Poly I:C.

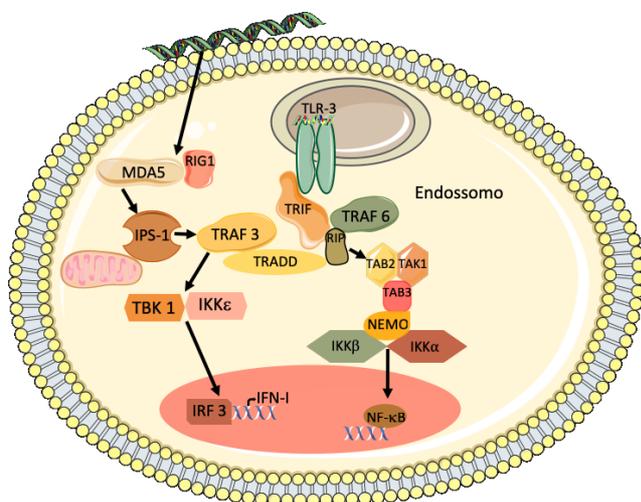
O adjuvante ácido Polyinosinic:polycytidylic (Poly I:C) é um análogo nucleosídico sintético constituído por uma dupla fita de RNA (RNAs). A RNAs é um padrão molecular associado à infecção viral por ser produzido pela maioria dos vírus durante a replicação (AKIRA, 2001). Em um estudo realizado por Alexopoulou et al., (2001), ficou demonstrado que o TLR-3 humano reconhece RNAs e a ativação deste receptor por Poly I:C pode induzir a ativação de NF- κ B e proteína quinase ativada por mitógeno (MAP) pela via independente da molécula adaptadora MyD88, levando à maturação das DCs. Além da capacidade de ativar os TLRs-3, o Poly I:C também está implicado na ativação das proteínas citoplasmáticas do tipo MDA5 e RIG-1 sendo a via MDA5 a primeira via a ser reconhecida e essencial para a produção de IFN- α , já a proteína RIG-I é reconhecida posteriormente e ambas são mediadas

pelo adaptador IPS-1 (também denominado como Cardif, VISA ou MAVS) (Figura 6) (KATO et al., 2006).

A detecção imune dos ácidos nucleicos remonta ao início da década de 1960, com a observação de que ácidos nucleicos, como o RNA de cadeia dupla longa e especificamente o Poly I:C, podem induzir o fator antiviral IFN-I (ISAACS; COX; ROTEM, 1963). Embora as moléculas de RNA tenham sido os primeiros ácidos nucleicos encontrados responsáveis pela indução de IFN-I, esta linha de pesquisa continuou apenas em 2001, com a identificação do RNA de fita dupla como ligante para TLR3 (ALEXOPOULOU et al., 2001). Os TLRs-3 são expressos principalmente nos endossomos, mas também tem sido reportada a sua presença nas membranas celulares. A ativação do TLR-3 nas DCs recruta o adaptador TRIF na qual ativa posteriormente IRF3 e NF- κ B induzindo a produção de IL-12 e IFN-I, além de aumentar a expressão de MHC-II e apresentação cruzada (LIU et al., 2016a).

A ativação de ambas as vias MDA5 e TLR-3 otimiza a magnitude e durabilidade da resposta imune, induzindo a produção de IFN-I que, além de diversas propriedades antivirais, podem também contribuir para maturação de células dendríticas e na polarização da resposta imunológica para um perfil Th1 e T CD8⁺ (LONGHI et al., 2009).

Figura 6. Representação esquemática da interação entre TLR-3/MDA5 e Poly I:C.



Fonte: Adaptado de Liu et al., 2016a. Representação esquemática da interação entre o TLR-3, MDA5 e o adjuvante Poly I:C e indução da resposta imune anti-viral por promover a produção de IFNs tipo I e citocinas inflamatórias.

Assim, as características descritas tornam Poly I:C um promissor adjuvante para vacinas que necessitam de uma resposta do tipo Th1 e CTL (linfócitos T citotóxicos, como é o caso das vacinas contra o câncer, vírus e parasitas como *Plasmodium*.

1.4 As “*Virus-Like Particles*” como indutora de resposta imune humoral e celular.

Historicamente, com a descoberta das partículas não infecciosas do vírus da Hepatite B presente no sangue de pacientes infectados, o “*Australia antigen*” surgiu também a ideia atrativa e promissora de utilizar essas partículas para o desenvolvimento profilático de vacinas. Muitas proteínas estruturais dos vírus possuem a habilidade de se montarem em partículas que se assemelham aos vírus nativos, sendo denominadas de *Virus-Like Particles* (VLPs). Essas VLPs são estruturas altamente ordenadas que se juntam para formar partículas com capacidade de manter a conformação autêntica das proteínas dos capsídeos virais, mas com a característica de não possuírem material genético infeccioso, podendo ser sintetizadas em diferentes sistemas de expressão (procarióticos ou eucarióticos). A ausência de enzimas como protease, transcriptase reversa e material genético no seu interior, impedem a sua integração no genoma do hospedeiro e, por esse motivo, a reversão da virulência (JENNINGS; BACHMANN, 2008; LUA et al., 2014; ROY; NOAD, 2008; ZHAO et al., 2013).

As VLPs vêm sendo estudadas por décadas como candidatos vacinais e são pertencentes à primeira classe de nanopartículas a alcançarem o mercado graças a primeira vacina aprovada pela FDA, em 1981. A vacina HEPTAVAX-B foi desenvolvida para proteger humanos contra o vírus da Hepatite B, a qual utilizava o antígeno da superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg) derivado do plasma de doadores contendo o vírus (LIU et al., 2016b). Com o avanço na história das tecnologias vacinais, surgiu a primeira vacina de DNA recombinante, que utiliza a VLP do antígeno HBsAg, com 22nm de diâmetro idênticas às derivadas de plasma, tanto em sua morfologia, quanto propriedades imunológicas, sendo expressa em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Em 1986, essa formulação vacinal denominada RECOMBIVAX HB, foi licenciada e produzida pela empresa Merck como a primeira vacina recombinante e primeira baseada na plataforma VLP.

Apesar do grande avanço, 20 anos se passaram para que uma nova vacina baseada na plataforma VLP fosse licenciada para uso em humanos e diferentemente da primeira vacina, a GARDASIL foi gerada a partir da proteína L1 do capsídeo viral de *Human Papillomavirus* (HPV) para combater contra quatro tipos do HPV, sendo eles o HPV 16, 18, 6 e 11 utilizando da mesma forma, as leveduras como sistema de expressão (ZHAO et al., 2013).

Três anos mais tarde, em 2009, uma segunda vacina agora bivalente, contra o HPV tipo16 e 18 foi gerada, a CERVARIX foi produzida em sistema de expressão de baculovírus em células de inseto (*Spodoptera frugiperda-9*). Na China, em 2011, uma nova vacina também utilizando a uma VLP foi licenciada para uso contra o vírus da Hepatite E (HEV), baseada na proteína p239 do capsídeo de HEV, e a bactéria *E. coli* como sistema de expressão sendo denominada de HECOLIN (KIM et al., 2014; LIU et al., 2016b; ZHANG et al., 2014; ZHAO et al., 2013).

Um grande número de candidatos vacinais utilizando a plataforma VLP vem sendo estudados e alguns se encontram em fase clínica de testes, explorando os diferentes sistemas de expressão. Atualmente encontram-se disponíveis no mercado as vacinas listadas no quadro 2.

Em alguns casos, as VLPs podem ser utilizadas sem a adição de substâncias adjuvantes para alcançar uma potente resposta imune. Os efeitos auto-adjuvantes dessas VLPs são inerentes ao do tamanho pequeno das partículas (são em torno de 22-150 nm). Quando apresentadas ao sistema imune acontece sua captura pelas DCs, processamento e apresentação pela MHC classe II (MHC-II - do inglês –*Major Histocompatibility Complex*) e a maturação e a migração da DC, essencial para a estimulação da resposta imune inata. As VLPs exógenas também podem ser capturadas e processadas via MHC-I para ativação das células T CD8⁺, que são essenciais para a eliminação de patógenos intracelulares. Essa habilidade das VLPs em serem alvos das DCs é tida como uma vantagem entre as diferentes plataformas utilizadas na produção de vacinas, devido ao importante papel desempenhado pelas DCs na ativação da resposta imune inata e adaptativa (GRGACIC; ANDERSON, 2006).

Quadro 2. Vacinas comerciais baseadas na plataforma *Virus-Like particles*.

Nome comercial	Vacina	Proteína	Adjuvante	Referência
Engerix®-B	Vacina contra Hepatite B	HBsAg (20 µg)	Hidróxido de alumínio (500 µg)	(GSK, 2013a)
Recombivax HB®	Vacina contra Hepatite B	HBsAg (10 µg)	Hidroxifosfato de alumínio (500 µg)	(MERCK, 2014)
Gardasil®	Vacina contra Papilomavirus Humano Tetraivalente	HPV 6L1(20 µg) HPV 11L1(40 µg) HPV 16L1(40 µg) HPV 18L1(20 µg)	Sulfato Hidroxifosfato de alumínio (225 µg)	(GSK, 2014)
Gardasil®9	Vacina contra Papilomavirus Humano Nonavalemte	HPV 6L1(30 µg) HPV 11L1(40 µg) HPV 16L1(60 µg) HPV 18L1(40 µg) HPV 31L1(20 µg) HPV 33L1(20 µg) HPV 45L1(20 µg) HPV 52L1(20 µg) HPV 58L1(20 µg)	Sulfato Hidroxifosfato de alumínio (500 µg)	(GSK, 2016)
Cervarix®	Vacina contra Papilomavirus humano	HPV 16L1(20 µg) HPV 18L1(20 µg)	AS04 (50 µg)	(GSK, 2013b)
Hecolin®	Vacina contra Hepatite E	Antígeno HE (30 µg)	Hidróxido de alumínio (800 µg)	(PARK, 2012)

Fonte: Adaptado de Lua et al., 2014. Vacinas comerciais que utilizam partículas que mimetizam vírus como antígenos na composição.

1.4.1 Antígeno do cerne do vírus da Hepatite B (HBcAg).

O vírus da Hepatite B (HBV), pertencente a família Hepadnaviridae, possui um genoma com uma organização altamente compacta, abrigando quatro fases abertas de leitura (ORFs) sobrepostas. Essas regiões são identificadas por S (superfície), C (cerne), P (polimerase) e X (proteína X), e são codificantes para proteínas virais, estruturais específicas e não estruturais (SEEGER; MASON, 2000).

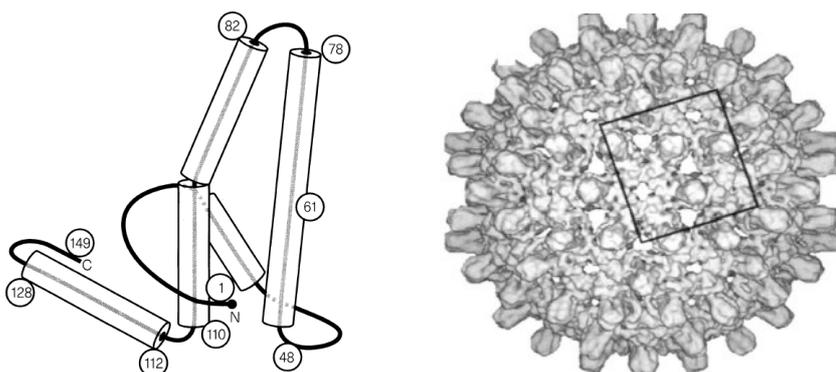
O gene C codifica quatro polipeptídeos, sendo dois deles de maior relevância. O primeiro AUG traduzido corresponde à proteína precoce o HBe, de 18 kDa, que é o antígeno secretado e associado à infecção persistente (MILICH; LIANG, 2003). Já a tradução no segundo AUG leva à síntese da proteína do cerne do vírus, a HBcAg de 21 kDa, que se dimeriza para a montagem do nucleocapsídeo icosaédrico do vírion, constituído por 180 ou

240 desses dímeros que formam projeções para fora do cerne (BOTTCHEER, B. WYNNE, S.A. CROWTHER, 1997; PUMPENS; GRENS, 2001; SCHÖDEL et al., 1992).

As proteínas do cerne do vírus do HBV possuem a capacidade de se auto montarem, formando as VLPs (Figura 7). As partículas formadas possuem um tamanho aproximado de 30nm. Desde o início da expressão do gene C em *E.coli*, a proteína HBcAg tem se tornado uma poderosa e promissora ferramenta de engenharia, servindo como uma plataforma modelo de carreador de epítomos externos, alvos para sinalização celular e ainda para o armazenamento de material genético e sequências imunestimuladoras (PUMPENS; GRENS, 2016).

Embora a HBcAg seja um antígeno interno do vírus, essa proteína possui uma elevada capacidade imunogênica, sendo reconhecida durante a infecção causada pelo HBV. A proteína HBc pode ser expressa em diferentes sistemas homólogos e heterólogos, incluindo o uso das leveduras *S. cerevisiae*, *Pichia pastoris* e bactérias, que mantem de igual forma a capacidade de formar uma estrutura particulada como o nucleocapsídeo viral. As VLPs recombinantes são formadas por duas isoformas, de forma semelhante ao vírus nativo, com número de triangulações T=3 e T=4, consistindo em 180 ou 240 subunidades respectivamente, sendo esta última a mais comum (CROWTHER et al., 1994; SCHÖDEL et al., 1992).

Figura 7. Representação da forma monomérica e da VLP HBcAg com 180 repetições.



Fonte: Bottcher, B. Wynne, S.A. Crowther, (1997). A esquerda temos a representação da forma monomérica da VLP formada pelo antígeno HBcAg e a direita a formação da VLP representada com as 180 repetições, com destaque a porção imunodominante da partícula.

O uso desta proteína como carreadora de epítomos heterólogos foi primeiramente descrito por Clarke et al., (1987), sendo utilizada para exibir antígeno *foot-and-mouth disease* vírus (doença vesicular dos pés e das mãos- *Picornaviridae*).

Apesar do antígeno do envelope, o HBsAg, ser utilizado como carreador de epítomos em algumas vacinas, a proteína carreadora HBcAg é significativamente mais imunogênica durante a infecção natural e como proteína recombinante (HOOFNAGLE; GERETY; BARKER, 1973; MILICH et al., 1987). O HBcAg possui ainda a vantagem de ser mais flexível, o que possibilita a inserção de um número maior de epítomos em sua superfície. A inserção de epítomos B preferencialmente devem ser feita na região de *loop* localizada entre os aminoácidos 78-82 e epítomos de células T devem ser inseridos na porção carboxi-terminal de HBcAg (BIRKETT et al., 2002).

Graças ao uso da plataforma HBcAg como carreadora de epítomos humanos heterólogos, uma vacina contra malária alcançou, pela primeira vez, a fase clínica de testes. A vacina Malarivax (ICC-1132) foi construída a partir de epítomos B e T CD4⁺ universais da proteína circumsporozoíta de *Plasmodium falciparum* inseridos na região do *loop*, e na porção carboxi terminal um segundo epítomo de células T CD4⁺. Esta construção se mostrou altamente imunogênica em camundongos quando administrada em conjunto ao adjuvante completo de Freund com título de anticorpos ultrapassando 10⁶, em primatas não humanos melhor resultado foi obtido com a utilização de Montanide ISA 720 como adjuvante, com títulos de anticorpos de 9x 10⁵ após a última imunização. Nos testes clínicos, foram conduzidas imunizações com esta construção administrada em conjunto com duas formulações diferentes de adjuvante: Montanide ISA 720 e adsorvida em alumínio. Os resultados demonstraram que uma única dose da vacina formulada em Montanide ISA720 gerou título de anticorpos anti-repetições de CS de *P. falciparum* comparáveis com a resposta imune obtida após múltiplas imunizações com a vacina adsorvida em alumínio (OLIVEIRA et al., 2003; WHITACRE; LEE; MILICH, 2009).

1.4.2 Aplicação da teoria das VLPs ao modelo da proteína CS de *P. vivax* para o desenvolvimento de um candidato vacinal contra malária humana.

A malária é uma doença infecciosa e prevalente na maioria das regiões tropicais do mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca da metade da população está em risco de contrair a doença. Em 2017, houve uma estimativa de 435.000 mortes pelo mundo e 219 milhões de casos (WHO, 2018).

A doença é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, sendo transmitido ao homem pela picada das fêmeas de mosquitos pertencentes ao gênero *Anopheles*. Cinco espécies de *Plasmodium* são conhecidas por infectarem e causarem a malária em humanos: *P.*

falciparum, *P. vivax*, *P. ovale* (alguns autores consideram duas espécies separadas, *P. ovale curtisi* e *P. ovale wallikeri*) (ANSARI et al., 2016; RUTLEDGE et al., 2017), *P. malariae* e a espécie zoonótica *P. knowlesi* (MAGUIRE; BAIRD, 2010). A infecção tem início com a inoculação das formas de *Plasmodium* presentes nas glândulas salivares dos *Anopheles*, durante o repasto, conhecidas como esporozoítos, as quais ingressam dessa maneira no tecido subcutâneo do hospedeiro vertebrado (Figura 8).

Fase pré-eritrocítica: Corresponde à primeira etapa da vida do parasito no hospedeiro vertebrado, sendo curta e clinicamente silenciosa, com uma média de 15-50 esporozoítos (variando entre as espécies) inoculados em uma única picada durante o repasto sanguíneo. Após a inoculação dos esporozoítos, uma proporção importante permanece no local da picada por um período de até sete horas, os demais se movem através da derme, até encontrarem os vasos sanguíneos (20%) ou sistema linfático (30%) (KORI; VALECHA; ANVIKAR, 2018). O transporte via corrente sanguínea é rápido e vai ao encontro o fígado, graças a proteína circumsporozoíta (CS), que possui afinidade pelos proteoglicanos expressos na superfície dos hepatócitos e células estelares hepáticas (LAZDINA et al., 2001; PINZON-ORTIZ et al., 2001; PRADEL; GARAPATY; FREVERT, 2002). Os esporozoítos penetram o endotélio sinusóide através ou ao redor das células de Kupffer e células endoteliais até ganharem os hepatócitos. Nos hepatócitos, os esporozoítos continuam a realizar várias invasões até terminarem em um hepatócito final, pela possível ativação do esporozoito pelos níveis de sulfatação dos proteoglicanos de sulfatos de heparano (HSPG - *Heparan Sulfate Proteoglycans*) (COPPI et al., 2007; MÉNARD et al., 2013).

Uma vez no hepatócito final e inclusos em um vacúolo parasitóforo, o parasito sofre esquizogonia dando origem aos esquizontes, que se segmentam em merozoítos, dentro dos merossomos (MÉNARD et al., 2013; PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006).

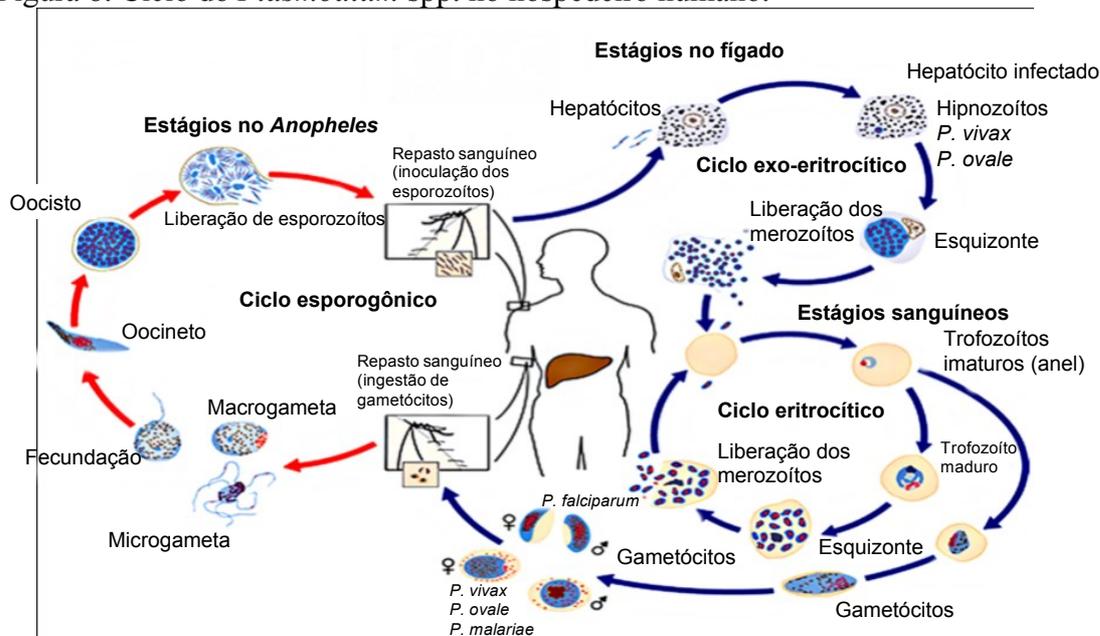
Durante essa fase, alguns esporozoítos de *P. vivax* e *P. ovale* não entram no processo de esquizogonia permanecendo quiescentes no fígado, sendo denominados hipnozoítos (formas latentes), que são responsáveis pelas recaídas da doença meses e até anos após a infecção (ADAMS; MUELLER, 2017).

Fase eritrocítica: Após a liberação dos merossomos dos hepatócitos, os merozoítos são entram na corrente sanguínea e cada merozoíto irá invadir um eritrócito e ou reticulócitos (no caso de *P. vivax*). Nos eritrócitos, os merozoítos passam por um processo de diferenciação em trofozoítos, que se dividem mitoticamente para formar um esquizonte eritrocítico, dando início à fase eritrocítica (STURM et al., 2006). O ciclo eritrocítico finaliza com a ruptura das células infectadas (eritrócitos) e a invasão de novos eritrócitos pelos

merozoítos recém-formados. Essas invasões nos diferentes eritrócitos reflete o estado clínico da infecção que está associado à liberação de sucessivas gerações de merozoítos a partir dos eritrócitos infectados. Cada ciclo tem duração de 48 a 72 horas, dando origem aos quadros febris da malária.

Uma pequena proporção dos parasitos na fase eritrocítica se diferencia sexualmente para produzir as formas sexuais ou gametócitos, que serão adquiridos pelo mosquito *Anopheles* durante o repasto sanguíneo nos hospedeiros vertebrados infectados. A picada da fêmea anofelina nesse período permite completar o ciclo de vida do parasito no intestino médio do mosquito, uma vez que os gametas irão se fundir dando origem aos esporozoítos que, por sua vez, migrarão para as glândulas salivares do inseto para serem transmitidos em uma próxima picada (SMITH; VEGA-RODRÍGUEZ; JACOBS-LORENA, 2014).

Figura 8. Ciclo do *Plasmodium* spp. no hospedeiro humano.



Fonte: Adaptado de CDC, 2018.

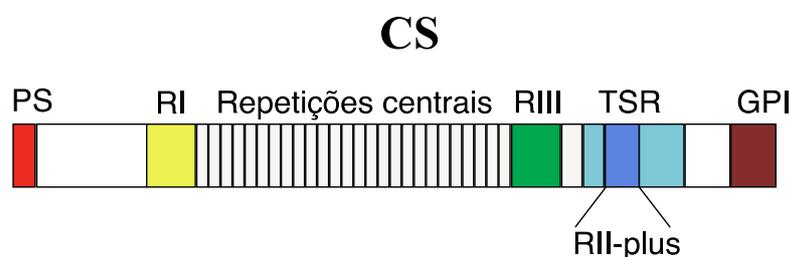
Atualmente, mais de 90% dos casos reportados no Brasil ocorrem na região Amazônica, sendo ocasionados principalmente pelas espécies *P. falciparum* e *P. vivax*. Segundo a WHO, dos 219.000 casos reportados em 2017, a espécie *P. vivax* foi responsável por 175 mil casos nas Américas (WHO, 2018). Apesar da espécie *P. falciparum* ser responsável pela maioria dos casos graves, é evidente a preocupação mundial em relação aos casos, a gravidade da doença e à incidência de *P. vivax*. A patogenia, em decorrência da malária causada por *P. vivax*, tem se mostrado muito semelhante à infecção por *P. falciparum*, tendo sido relatados casos de anemia severa, trombocitopenia, edema pulmonar agudo,

complicações renais e até casos de malária cerebral (MENDONÇA et al., 2015; NURLEILA et al., 2012). Em crianças, a malária vivax é responsável por quadros de anemia severa podendo se agravar e causar múltiplas recaídas, além de estar diretamente relacionada a desnutrição, aborto espontâneo e retardo do crescimento do feto em gestantes (GENTON et al., 2008; MEDINA-MORALES et al., 2016).

A malária tem um impacto negativo no crescimento econômico das regiões afetadas, porque a doença limita o desenvolvimento social e econômico ao impedir que cidadãos em idade produtiva possam exercer as suas funções cotidianas. Apesar dos esforços realizados no combate à malária e aos avanços alcançados nos últimos anos, ainda não dispomos de uma vacina 100% eficaz contra a malária, com capacidade de impedir a infecção por *Plasmodium* spp.

O desenvolvimento de uma vacina pré-eritrocítica poderia prevenir tanto a infecção, quanto as recidivas da doença causada pelos hipnozoítas na malária por *P. vivax*, além da redução da transmissão. Dentre os principais antígenos alvos para o desenvolvimento de vacinas pré-eritrocíticas, temos a proteína circumsporozoíta (CS), que foi identificada primeiramente na espécie *Plasmodium berghei* e logo depois reconhecida nas outras espécies de *Plasmodium*, com estruturas e propriedades imunológicas similares, sendo típica e exclusiva do gênero Apicomplexa (NUSSENZWEIG; NUSSENZWEIG, 1985; YOSHIDA et al., 1980). Os genes da proteína CS estão bem caracterizados e a análise da estrutura primária identifica três regiões comuns nas diferentes espécies de *Plasmodium* que inclui: um peptídeo sinal (N-terminal), um domínio central composto por repetições de aminoácidos em *tandem* espécie-específico e a porção C-terminal com domínio de adesão celular (TSR-trombospondina) (Figura 9) (KAPPE; BUSCAGLIA; NUSSENZWEIG, 2004).

Figura 9. Apresentação esquemática da proteína CS e seus diferentes domínios estruturais.



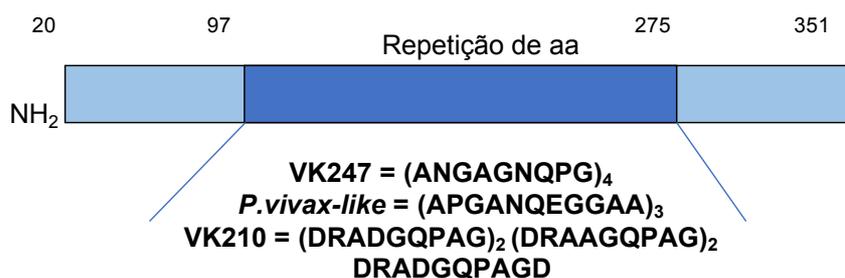
Fonte: Adaptado de Kappe; Buscaglia; Nussenzweig, 2004. PS - peptídeo sinal; RI-região I; Repetições centrais de aminoácidos (epítomos B); RIII-região III; TSR-domínio de adesão celular tipo I localizado na RII-plus-região II; GPI-cauda de glicosilfosfatidilinositol

A proteína CS é o antígeno expresso de forma mais abundante na superfície do parasito. Durante o estágio pré-eritrocítico, pelo menos duas funções da CS são importantes em facilitar a invasão nos hepatócitos: a primeira diz respeito à motilidade, na qual CS se move da extremidade anterior para a posterior do esporozoíto, permitindo que os esporozoítos depositados na derme, migrem por deslizamento através dos capilares em direção à corrente sanguínea (STEWART; VANDERBERG, 1991). A motilidade é crucial durante o processo de atravessamento do epitélio e posteriormente na invasão hepática. A outra importante função está relacionada à adesão e invasão dos esporozoítos nos hepatócitos. Esta proteína liga-se à proteína HSPG na superfície dos hepatócitos, um processo no qual o domínio N-terminal e C-terminal da região TSR estão implicados. A ligação entre N-terminal e HPGs resulta em uma reação de clivagem da CS, levando à exposição da região TSR, que até então é aparentemente mascarada pela região N-terminal. Esta exposição leva ao processo de invasão do esporozoíto ao hepatócito (COPPI et al., 2011).

Apesar das regiões N- e C-terminais também serem alvos da ação de anticorpos, a maior parte da resposta imune induzida é dirigida contra a porção central da proteína.

A região central da CS em *P. vivax* é formada por um número variável de repetições em *tandem* que contem epítomos imunodominantes de células B, cujas variações alélicas caracterizam três genótipos. O primeiro e mais comum é o nonapeptídeo repetitivo GDRA (D/A) GQPA que caracteriza a variante CS-VK210, já a repetição ANGA (G/D)(N/D) QPG corresponde a variante CS-VK247 (ARNOT et al., 1985; ROSENBERG et al., 1989) e ainda um terceiro tipo denominado *Vivax-like* com a repetição APGANQ (E/G) GAA (QARI et al., 1993) (QARI et al., 1993) (Figura 10). Anticorpos anti- CS tem demonstrado diminuir a motilidade dos esporozoítos, e até mesmo inibir a infectividade dos mesmos, sendo o candidato pré-eritrocítico mais avançado nos estudos vacinais contra a malária (STEWART et al., 1986; VANDERBERG; FREVERT, 2004).

Figura 10. Representação esquemática das variantes formas alélicas da proteína CS de *P. vivax*.



Fonte: Adaptado de Teixeira et al., 2014. A porção central, em azul escuro, corresponde às regiões de repetição dos aminoácidos presente em cada variante da proteína CS. Cada variante e sua sequência particular está representada entre parenteses.

O sucesso da indução da proteção estéril contra a infecção malárica foi demonstrado primeiramente em camundongos imunizados com esporozoítos irradiados de *P. falciparum* (NUSSENZWEIG et al., 1969). Evidências de que a resposta imune é direcionada para a proteína CS de *P. vivax* e que a produção de anticorpos desempenham um importante papel protetor contra este parasito, foram demonstradas em estudos clínicos com voluntários imunizados com esporozoítos irradiados e protegidos do desafio, graças à geração de anticorpos anti-CS (MCCARTHY; CLYDE, 1977). Embora eficaz, essa estratégia é limitada pelas dificuldades em se obter esporozoítos purificados e atenuados de forma asséptica e em quantidade suficiente para imunizações na escala global, além do potencial risco de reversão da virulência desses parasitos. Devido à essas limitações, os estudos para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária têm focado na utilização de antígenos baseados em epítomos imunodominantes, para a geração de proteína e ou peptídeos que fossem imunogênicos com a adição de substâncias adjuvantes ou sistemas adjuvantes, como por exemplo, o uso da plataforma VLP. Até o momento temos uma única vacina, a RTS,S, que consiste nos aminoácidos 207 a 395 da CS da cepa NF54 de *P. falciparum*, contendo epítomos B e T conhecidos, inseridos na proteína de superfície (antígeno S) do vírus da Hepatite B (ARUN KUMAR et al., 2006).

Para *P. vivax*, somente o candidato vacinal pré-eritrocítico denominado VMP001, alcançou os ensaios clínicos de segurança em humanos. A vacina, VMP001 desenvolvida no Walter Reed Army Institute of Research, baseia-se na CS recombinante produzida em *E. coli*, com uma região central quimérica, que funde epítomos das variantes CS-VK210 e CS-VK247 de *P. vivax*. As imunizações de VMP001/AS01 foram imunogênicas em voluntários nos Estados Unidos, no entanto falharam na indução de uma imunidade estéril após o desafio, apesar do significativo atraso da parasitemia dos voluntários (BENNETT et al., 2016).

Teixeira et al., (2014) desenvolveram uma vacina contendo as três formas alélicas da proteína CS (CS-VK210, CS-VK247 e *Vivax-like*) de *P. vivax* e um quarto gene foi construído contendo sequências de nucleotídeos que codificam as três regiões distintas em fusão denominada PvCS-All-CS-epitopes. Camundongos imunizados com diferentes formulações emulsificadas em Adjuvante Completo e Incompleto de Freud e ou misturadas com o agonista TLR-3 Poly I:C apresentaram altos títulos de anticorpos gerados com as

imunizações, no entanto a resposta imune celular mediada por células T produtoras de citocinas, como TNF- α , IFN- γ e IL-2, não foram obtidas.

Num estudo prévio do nosso grupo, Almeida et al., (2014) avaliou a imunogenicidade de duas proteínas recombinantes derivadas da proteína CS de *Plasmodium vivax*. A primeira é uma VLP constituída pelo antígeno do cerne do vírus da Hepatite B (HBcAg) contendo, em sua região do *loop*, 3 cópias do epítipo de células B presente na região repetitiva da proteína CS. A imunização foi realizada utilizando o adjuvante Montanide ISA720. Os resultados demonstraram que a imunização foi capaz de gerar resposta imune humoral efetora e de memória, com alto percentual de anticorpos de alta avidéz, bem como resposta balanceada dos perfis Th1/Th2 e ainda a geração de linfócitos específicos produtores de IFN- γ ou IL-2. Porém, nenhum dado de proteção contra infecção foi relatado nesse trabalho.

Dados recentemente publicados por Salman et al., (2017), demonstram que as VLPs geradas a partir do antígeno da superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg) para a apresentação da CS de *P. vivax* foram capazes de gerar altos títulos de anticorpos IgG principalmente da subclasse IgG2a. Dos animais imunizados com as VLPs juntamente com o adjuvante Matrix M 100% foram protegidos frente ao desafio, ou seja, todos os animais que foram inoculados com parasitos transgênicos da espécie *P. berghei* expressando em sua superfície a CS de *P. vivax* permaneceram sem qualquer infecção sanguínea mesmo após 20 dias da realização do desafio. Porém, sabemos que, em seres humanos essas VLPs contidas na vacina RTS,S só conseguem proteger aproximadamente 40% dos indivíduos imunizados (MAHMOUDI; KESHAVARZ, 2017). Em resumo, as plataformas VLPs do HBV são muito promissoras, mas ainda necessitam ser aprimoradas, sobre tudo em questões de adjuvantes, formulação final dos antígenos recombinantes assim como sua imunogenicidade.

2. JUSTIFICATIVA

O uso de esporozoítos irradiados demonstrou capacidade de proteção contra a malária humana há mais de 40 anos, porém sua utilização é difícil até mesmo nos dias atuais devido à dificuldade em se manter culturas de esporozoítos, sendo ainda inviável o uso das glândulas salivares dos mosquitos infectados para obtenção do parasito, em larga escala em uma vacinação mundial. Adicionalmente esta imunização não induz memória imunológica duradoura, de forma que teriam que ser administradas repetidas doses dessa vacina em intervalos relativamente pequenos de tempo.

As vacinas recombinantes têm surgido como uma esperança para o desenvolvimento das vacinas antimaláricas. De fato, o único candidato vacinal com uma mínima eficiência em comercialização, apesar de sua imperfeição, é a vacina recombinante RTS,S fabricada pela multinacional farmacêutica GSK. No entanto, essa vacina é contra a espécie *P. falciparum* endêmica na África. A espécie prevalente no Brasil é o *P. vivax*, que apesar dos números elevados de infecções ainda é mais negligenciado do que o *P. falciparum*.

Sendo assim a hipótese deste trabalho baseia-se no fato de que a plataforma VLP - HBcAg utilizada para a inserção de epítopos B da proteína CS de *P. vivax* é capaz de induzir proteção e, se aliada a combinação de adjuvantes com perfil imunológico complementar, atrairemos um maior número de APCs para o local da imunização, o que aumentará a captura e apresentação antigênica melhorando consequentemente a resposta imune humoral e celular a ponto de proteger de forma mais eficaz os animais frente ao desafio com parasitos transgênicos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

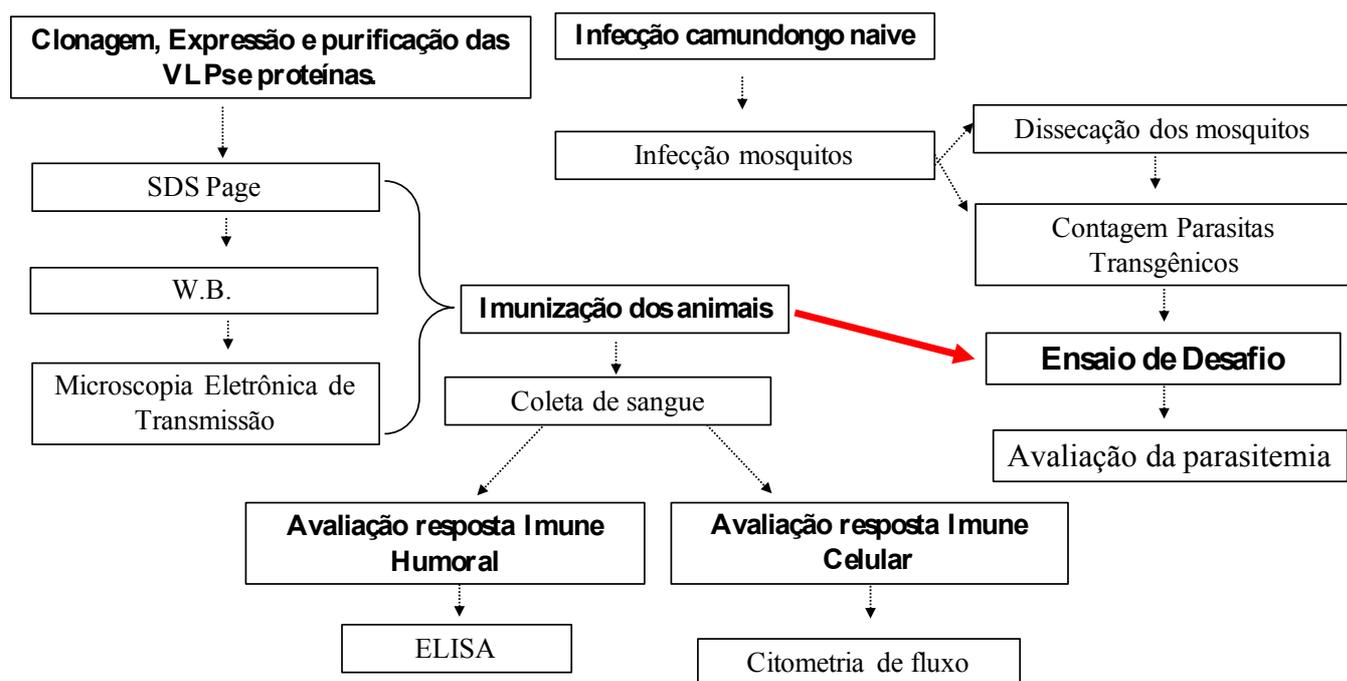
O presente trabalho tem como objetivo a geração de uma formulação vacinal protetora contra a malária humana causada pela espécie *Plasmodium vivax*, pela combinação de plataformas VLPs e adjuvantes compatíveis com uso humano.

3.2 Objetivos específicos

- Desenho *in silico* do gene recombinante, para a geração de uma nova VLP contra *P. vivax* baseada na proteína HBcAg, geração das bactérias recombinantes com capacidade de expressão das VLPs e purificação da proteína recombinante;
- Geração das bactérias recombinantes com capacidade de expressão das proteínas inteiras CS-VK247 e CS-VK210 e purificação das proteínas recombinantes;
- Testes *in vitro* da antigenicidade e correção estrutural das VLPs produzidas e preparação de lotes homogêneos para realizar as formulações vacinais;
- Imunização dos camundongos da linhagem BALB/c com os candidatos vacinais selecionados pela combinação das VLPs em duas formulações diferentes de adjuvante para protocolo dose reforço;
- Avaliação da resposta imune humoral pela técnica de ELISA com os soros dos animais imunizados;
- Avaliação da resposta imune celular pela técnica de citometria de fluxo;
- Análise da proteção dos animais imunizados frente ao desafio com parasitas transgênicos *P. berghei*[*CS vivax*] pela determinação da sobrevivência dos animais e do tempo prepatente até a aparição da parasitemia.

4. Materiais e métodos

4.1 Estratégia de trabalho.



4.2 Desenho da VLP HBcAgPvCS-VK247.

O desenho da construção da VLP HBcAgPvCS-VK247 foi baseada na sequência de aminoácidos da proteína CS de *P. vivax*, correspondente aos epítomos B da região central da variante CS-VK247, segundo a literatura descrita por Arnot et al., (1985). A sequência correspondente à CS foi inserida entre os aminoácidos 78 e 79 da sequência HBcAg e truncada ao aminoácido 149 para eliminar o domínio de ligação ao RNA do HBV. Sítios das enzimas de restrição NdeI e XhoI foram inseridas entre a sequência HBcAgCS-VK247, destinadas ao processo de clonagem no plasmídeo. A análise das enzimas de restrição foi realizada utilizando NEBCutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), da empresa New England Biolabs.

Com base na sequência gênica otimizada foi produzido um gene sintético pela empresa Genone e clonado no plasmídeo pET28a (pET28a HBcAg-PvCS-247). Na construção temos ainda uma sequência codificadora, que permite a expressão da proteína fusionada a uma cauda de histidina (6xHis) na C-terminal.

A segunda construção utilizada no presente trabalho, corresponde a uma VLP elaborada e caracterizada em trabalhos anteriores realizado pelo nosso grupo. Esta VLP, denominada aqui como HBcAgPvCS-VK210, corresponde a proteína do cerne do vírus da Hepatite B, contendo a sequência central repetitiva da proteína CS de *P. vivax* da variante CS-VK210 (ALMEIDA et al., 2014).

4.3 Predição da estrutura conformacional da proteína recombinante.

A fim de verificar a semelhança desta proteína com a estrutura dos monômeros do HBcAg descrita anteriormente por Bottcher, B. Wynne, S.A. Crowther (1997), realizamos a predição da conformação estrutural *in silico* da proteína HBcAgPvCS-VK247. O resultado da

predição foi fornecido pelo servidor *Swiss-Pdb Viewer* (Swiss Institute of Bioinformatics Quartier Sorge – Lausanne) a partir da sequência de aminoácidos da proteína recombinante.

4.4 Obtenção das proteínas CS recombinantes de *P. vivax*.

4.4.1 Transformação bacteriana por choque térmico.

Para obtermos as proteínas recombinantes da CS de *P.vivax*, utilizamos o sistema procarioto de expressão. Para isso, fizemos a inserção dos plasmídeos pET28a HBcAg-PvCS-247, pET28a HBcAg-PvCS-VK210, pET28a PvCS-VK247, pET28a PvCS-VK210 nas bactérias da linhagem DE3 de *E.coli*, pela transformação bacteriana por choque térmico, conforme descrito por Pope; Kent, (1996). Após a transformação, as bactérias foram cultivadas em LB ágar (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl, 2% ágar bacteriológico e pH 7,5) suplementado com o antibiótico para o qual o plasmídeo confere resistência.

4.4.2 Expressão das Proteínas Circumsporozoíta Recombinantes de *Plasmodium vivax*.

As bactérias *E. coli* DE3 (Agilent Technologies) contendo o plasmídeo de interesse foram inoculadas em 5 mL de meio LB, contendo antibiótico de resistência para cada plasmídeo e cultivada *overnight* a 37°C, sob constante agitação. Uma alíquota de 3 mL dessa cultura foi transferida para frascos contendo 50 ml de meio LB sem antibiótico e incubada a 37°C e 250 x g até atingir a D.O. de 0,6 para posterior adição de 1 mM (concentração final) de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Um tubo (controle negativo) não recebeu a adição de IPTG. A cultura foi crescida a 37°C, 250 x g, por 4 horas. Ao fim do período de incubação, as células foram centrifugadas a 5000 x g, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi mantido a -20°C até o momento de sua utilização para a purificação.

4.4.3 Purificação das Proteínas Circumsporozoíta Recombinantes sob condições nativas.

A purificação das proteínas HBcAgPvCS-VK247, HBcAgPvCS-VK210, proteínas inteiras CS-VK247 e CS-VK210 foram realizadas sob condições nativas em coluna de níquel (Invitrogen, California). Sucintamente, os sedimentos das culturas bacterianas, foram ressuspendidos em tampão de lise (250 mM NaH₂PO₄, pH 8.0 2.5 M NaCl) a 4°C, por 30 minutos. O lisado foi sonicado em banho de gelo (3 pulsos de alta intensidade de 30 segundos, com intervalos de 15 segundos entre cada pulso) e centrifugado por 30 min a 3000 x g. Após a lise, essa suspensão foi adicionada na coluna de níquel e mantido sob agitação, por 1 hora a temperatura ambiente. Após esse período a coluna foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem para posterior eluição das proteínas com tampão de eluição.

4.4.4 Caracterização das proteínas em SDS-PAGE.

Todas as proteínas purificadas foram resolvidas por fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida bifásico, em condições desnaturantes, SDS-PAGE 12%. Alíquotas das proteínas foram aquecidas a 95°C por 5 minutos em tampão de amostra para desnaturá-las. As amostras e marcador de tamanho molecular foram aplicadas no gel de poliacrilamida bifásico 10% (acrilamida/bisacrilamida na proporção 29:1) em tampão Tris-glicina (Tris base 25 mM pH 8,3, glicina 250 mM, SDS 0,1%) para fracionamento eletroforético a 40 mA por gel, por 1 hora. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução azul de *coomassie* (0,25% (p/v) do corante Coomassie Blue G-250 - Sigma) durante 3 horas, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Em seguida, o gel foi descorado em solução descorante (40% metanol, 10% ácido acético glacial, 50% água) até a visualização das bandas.

4.4.5 Confirmação da expressão das proteínas por Western Blotting (W.B.).

O ensaio de *W. B.* foi realizado para avaliar se as proteínas recombinantes expressas em *E. coli* (DE3) foram recuperadas nos eluatos obtidos pelo processo de purificação em coluna de níquel. A presença da cauda de histidina nas proteínas recombinantes, nos permite avaliar esses eluatos por meio da utilização do anticorpo primário anti-Histidina (abcam,

England) e do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Zymed).

Primeiramente as proteínas foram fracionadas eletroforéticamente para posteriormente serem realizadas as transferidas para a membrana de nitrocelulose *Bio-Rad's* (Amersham Biosciences) $0.45\mu\text{m}$. Para a imunodeteção, os sítios de ligação inespecíficos na membrana foram bloqueados usando solução de bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação constante. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo primário diluído na solução *blotting buffer* (TrisHCl- 250 mM, NaCl- 150 mM 0,1%*Tween*-20) com 2% de leite em pó desnatado, temperatura ambiente por 1 hora e sob agitação constante. Após três lavagens com *PBS-Tween* (PBS-NaCl- 137 mM, KCl- 2.7 mM, Na_2HPO_4 -10 mM, KH_2PO_4 - 1.8 mM, 0,1% *Tween*-20 pH to 7.4) a membrana foi incubada com anticorpo secundário diluído na solução *blotting buffer* por 1h a temperatura ambiente. Após esse período foram feitas 3 lavagens com *PBS Tween*. Para a detecção da presença das proteínas na membrana, foi utilizado Kit *SuperSignal™* West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, EUA) e as imagens foram capturadas pelo fotodocumentador *ChemiDoc™* Imaging Systems.

4.4.6 Confirmação da expressão das VLPs pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

A confirmação da formação das VLPs (VLP HBcAgPvCS-VK247 e VLP HBcAgPvCS-VK210) foi feita utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para isso, utilizamos 50 μl das VLPs HBcAgPvCS-VK247 ou HBcAgPvCS-VK210 após purificação em coluna de níquel e ainda como controle negativo utilizamos o eluído da bactéria BL21(DE3) não transformada. Foram utilizados grids de níquel de 3,05 mm (revestido com parlódio e vaporizado com carbono; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pensilvânia, USA), onde adicionamos individualmente em cada grid o volume das eluições, sendo posteriormente dispostos em papel filtro para secagem do líquido sob temperatura ambiente. A etapa de contrastação foi realizada no dia seguinte sendo acrescentada uma gota de acetato de uranilo 2% filtrado em filtro de 0,22 μm sobre os grids, incubado por 1 minuto protegido de luz sendo retirado o excesso com auxílio de papel de filtro para posterior

armazenamento em porta grids. No dia seguinte, as amostras foram visualizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, JEM-1011 TEM.

4.5 Protocolo de imunização dos camundongos com as formulações vacinais contra *P. vivax* baseadas na plataforma VLP.

A realização dos testes de imunização com animais foi autorizada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UFSC, protocolo número 5560250219) e pelo University of Oxford Animal Care and Ethical Review Committee (PPL30/2889). Foram utilizados protocolos de imunização conhecidos como dose-reforço homólogo. Em todos os experimentos utilizamos animais da linhagem BALB/c, com idade de 6 a 8 semanas, provenientes do biotério Setorial do MIP da UFSC e Universidade de Oxford.

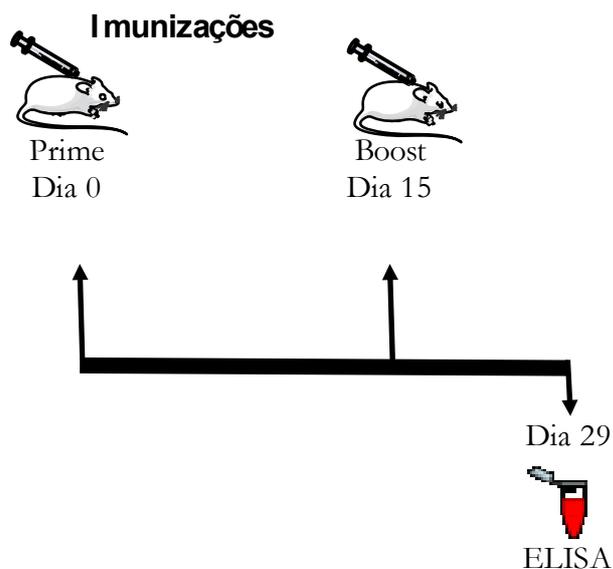
A geração inédita da VLP HBcAgPvCS-VK247 primeiramente precisava ser avaliada frente a capacidade de gerar imunidade. Sendo assim, imunizamos 3 animais em protocolo dose-reforço, com intervalo de 15 dias, na presença e ou ausência dos adjuvantes MPLA e Alhydrogel emulsionados (Quadro 3). As imunizações nesse primeiro teste foi realizada pela via subcutânea, na concentração de 10 µg da VLP para cada animal, seguindo o protocolo de imunização demonstrado pela figura 11.

Quadro 3. Verificação da imunogenicidade da VLP HBcAgPvCS-VK247.

	Antígeno	Adjuvante
G1	HBcAgPvCS-VK247	MPLA <i>B.pertussis</i> + Alhydrogel
G2	HBcAgPvCS-VK47	-
G3	PBS	-

Fonte: A autora.

Figura 11. Linha do tempo das imunizações com a VLP HBcAgPvCS-VK247.



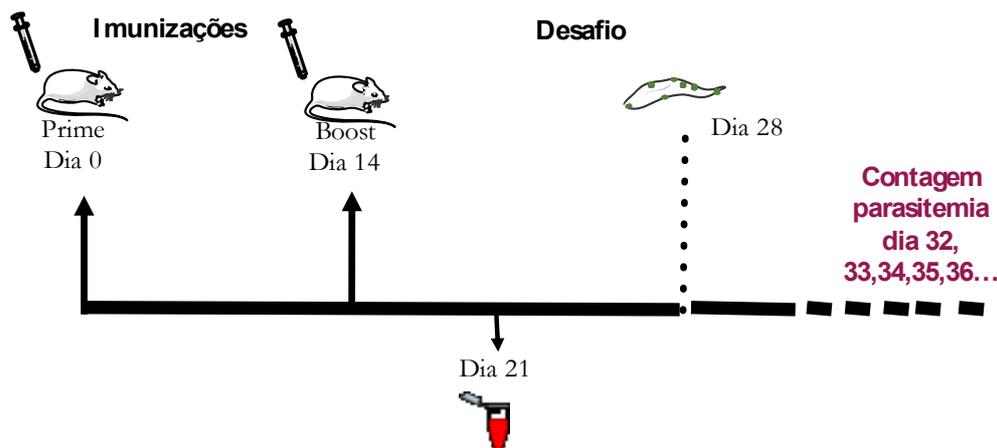
Fonte: A autora. Linha do tempo representando o protocolo utilizado nas imunizações. **Prime dia 0** representa o primeiro dia que o camundongo foi vacinado. **Boost Dia 15** corresponde a dose reforço. **Dia 29 ELISA** indica a coleta de sangue realizada para ensaios imunológicos.

Após a confirmação da capacidade da VLP HBcAgPvCS-VK247 em gerar resposta imune em animais da linhagem BALB/c, pela técnica de ELISA, seguimos para os experimentos onde testamos duas formulações vacinais, experimentos 02 e 03, que foram realizados em colaboração com a Universidade de Oxford, durante o período de estágio sanduíche nesta instituição.

Nos experimentos seguintes as imunizações foram via intramuscular (músculos posteriores da coxa do animal: bíceps femoral e/ou abductor), igualmente na concentração de 10 μg da VLP para cada animal em protocolo dose-reforço. A mudança pela via de inoculação foi necessária devido a falta de um profissional habilitado na ocasião para a realização das imunizações pela via subcutânea.

No experimento 02, realizamos a comparação entre duas formulações vacinais geradas pela combinação dos adjuvantes, seguindo o protocolo de imunizações demonstrado na figura 12. Os animais foram separados em grupos de 6 animais, recebendo cada grupo a formulação vacinal correspondente como demonstrado no quadro 4. Como controle negativo do antígeno HBcAg incluímos a VLP HBcAgCMV, que é uma VLP equivalente sem a adição do epítipo protetor da CS de *P. vivax*, e que possui epítipos de Citomegalovírus expostos no *loop*, isso nos permitiu comparar a diferença da imunização anti-malárica da VLP HBcAgPvCS-VK210 com a VLP HBcAgCMV.

Figura 12. Linha do tempo dos animais imunizados no experimento 02.



Fonte: A autora. Linha do tempo representando o protocolo utilizado nas imunizações. **Prime dia 0** representa o primeiro dia que o camundongo foi vacinado. **Boost Dia 14** corresponde a dose reforço, duas semanas após a primeira dose. **Dia 21** indica a coleta de sangue realizada para ensaios imunológicos. **Dia 28** indica o início do ensaio de desafio. **Contagem da parasitemia** representa as coletas diárias de sangue para análise da sobrevivência dos animais até a parasitemia positiva.

Quadro 4. Grupos dos animais imunizados.

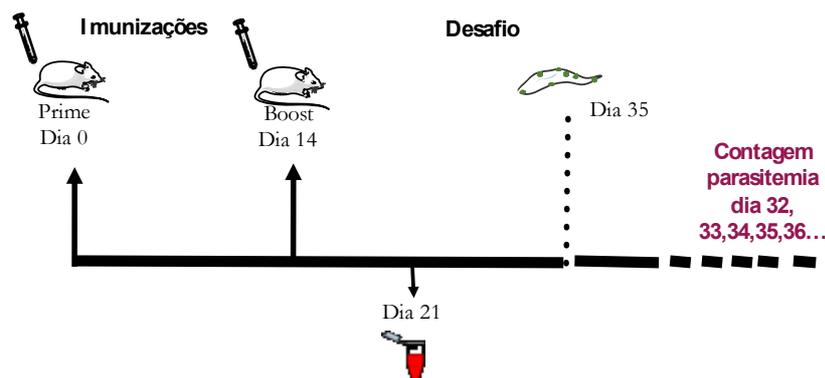
	Antígeno	Adjuvantes
G1	HBcAgPvCS-VK210	MPLA <i>B.pertussis</i> +Alhydrogel
G2	HBcAgPvCS-VK210	Poly I:C+Addavax
G3	HBcAgPvCS-VK210	-
G4	HBcAgCMV	MPLA <i>B.pertussis</i> +Alhydrogel
G5	HBcAgCMV	Poly I:C+Addavax
G6	HBcAgCMV	-
G7	PBS	-

Fonte: A autora.

Para o experimento seguinte (experimento 03), comparamos a eficiência da imunização anti-malárica da VLP construída por nós (HBcAgPvCS-VK210) com a VLP “padrão-ouro” utilizada na Universidade de Oxford, denominada Rv21 (Quadro 5). A Rv21 é um candidato vacinal constituído por uma VLP que também utiliza o vírus da Hepatite B

como plataforma, no entanto, os epítomos B da proteína CS estão inseridos na sequência que codifica a proteína de superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg) (SALMAN et al., 2017). Todas as imunizações foram realizadas exatamente como mencionada para o experimento 02. Porém, o ensaio de desafio foi realizado 21 dia após o recebimento da dose reforço (Figura 13).

Figura 13. Linha do tempo dos animais imunizados no experimento 02.



Fonte: A autora. Linha do tempo representando o protocolo utilizado nas imunizações. **Prime dia 0** representa o primeiro dia que o camundongo foi vacinado. **Boost Dia 14** corresponde a dose reforço, duas semanas após a primeira dose. **Dia 21** indica a coleta de sangue realizada para ensaios imunológicos. **Dia 35** indica o início do ensaio de desafio. **Contagem da parasitemia** representa as coletas diárias de sangue para análise da sobrevivência dos animais até a parasitemia.

Quadro 5. Experimento 03- Grupos dos animais imunizados.

	Antígeno	Adjuvantes
G1	HBcAgPvCS-VK210	Poly I:C+Addavax
G2	Rv21	Poly I:C+Addavax
G3	PBS	-

Fonte: A autora.

4.6. Resposta Imune Humoral contra a repetição central da CS.

4.6.1 Ensaios Imunoenzimáticos (ELISAs) para detecção de anticorpos do tipo IgG total utilizando soros de camundongos imunizados.

A detecção de anticorpos IgG foi determinada pelo ensaio de ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay), utilizando soros de camundongos imunizados com as diferentes formulações, coletados após receberem a segunda dose da vacina.

O sangue foi coletado em tubos de soro (Microvette -Sarstedt) centrifugado, na velocidade máxima por 10 minutos à temperatura ambiente para coleta do soro e posterior armazenamento a -20°C (freezer) para análise. Os ensaios de ELISA foram feitos em microplacas de poliestireno de 96 poços (“Covalent binding surface”, Costar) sensibilizadas com a proteína inteira CS-VK-247, na concentração de $5\mu\text{g/ml}$ ou com o peptídeo sintético correspondente as repetições centrais da proteína CS variante CS-VK-210, na concentração de $2\mu\text{g/ml}$, em solução tampão carbonato $0,05\text{ M}$. As microplacas foram mantidas a temperatura ambiente *overnight* (14 a 16 h). Estas foram então lavadas 3 vezes com PBS 1X Tween $0,05\%$ ($200\mu\text{L/poço}$) e bloqueadas com solução bloqueio (5% de leite desnatado [Molico] em PBS 1X pH 7,2) por 2 h à 37°C . Após este período foi adicionado anticorpo primário diluído em solução bloqueio. Foi utilizado como anticorpo primário o soro dos camundongos imunizados com as VLPs recombinantes. As placas foram incubadas por mais 1 h à 37°C e posteriormente lavadas 5 vezes com PBS 1x Tween $0,05\%$ ($200\mu\text{L/poço}$). Em seguida, foi adicionado anticorpo secundário anti- mouse porção Fc da IgG conjugado à peroxidase (Sigma), na diluição de 1:1000 para os ELISAs com a proteína inteira e Anti-Mouse IgG (molécula total)–conjugado a fosfatase alcalina (Sigma) na diluição de 1:5000 com os peptídeos sintéticos. As microplacas foram incubadas por mais 1 h à 37°C e novamente, lavadas. Em seguida a atividade enzimática foi detectada através da adição de $100\mu\text{L/poço}$ por durante 15 min da solução de revelação contendo água destilada, tampão fosfato Na_2HPO_4 $0,2\text{ M}$, ácido cítrico $0,2\text{ M}$, OPD 1 mg/mL (Sigma) e H_2O_2 30% $1\mu\text{L/mL}$, ou a solução de 1 mg/mL de pNPP –(Sigma), diluído no buffer dietanolamina (Pierce), para os ELISAs com anticorpo ligado a fosfatase. As leituras foram realizadas imediatamente após a revelação, à 490 nm em leitor de microplaca Infinite M200 Tecan e 405 nm no leitor BioTech Microplate Reader para os ELISAs com peptídeos.

O *cut-off* foi determinado pela média do controle negativo para cada diluição acrescido de 2 desvios padrões. Os títulos de anticorpos foram determinados como Log^{10} para a menor diluição positiva acima do *cut-off*.

4.6.2 ELISA - subclasses de IgG.

A detecção de anticorpos específicos das subclasses de IgG, foi determinada através de ELISA, utilizando soros de camundongos que receberam vacinas contendo as VLPs. O ensaio foi realizado exatamente como descrito acima, porém foram adicionados anticorpos

secundários murinos anti- Fc das subclasses de IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 conjugados à peroxidase (Sigma), na diluição de 1:5000. Da mesma forma, o *cut-off* foi determinado pela média do controle negativo para cada diluição acrescido de 2 desvios padrões. As leituras foram realizadas imediatamente após a revelação, à 405 nm no leitor BioTech Microplate Reader.

Os títulos de anticorpos específicos foram determinados como Log^{10} para a menor diluição positiva acima do *cut-off*.

4.7. Avaliação da resposta Imune Celular gerada após vacinação.

4.7.1 Isolamento de linfócitos, coloração na superfície celular e coloração intra-celular (ICS).

As células respondedoras foram obtidas através da maceração individual do baço dos animais imunizados. Os eritrócitos foram lisados usando tampão hemolítico, ACK, (0.15 M NH_4Cl , 1 mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA, pH 7.2-7.3). Após uma lavagem com RPMI, os esplenócitos foram ressuspensos em meio RPMI 1640 (suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% L-glutamina, 1% streptomicina/penicilina, 1 mL/L piruvato e 1gr/L bicarbonato de sódio e 1% de aminoácidos não essenciais). A viabilidade celular foi determinada utilizando o corante Azul de Tripán (0.2%) e a contagem das células realizada em câmara de Neubauer, ajustando sua concentração para 1×10^6 células/mL. As células em cultura foram estimuladas com a proteína CS-VK210 na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ou com Concanavalina A (ConA, Sigma) na mesma concentração. As células foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 poços, com fundo U (Corning), num volume final de 200 μL por poço. Após 16 h de incubação, a 37°C em estufa com tratamento de 5% de CO_2 , foram adicionadas as culturas dos esplenócitos 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticorpo anti-CD28, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de monensina (BD Biosciences) e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brefeldina A (BD Biosciences) e incubada por mais 5 horas nas mesmas condições citadas anteriormente. Após esse período, as placas foram centrifugadas a 1500 x g, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e a placa lavada com FACS buffer (1 % BSA, PBS 1x) e mais uma vez centrifugada a 1500 x g, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado anti-CD16/CD32 (1:100) (Fc block- BD Biosciences). Após 15 minutos de incubação a 4°C, a placa foi lavada com FACS buffer, e mais uma vez centrifugada a 1500 x g, por 5 minutos, a 4°C. As células foram então marcadas com um mix de anticorpos para superfície de acordo o quadro 6. A

placa foi incubada por 20 minutos, a 4°C e posteriormente lavada 2 vezes com FACS buffer, e mais uma vez centrifugada a 1500 x g, por 5 minutos, a 4°C. Em seguida, foi adicionado 100 µL/poço de tampão de fixação e permeabilização (Cytofix/Cytoperm - BD Biosciences) e a placa foi incubada por 20 min, a 4°C. Após este período, foi adicionado 100 µL/poço de tampão Perm/Wash (BD Biosciences), para a lavagem da placa, e mais uma vez centrifugada a 1700 x g, por 5 minutos, a 4°C, por 2 vezes. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado os anticorpos para marcação intracelular (1:100) (Quadro 6) e incubada por 20 minutos, a 4°C. Após a marcação, as células foram ressuspensas em 100 µL/poço de tampão FACS *buffer*, sendo homogeneizadas e transferidas para tubos de leitura no citômetro (Cluster tubes - Corning). A fluorescência celular foi medida através do FACS Canto II (BD - Biosciences) com aquisição de 10⁶ células (eventos), e os dados foram analisados através do software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

Quadro 6. Painel de anticorpos para a citometria.

Painel anticorpos para citometria		
Células T		Clones
CD3	<i>PerCP</i>	<i>145-2C11</i>
CD4	<i>APC</i>	<i>RM4-5</i>
CD8	<i>FITC</i>	<i>53-6.7</i>
IFN-γ	<i>Pacific Blue</i>	<i>XMG1.2</i>

Fonte: A autora.

4.7.2 Determinação de citocinas por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array - CBA*).

A dosagem de citocinas foi realizada com o sobrenadante da cultura de esplenócitos dos grupos de animais imunizados e grupo controle, sendo estimuladas por 120h com a proteína CS-VK210 (10 µg/ml), Concanavalina A (10 µg/ml-controle positivo) e RPMI para sem estímulo (controle negativo). Para a quantificação utilizamos o método *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando-se os kits: Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ e TNF-α) (BD Pharmingen, CA, USA). Em resumo, o sobrenadante e os padrões de citocinas do kit foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após a incubação de 2 horas, foi acrescentado 1 mL da solução de lavagem e centrifugado por 10 minutos a 1100 x g. O sobrenadante foi desprezado e com 300 µL da solução de lavagem as amostras foram ressuspensas para as aquisições em citômetro de fluxo, BD FACS Canto II (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os resultados foram gerados utilizando o Software

FCAP Array V3.0 (BD™ Cytometric Bead Array (CBA)) e os gráficos utilizando GraphPad Prism 7.0.

4.8 Ensaio de desafio

4.8.1 Infecção dos mosquitos *Anopheles stephensi* com *P. berghei* [CS vivax].

Estoques de sangue contendo esporozoítos transgênicos de *P. berghei* [CS vivax], linhagem 2196cl01 expressando PvCS-CS-VK210 produzidos no insetário do Jenner Institute, Oxford University, foram descongelados do nitrogênio líquido e imediatamente inoculados em camundongos BALB/c pela via intraperitoneal com 100 µL. Após a inoculação, uma gota de sangue foi coletada diariamente para verificar a presença dos gametócitos e após a confirmação, o animal foi submetido a anestesia via intramuscular para a alimentação dos mosquitos *A. stephensi*.

Os mosquitos foram previamente privados de alimentação por 2 horas para posteriormente serem alimentados com os camundongos infectados que após a anestesia, foram expostos aos mosquitos por um período de 10-15 minutos. Terminada a alimentação nos animais, os mosquitos retornaram para a alimentação de frutose/acido amino-benzoico solução açucarada a 10% adicionado a vitamina complexo B embebido em algodão e mantidos a uma temperatura de 19-21°C, com ciclo de 12 horas de luz - escuro. Após uma semana, os mosquitos foram novamente alimentados com camundongos naive (não infectados) para melhorar o rendimento dos esporozoítos. Um total de 21 dias foi necessário para a manutenção dos mosquitos até o momento da dissecação. No dia do desafio todos os mosquitos foram sedados a temperatura de 4°C, para posterior dissecação das glândulas salivares. As glândulas foram removidas com auxílio de agulhas sob o uso da lupa. Após a remoção, as glândulas foram adicionadas em microtubos contendo meio Schneider e mantidos no gelo. Os esporozoítos foram liberados das glândulas após maceração e contagem no hemocitometro para o ajuste de 10^4 esporozoitos/mL de *P. berghei* [CS vivax]. Cada animal recebeu um volume final de 100 µl pela veia caudal (1000 esporozoítos por dose).

4.8.2 Determinação da curva de parasitemia.

Diariamente após o 5º dia do desafio, uma gota de sangue foi coletada da porção final da cauda e colocado sobre uma lâmina de microscopia para a realização do esfregaço. O

sangue foi seco a temperatura ambiente e posteriormente fixados com metanol e corados com solução de Giemsa 5% por 30 minutos. Passado o tempo da coloração, as lamínas foram lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente para contagem dos eritrócitos. Cerca de 1000 eritrócitos foram contados diariamente até que 1% das células estivessem parasitadas. Os animais com 1% de parasitemia, foram submetidos a eutanásia (end-point) no mesmo dia. Os camundongos que não apresentaram parasitemia até o dia 14, foram considerados protegidos de forma estéril pela vacina. Para determinar o tempo necessário para o alcance de 1% da parasitemia foi utilizado o modelo de regressão linear descrito por Reyes-Sandoval et al., (2011). O tempo para alcançar 1% de parasitemia foi utilizado na análise de sobrevivência para avaliar a eficácia da vacina.

4.9 Análises estatísticas

Inicialmente, para a realização do teste de normalidade, os dados foram submetidos ao o Teste de Shapiro-Wilk, a partir do qual foi possível verificar se as variáveis apresentavam ou não uma distribuição normal. Para dados onde se observou a normalidade dos dados, aplicou-se o teste paramétrico ANOVA seguido do teste de Tukey. Para os dados não paramétricos foi utilizado Kruskal Wallis. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$ sendo considerado estatisticamente significativo).

Todos os cálculos estatísticos e gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA) e Microsoft Excel 2016 (Microsoft Co., EUA).

5. Resultados

5.1. Geração e análise molecular e estrutural dos candidatos vacinais baseados na proteína HBcAgPvCS.

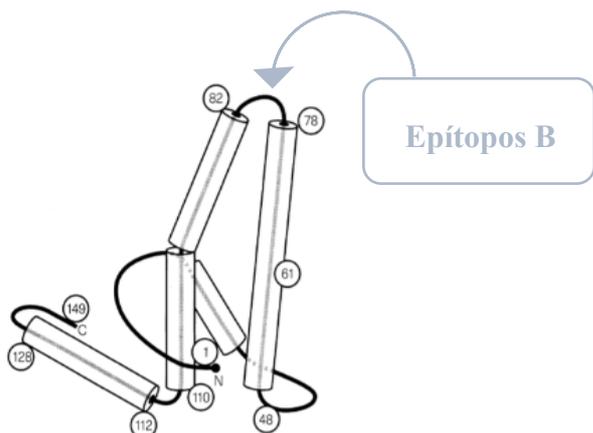
5.1.1 Desenho da VLP HBcAgPvCS-VK247.

Desenhamos *in silico* uma proteína recombinante baseada na proteína do cerne do vírus da Hepatite B, com capacidade de automontagem na forma de uma pseudopartícula viral. Inserimos na superfície da proteína do cerne, na região mais exposta dessa proteína, repetições do epítipo B protetor correspondente a uma das duas variantes mais prevalentes da proteína CS de *P. vivax* (Figura 14).

O desenho da proteína recombinante foi feito levando em consideração a sequência de aminoácidos da proteína CS variante CS-VK247 de *P. vivax* que possui 4 cópias da sequência ANGAGNQPG segundo Arnot et al., (1985). A sequência foi inserida em pontos estratégicos

da proteína HBcAg, seguindo a ideia de Schödel et al. (1992) e outros pesquisadores que definem o antígeno HBcAg do vírus da Hepatite B como uma molécula carreadora de epítomos exógenos, sendo o *loop* imunodominante a porção ideal para a inserção de epítomos B.

Figura 14. Desenho ilustrando a inserção dos epítomos B na região imunodominante “loop” da proteína HBcAg.

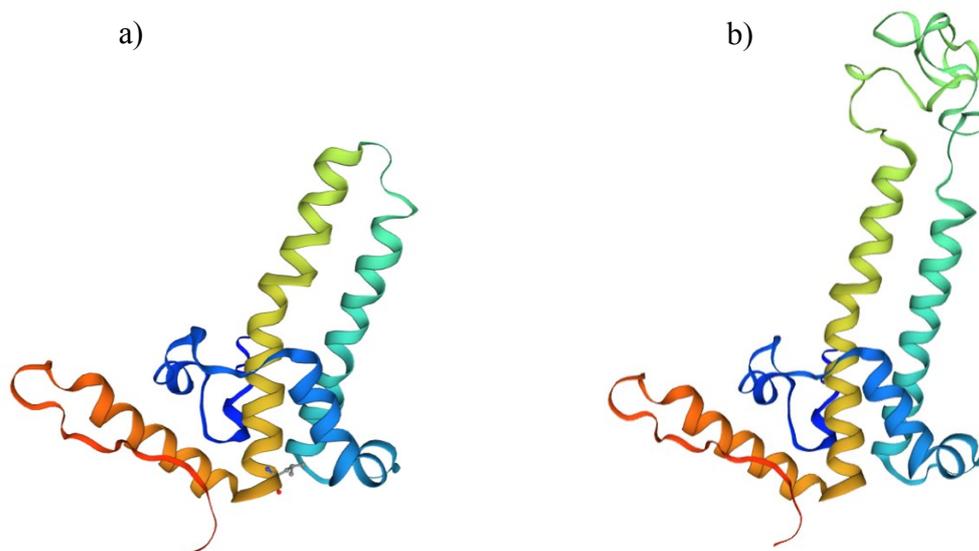


Fonte: Adaptado de Bottcher, B. Wynne, S.A. Crowther (1997). Ilustração da inserção dos epítomos B da proteína CS de *P. vivax* na região do *loop* da proteína do cerne do vírus da Hepatite B.

5.2 Predição da estrutura conformacional da proteína recombinante.

A fim de observar se a inserção de uma sequência heteróloga poderia afetar a formação da partícula, foi feita a análise *in silico* da proteína HBcAgPvCS-VK247 pelo programa *Swiss-Pdb Viewer* (Swiss Institute of Bioinformatics Quartier Sorge – Lausanne). O resultado fornecido pelo servidor *Swiss-Pdb Viewer* a partir da sequência de aminoácidos da proteína recombinante não revelou alterações estruturais significativas na proteína, sugerindo que o candidato desenhado e predito deveria manter a capacidade de formar as VLPs (Figura 15).

Figura 15. Estrutura secundária das proteínas HBcAg e HBcAgPvCS-VK247.



Fonte: A autora. Análise *in silico* da estrutura secundária da proteína HBcAg. a) estrutura conformacional da proteína do cerne do vírus da Hepatite B; b) estrutura conformacional da proteína do cerne do vírus da Hepatite após a inserção dos epítomos B da proteína CS variante CS-VK247 de *P.vivax*. Simulação feita pela plataforma SwissProt.

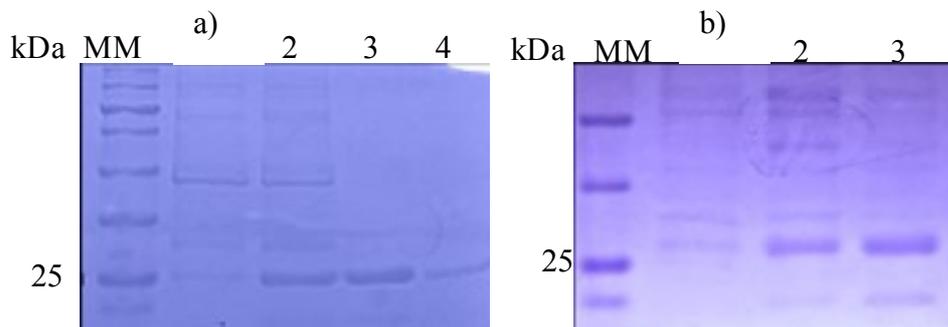
5.3 Obtenção das proteínas recombinantes.

O plasmídeo pET28a, contendo a sequência de DNA otimizada HBcAgPvCS-VK247 sintetizado comercialmente, foi utilizado para a transformação das bactérias *E. coli* BL21(DE3). Os clones selecionados por resistência ao antibiótico, foram utilizados para expressão sob indução com IPTG. Após lisado bacteriano as proteínas foram encontradas tanto na fração solúvel quanto insolúvel.

Devido a facilidade de purificar as VLPs em condições nativas, padronizamos todas as purificações (incluindo as proteínas inteiras) para as condições não desnaturantes, que além de poupar a etapa de *refolding*, garante a manutenção da conformação das partículas. Da mesma maneira as bactérias transformadas com o plasmídeo pET28a HBcAg-PvCS-VK210 expressaram a VLP HBcAgPvCS-VK210.

De acordo com Almeida et al., (2014), a VLP baseada na proteína HBcAg contendo a inserção das repetições de CS-VK210, possui um peso molecular (MM) aproximado de 25KDa. Após fracionamento eletroforético dos eluatos purificados sob condições nativas em coluna de níquel, verificamos em SDS-PAGE a presença de uma proteína de aproximadamente 25 kDa, que correspondente ao tamanho esperado para proteína HBcAgPvCS-VK247 (Figura 16a) e para BcAgPvCS-VK210 (Figura 16b).

Figura 16. Purificação da VLP HBcAgPvCS-VK247 e HBcAgPvCS-VK210.

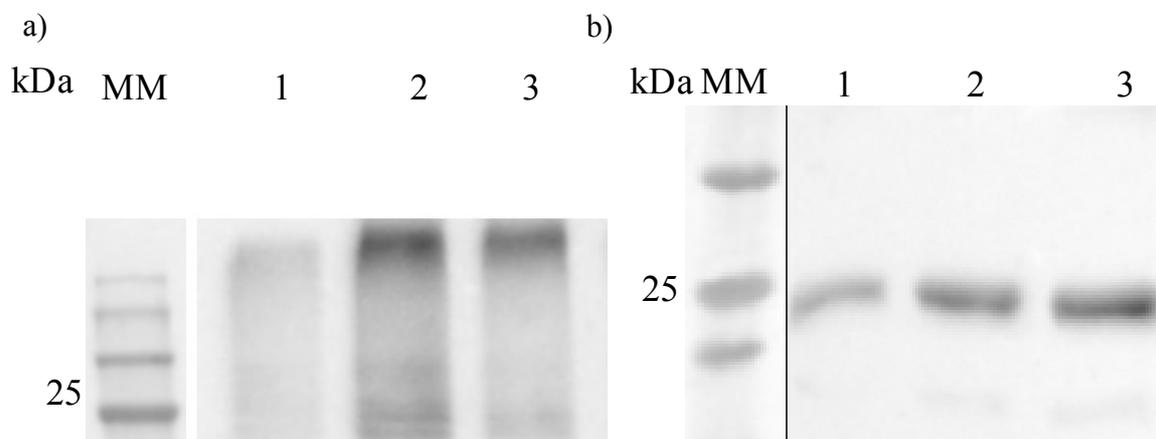


Fonte: A autora. A expressão e purificação das proteínas HBcAgPvCS-VK247 e HBcAgPvCS-VK210 foi verificada por SDS PAGE 12%, corado com azul de Comassie e revelado com solução descorante Ácido Acético (5%). **a)** corresponde a VLP HBcAgPvCS-VK247; **b)** corresponde a HBcAgPvCS-VK210; 1 2 3 4: sequência dos eluatos obtidos pela purificação em condições nativas; **kDa**: kilodalton; **MM**: Marcador molecular.

Para confirmar se as VLPs purificadas em condições não nativas, eram realmente as nossas proteínas de interesse, realizamos o ensaio de *W.B.* utilizando o anticorpo (Ac) policlonal anti-His (anti-cauda de hexa- histidina).

Dessa forma, podemos observar que os eluatos purificados demonstradas na figura 17, reagiram com o anticorpo anti-His em ambas as VLPs HBcAgPvCS-VK247 (Figura 17a), HBcAgPvCS-VK210 (Figura 17b) purificadas, com o peso molecular (MM) de aproximadamente 25KDa indicando que essas são as proteínas de interesse.

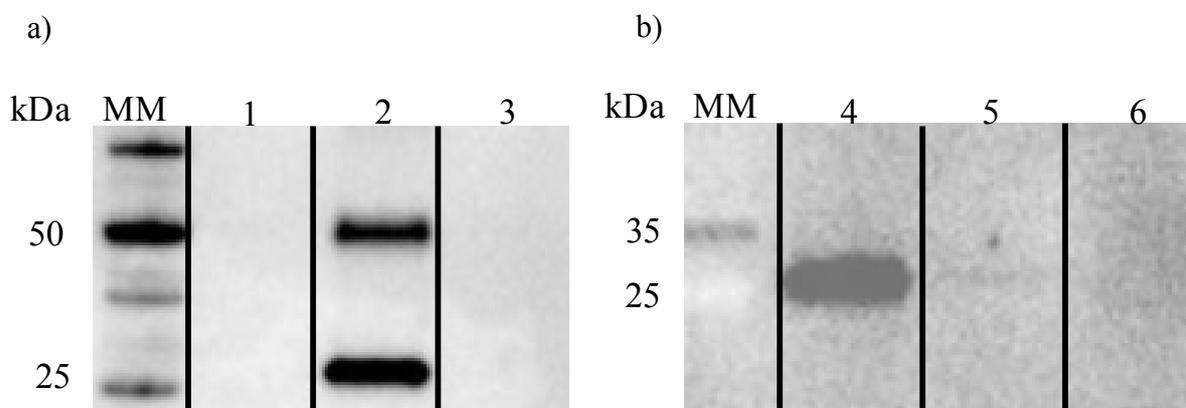
Figura 17. *Western Blotting* realizado com os eluatos das VLPs HBcAgPvCS-VK247 e HBcAgPvCS-VK210 purificada em condições nativas, detectadas com anticorpo monoclonal contra a cauda de histidina.



Fonte: A autora. W.B. das eluições obtidas após a purificação das VLPs recombinantes. Em **a)** estão as bandas correspondentes as VLPs HBcAgPvCS-VK247; **b)** estão as bandas correspondentes as VLPs HBcAgPvCS-VK210. Para a imunodeteção foi utilizado anticorpo primário anti-His (1:10000) e anticorpo secundário anti-mouse IgG (1:5000). A revelação foi realizada utilizando Kit *SuperSignal*TM. Imagens capturadas pelo fotodocumentador ChemiDocTM. **kDa**: kilodalton; **MM**: Marcador molecular; 1 2 3: eluídos obtidos da purificação em coluna de níquel.

Para determinar se as VLPs continham os epítomos dominantes da CS de *P. vivax*, realizamos o ensaio de W.B. utilizando o anticorpo monoclonal anti-CS-VK247 e anti-CS-VK210. Na figura 18, pode ser observado que o anticorpo monoclonal anti-CS-VK247 reagiu especificamente contra a VLP HBcAgPvCS-VK247 e que anticorpo monoclonal anti-CS-VK210 foi específico para a VLP HBcAgPvCS-VK210. Neste ensaio, colocamos também como controle negativo a VLP HBcAgCMV, com isso verificamos que a resposta foi dirigida contra o epítipo B antimalárico e não contra a porção da proteína originária do vírus da Hepatite B. Ambas as condições inferem que os epítomos B da CS de *P. vivax* que compõem a região imunodominante são acessíveis aos anticorpos monoclonais avaliados. Além disso, observamos a presença de uma segunda banda com peso de 50 kDa, devido à formação de dímeros (BÖTTCHER; WYNNE; CROWTHER, 1997).

Figura 18. *Western Blotting* realizado com os eluatos da proteína HBcAgPvCS-VK47 e HBcAgPvCS-VK210 purificadas em condições nativas e detectadas com anticorpo monoclonal contra as repetições da CS de *P. vivax*.

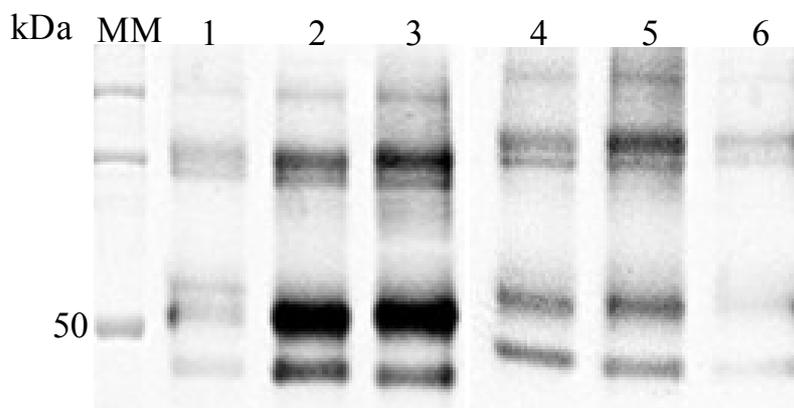


Fonte: A autora. W.B. dos eluatos obtidos após a purificação das VLPs recombinantes. Em **a)** detecção específica do epítipo repetitivo CS-VK247; **1**: HBcAgPvCS-VK210; **2**: HBcAgPvCS-VK247; **3**: HBcAgCMV. Para a imunodeteção foi utilizado anticorpo monoclonal anti-CS-VK247 (1:10000) e anticorpo secundário anti-mouse IgG (1:5000). **b)** detecção específica do epítipo repetitivo CS-VK210. **4**: HBcAgPvCS-VK210; **5**:

HBcAgPvCS-VK247; **6**: HBcAgCMV. Para a imunodeteção foi utilizado anticorpo monoclonal anti-CS-VK210 (1:10000) e anticorpo secundário anti-mouse IgG (1:5000). A revelação foi realizada utilizando Kit *SuperSignal*TM. Imagens capturadas pelo fotodocumentador ChemiDocTM. **kDa**: kilodalton; **MM**: Marcador molecular.

Além das VLPs, realizamos a expressão e purificação das proteínas inteiras correspondentes as variantes CS-VK210 e CS-VK247 da CS de *P. vivax*, para comprovar que a resposta imune que iríamos induzir após as imunizações, estava dirigida contra o parasito e não contra a proteína viral que forma a VLP. Sendo assim, demonstramos na figura 19, as proteínas inteiras correspondentes a proteína CS de *P. vivax* purificadas em condições nativas confirmadas pelo W.B. utilizando anticorpo policlonal anti-His. O anticorpo foi capaz de reconhecer a proteína de interesse, uma vez que estas apresentaram peso molecular aparente ≥ 50 KDa.

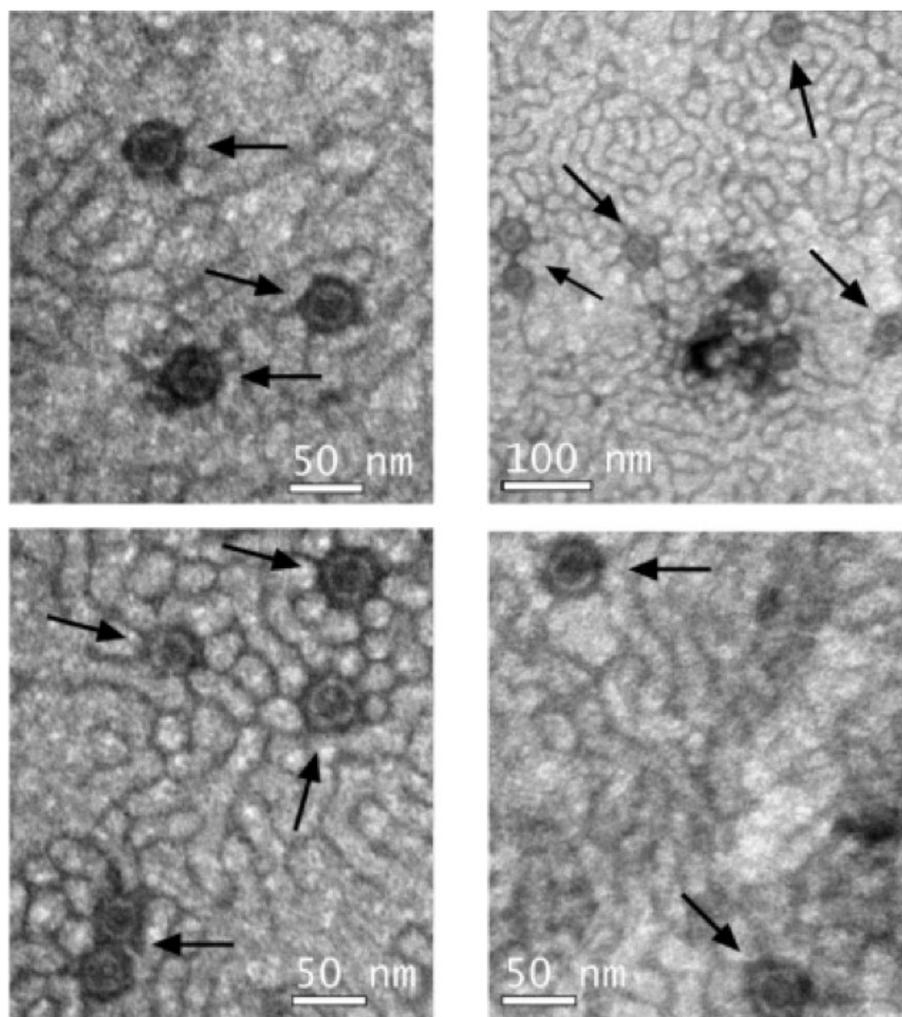
Figura 19. *Western Blotting* realizado com os eluatos da proteína inteira CS-VK247 e CS-VK210 purificada em condições nativas.



Fonte: A autora. W.B. das eluições obtidas após a purificação das proteínas inteiras recombinantes da CS de *P. vivax* **1 2 3**: corresponde aos eluidos obtidos após a purificação da proteína variante CS-VK247; **4 5 6**: corresponde aos eluatos obtidos após a purificação da proteína variante CS-VK210; Para a imunodeteção foi utilizado anticorpo primário anti-His (1:10000) e anticorpo secundário anti-mouse IgG (1:5000). A revelação foi realizada utilizando Kit *SuperSignal*TM. Imagens capturadas pelo fotodocumentador ChemiDocTM. **kDa**: kilodalton; **MM**: Marcador molecular; **1 2 3 4 5 6**: eluídos obtidos da purificação em coluna de níquel.

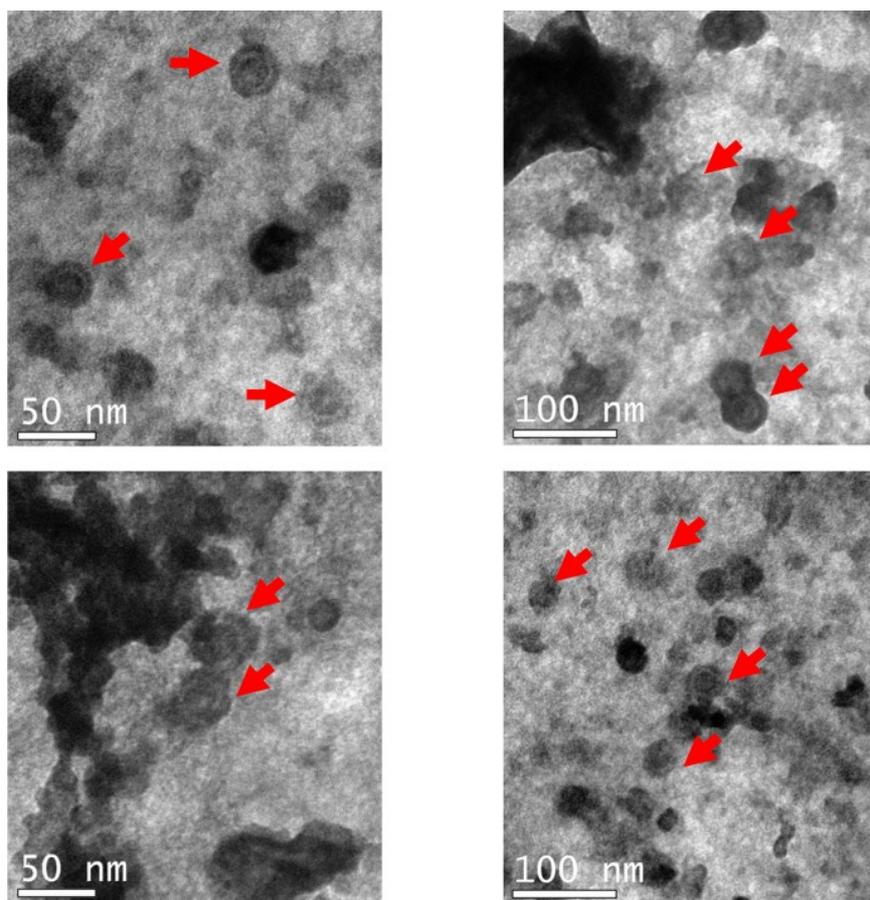
Com a finalidade de comprovarmos a formação da partícula semelhante ao vírus, procedemos à realização da microscopia eletrônica. A produção da proteína HBcAg em *E. coli* leva a expressão das VLPs com tamanhos diferentes, as pequenas com três angulações, 180 monômeros e diâmetro aproximado de 30nm e VLPs grandes com quatro angulações, 240 monômeros e cerca de 34nm (CROWTHER et al., 1994). Nas figuras 20 e 21, mostramos as partículas formadas nas bactérias pelas proteínas quiméricas recombinantes, podendo observar a similaridade estrutural com as partículas virais descritas originalmente. Como controle negativo utilizamos bactérias não transformadas (Figura 22), na qual não são encontradas partículas que mimetizam vírus.

Figura 20. Manutenção da capacidade de formação da partícula viral (VLP) pela proteína HBcAgPvCS-VK247, após sua purificação.



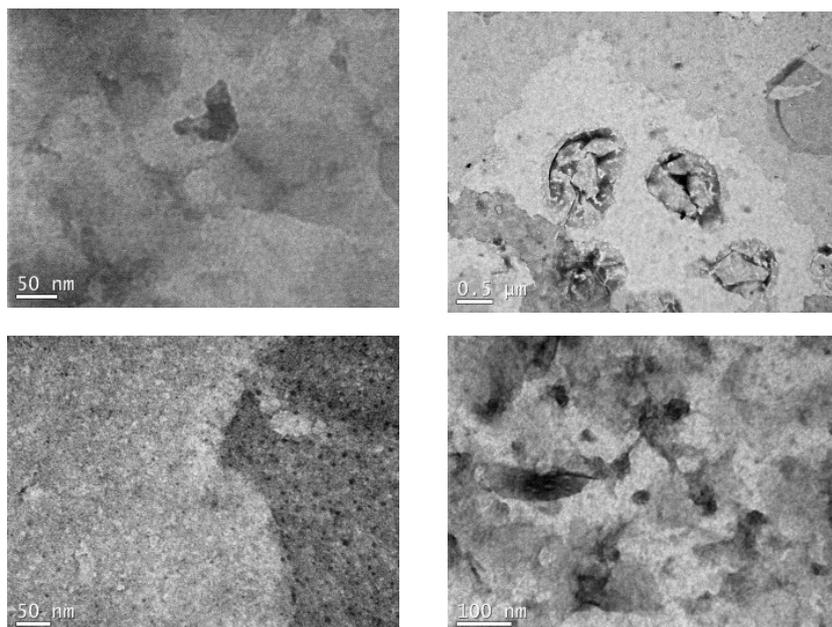
Fonte: A autora. A micrografia eletrônica mostra a VLP HBcAgCS-VK247, após a purificação e contrastação negativa. Os grids foram revestidos com 50 μ l do eluato purificado. As quatro imagens correspondem à diferentes regiões fotografadas no grid. Imagens capturadas em microscópio eletrônico de transmissão (TEM). A seta aponta as estruturas semelhantes às VLPs encontradas durante a análise.

Figura 21. Manutenção da capacidade de formação da partícula viral (VLP) pela proteína HBcAgPvCS-VK210, após sua purificação.



Fonte: A autora. A microscopia eletrônica mostra a VLP HBcPvAgCS-VK210, após a purificação e contração negativa. Os grids foram revestidos com 50 μ l do eluato purificado. As quatro imagens correspondem à diferentes regiões fotografadas no grid. Imagens capturadas em microscópio eletrônico de transmissão (TEM). A seta aponta as estruturas semelhantes às VLPs encontradas durante a análise.

Figura 22. Controle negativo da microscopia após purificação da bactéria não transformada.



Fonte: A autora. Controle negativo da microscopia eletrônica, após a purificação de lisado bacteriano sem a transformação com plasmídeo de interesse. Os grids foram revestidos com 50 μ l do eluato purificado. As quatro imagens correspondem à diferentes regiões fotografadas no grid. Imagens capturadas em microscópio eletrônico de transmissão (TEM).

5.4 Estudos imunológicos e de proteção com os candidatos vacinais produzidos.

5.4.1 Desenvolvimento de um protocolo de imunização otimizado e avaliação da resposta humoral.

Inicialmente, realizamos um primeiro experimento para avaliar a capacidade da VLP HBcAgPvCS-VK247, recém construída, em gerar anticorpos capazes de reconhecer a proteína inteira variante CS-VK247.

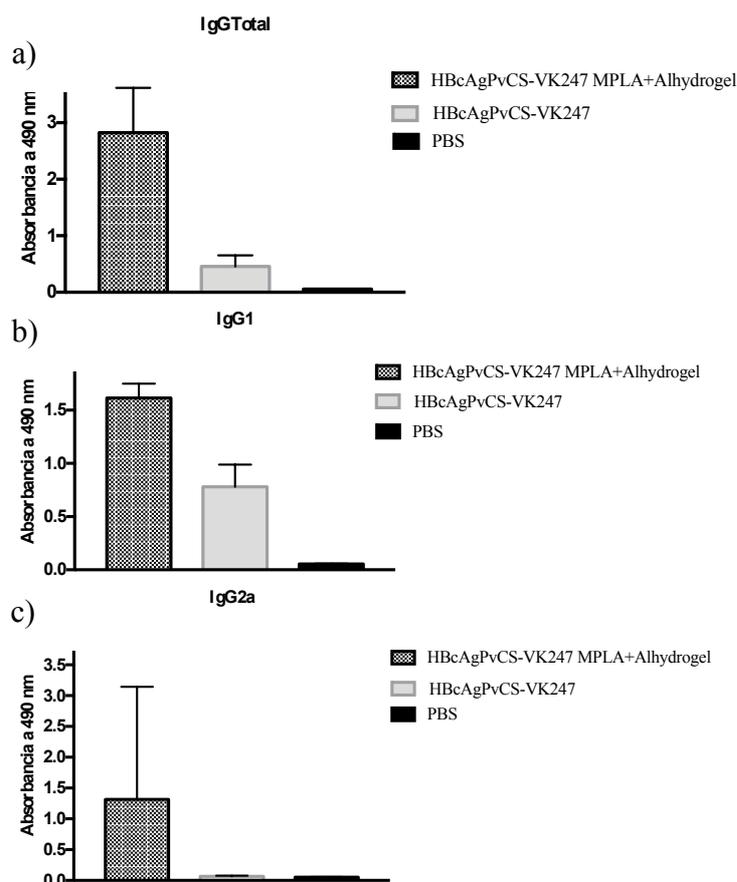
Para avaliar a magnitude da resposta imune humoral induzida pelo candidato vacinal HBcAgCS-VK247, os animais foram imunizados em protocolo dose-reforço como descrito anteriormente (seção materiais e métodos 4.5., figura 11).

Após 15 dias da dose reforço, os soros dos animais foram avaliados pelo ensaio de ELISA contra a proteína inteira da CS, correspondente a variante CS-VK247. A resposta de anticorpos induzida foi mensurada e encontra-se graficamente representada na figura 23.

A VLP HBcAgPvCS-VK247 foi capaz de reconhecer e gerar anticorpos contra a proteína inteira CS-VK247. Além da geração de IgG total (Figura 23a), observamos que as imunizações foram capazes de induzir anticorpos da subclasse IgG1 (Figura 23b) e IgG2a (Figura 23c). Devido ao pequeno número de animais imunizados, não analisamos a diferença estatísticas entre os grupos, porém podemos ver que com relação a IgG total e subclasses

IgG1 a VLP ainda quando sem a adição do adjuvante é capaz de induzir anticorpos com capacidade de reconhecer a proteína CS. Já em relação a subclasse IgG2a na ausência do adjuvante não notamos uma absorbância maior que o grupo que recebeu somente PBS. Em relação à adição dos adjuvantes, notamos que em todos os casos houve um aumento expressivo de anticorpos em relação ao grupo que recebeu somente a VLP ou PBS.

Figura 23. Imunogenicidade da VLP HBcAgPvCS-VK247.



Fonte: A autora. ELISA utilizando soros de camundongos obtidos 15 dias após a imunização com 2 doses de 10 μ g da VLP HBcAgPvCS-VK247 emulsificada ou não com as formações MPLA *B. pertussis*+Alhydrogel em três camundongos BALB/c imunizados pela via subcutânea. **a)** absorbância para anticorpo IgG total; **b)** absorbância para IgG1; **c)** absorbância para IgG2a; Os resultados estão expressos como média e desvio padrão da absorbância a 490 nm obtida para cada protocolo vacinal. Leituras foram obtidas no leitor BioTech Microplate Reader.

A partir dessa etapa do trabalho, optamos em prosseguir somente com a proteína HBcAgPvCS-VK210 devido a sua caracterização estar mais completa. No entanto, trabalhos futuros já estão sendo providenciados para que possamos realizar todas as investigações com o candidato HBcAgPvCS-VK247.

Na busca por uma formulação adequada, testamos a VLP HBcAgPvCS-VK210, quando administrada sozinha e em uma formulação contendo dois adjuvantes de ação complementar. Para isso, conduzimos os dois próximos experimentos.

Numa primeira etapa de “triagem” para verificar qual formulação seria capaz de proteger os animais frente ao desafio, realizamos as imunizações e ensaio de desafio como demonstrado na figura 12 (seção materiais e métodos 4.5).

As respostas frente às imunizações foram mensuradas e determinadas por títulos de anticorpos presente nos soros dos animais após a dose reforço. Devido às limitações éticas a respeito do número de sangrias a serem realizadas no mesmo animal, não foi possível fazer uma análise cinética para acompanhar a evolução da resposta imune por todo o período do ensaio.

Os títulos encontram-se representados na figura 24. Peptídeos sintéticos correspondendo com a região das repetições da proteína CS variante CS-VK210, foram utilizados nos ensaios eliminando o viés dos anticorpos induzidos contra a porção correspondente ao HBcAg. A VLP HBcAgPvCS-VK210 foi capaz de gerar elevados títulos de anticorpos IgG.

Nesse experimento (Figura 24a), observamos que em todos os grupos que receberam a VLP HBcAgPvCS-VK210 geraram títulos de anticorpos anti-IgG específicos contra a repetição CS-VK210, sendo estatisticamente maiores ($p < 0.0001$) em relação a todos os grupos controles (G4, G5 G6 e G7). Entre as diferentes formações vacinais, não encontramos diferenças em relação a produção de IgG total.

Com relação a subclasse IgG1, ambas as formações geraram títulos de anticorpos significativamente maiores em relação ao grupo controle. Apesar dos elevados títulos, somente a VLP sem adjuvantes não foi capaz de gerar títulos estatisticamente diferentes ao G7, mesmo assim podemos observar que a diferença foi muito maior entre ambos (Figura 24b).

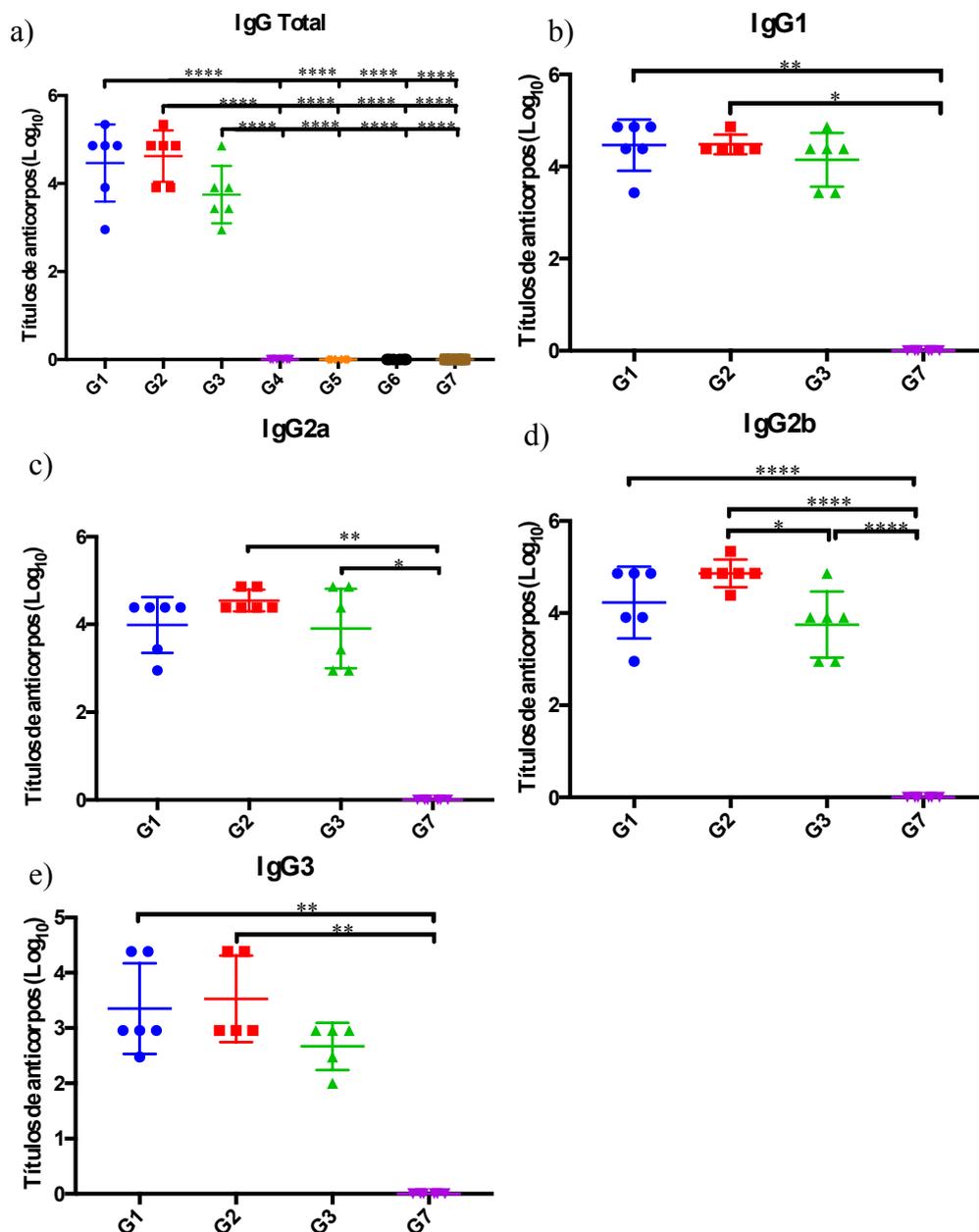
Na figura 24c temos a representação dos títulos de IgG2a, nela encontramos um maior título de anticorpo, estatisticamente significativo, nos grupos G2 e G3 em relação ao controle. Já o G1 falhou na indução de anticorpos anti-IgG2a estatisticamente maior que o G7.

Os animais imunizados pela formulação Poly I:C e AddaVax (G2) mostrou uma resposta imune humoral mais balanceada, tendo títulos estatisticamente maiores em todas as subclasses em relação aos grupos controles.

Apesar de não termos diferença estatística, a VLP sem a adição de qualquer adjuvante (G3) foi capaz de induzir anticorpos anti-IgG1 e anti-IgG 3 maiores que o grupo G7 (Figura

24b e 24e). Encontramos, ainda que no G3 houve uma menor média de títulos em relação ao G2 para a subclasse IgG2b ($p=0.0111$) (Figura 24e).

Figura 24. Imunogenicidade das formulações vacinais.



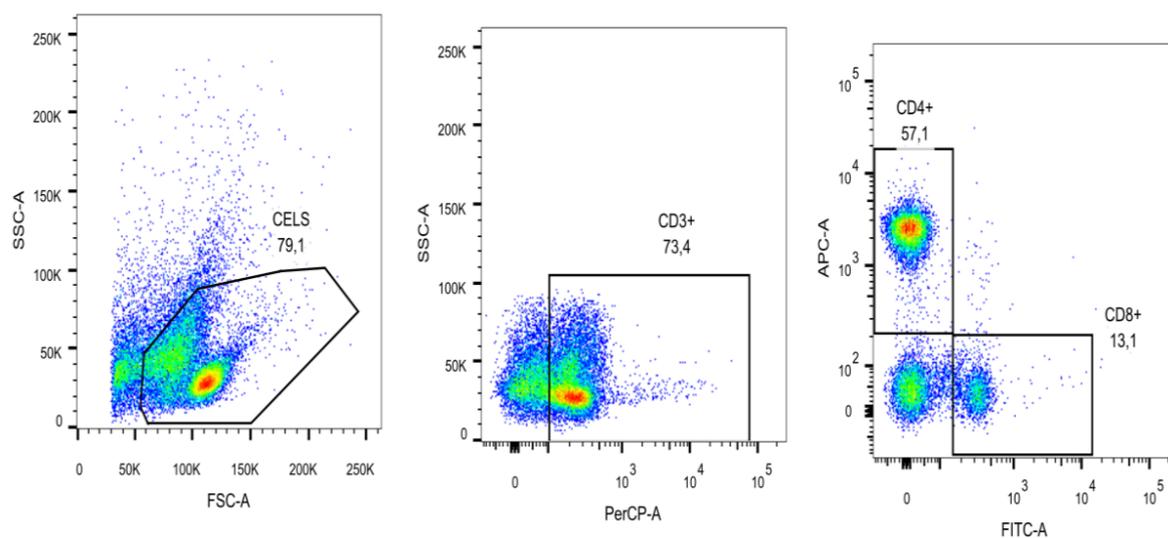
Fonte: A autora. Camundongos BALB/c foram imunizados duas vezes, pela via intramuscular, com 10 μ g das VLPs emulsificada ou não com as formulações MPLA *B. pertussis*+Alhydrogel ou Poly I:C e AddaVax com intervalo de 14 dias. **G1:** HBcAgPvCS-VK210 + MPLA *B. pertussis* +Alhydrogel; **G2:** HBcAgPvCS-VK210 + Poly I:C +Addavax; **G3:** HBcAgPvCS-VK210; **G4:** HBcAgCMV + MPLA *B. pertussis*+Alhydrogel; **G5:** HBcAgCMV + Poly I:C +Addavax; **G6:** HBcAgCMV; **G7:** PBS. Os resultados estão expressos como média aritmética dos títulos de anticorpos de cada grupo $\log_{10} \pm \text{SEM}$, e foram estatisticamente comparados utilizando o teste *One-way* ANOVA seguido de Tukey test ou Kruskal-Wallis. Diferenças estatisticamente significativa foram destacadas como: **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$ e * $p < 0.01$. Leituras foram obtidas à 405 nm no leitor BioTech Microplate Reader.

5.5 Avaliação da resposta imune celular

5.5.1 Resposta imune celular dos linfócitos frente ao estímulo da proteína CS.

A resposta imune contra malária requer a indução de elevados títulos de anticorpos, assim como a participação celular no bloqueio e eliminação da infecção. Apesar das nossas VLPs carregarem unicamente epítopos B derivados das repetições de aminoácidos existentes na proteína CS de *P. vivax* CS-VK210, o antígeno HBcAg contém epítopos próprios para linfócitos CD8⁺, que poderiam nos dar uma ideia da capacidade de estímulo de células citotóxicas pela imunização. Sendo assim, verificamos a indução de linfócitos T nos animais vacinados e nos controles. As populações celulares foram segregadas de acordo com a estratégia de *gates* apresentada na figura 25.

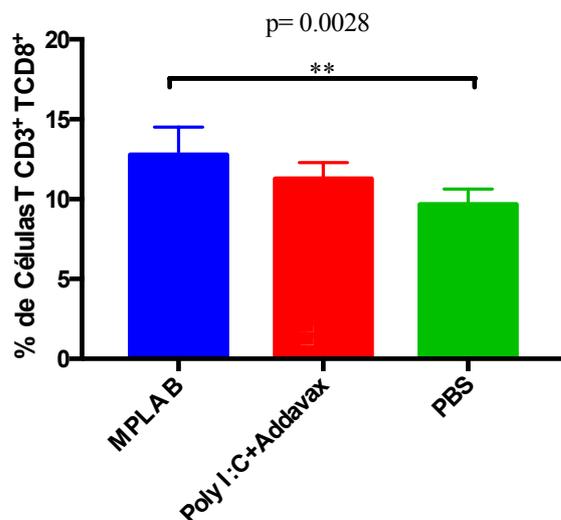
Figura 25. Estratégia de *gates* utilizada para segmentar as populações de linfócitos T CD3⁺.



Fonte: A autora. Dot plot dos esplenócitos dos camundongos imunizados com duas doses da proteína: HBcAgPvCS-VK210 coletados com 21 dias após o reforço. As células foram marcadas, plaqueadas e estimuladas individualmente. Os eventos foram adquiridos no citômetro FACSCantoIITM e analisados no *software* FlowJo. Os resultados estão expressos como porcentagem de células TCD3⁺TCD8⁺. A análise estatística foi realizada pelo teste one-Way ANOVA seguido por Tukey para múltiplas comparações. Diferença estatística está representada no gráfico P<0.005**.

A análise dos marcadores de superfície presente nos esplenócitos estimulados entre os diferentes grupos imunizados, revelou diferença estatística maior no grupo MPLA e Alhydrogel em relação ao grupo PBS na produção de células TCD8⁺ (Figura 26). Com relação a população de células TCD4⁺ e produção de IFN- γ , não encontramos diferença estatística.

Figura 26. População de células TCD8⁺ frente as formulações.



Fonte: A autora. Esplenócitos de camundongos imunizados com duas doses da proteína: HBcAgPvCS-VK210 coletados com 21 dias após o reforço. As células foram marcadas, plaqueadas e estimuladas individualmente. Os eventos foram adquiridos em citômetro FACSCantoII™ e analisados no *software* FlowJo. Os resultados estão expressos como porcentagem de células TCD3⁺TCD8⁺. A análise estatística foi realizada com o teste one-Way ANOVA seguido por Tukey para múltiplas comparações. Diferença estatística está representada no gráfico P<0.005**.

5.5.2 Produção de citocinas Th1/Th2 frente aos estímulos CS-VK210 e HBcAgPvCS-VK210.

Com o objetivo de se avaliar o perfil de resposta (se Th1 ou Th2) gerado pela imunização de camundongos BALB/c com os diferentes protocolos de vacinação, foi feita a dosagem de algumas citocinas características destes perfis. Para isso, utilizamos o Kit de citometria de fluxo para esta determinação- CBA Th1/Th2 com *beads* específicas. Empregamos esta técnica para avaliar a capacidade das células esplênicas em secretar citocinas induzidas pelo estímulo frente a proteína CS-VK210 e a VLP HBcAgPvCS-VK210 após 120 horas, para elucidar o perfil da resposta imune induzida pelo nosso candidato vacinal (Figura 27). Todos os grupos imunizados, à exceção do controle PBS, foram capazes de induzir células antígeno específicas secretoras de TNF e IL2 frente ao estímulo com a proteína CS-VK210 (Figura 27a e 27c).

A resposta de TNF foi maior em relação às demais citocinas em ambas as formulações vacinais. A análise estatística para a produção de TNF e IL2 revelou que o G1 estimulado com a proteína CS-VK210, foi significativamente maior em relação ao G3 (p= 0.0205 e p= 0.0092).

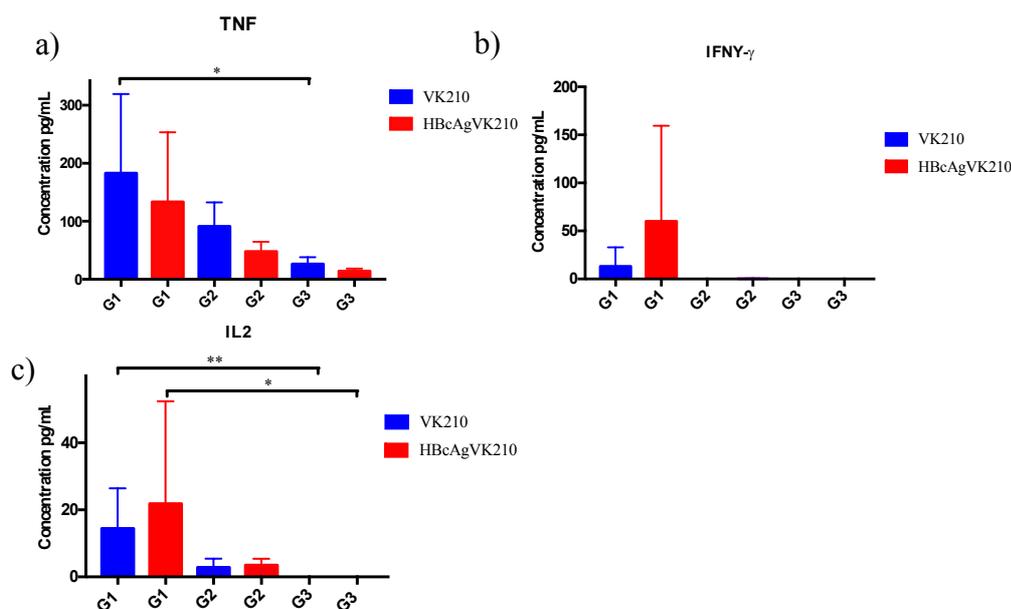
Na estimulação *ex vivo* das células esplênicas dos animais que receberam a formulação contendo MPLA de *B. pertussis* e Alhydrogel identificamos a presença das citocinas TNF, IFN- γ , IL2 e IL5 em resposta a proteína CS-VK210 (Figuras 27a, b, c e d). Porém para o grupo imunizado com Poly I:C e AddaVax, não foi possível a detecção de IFN- γ .

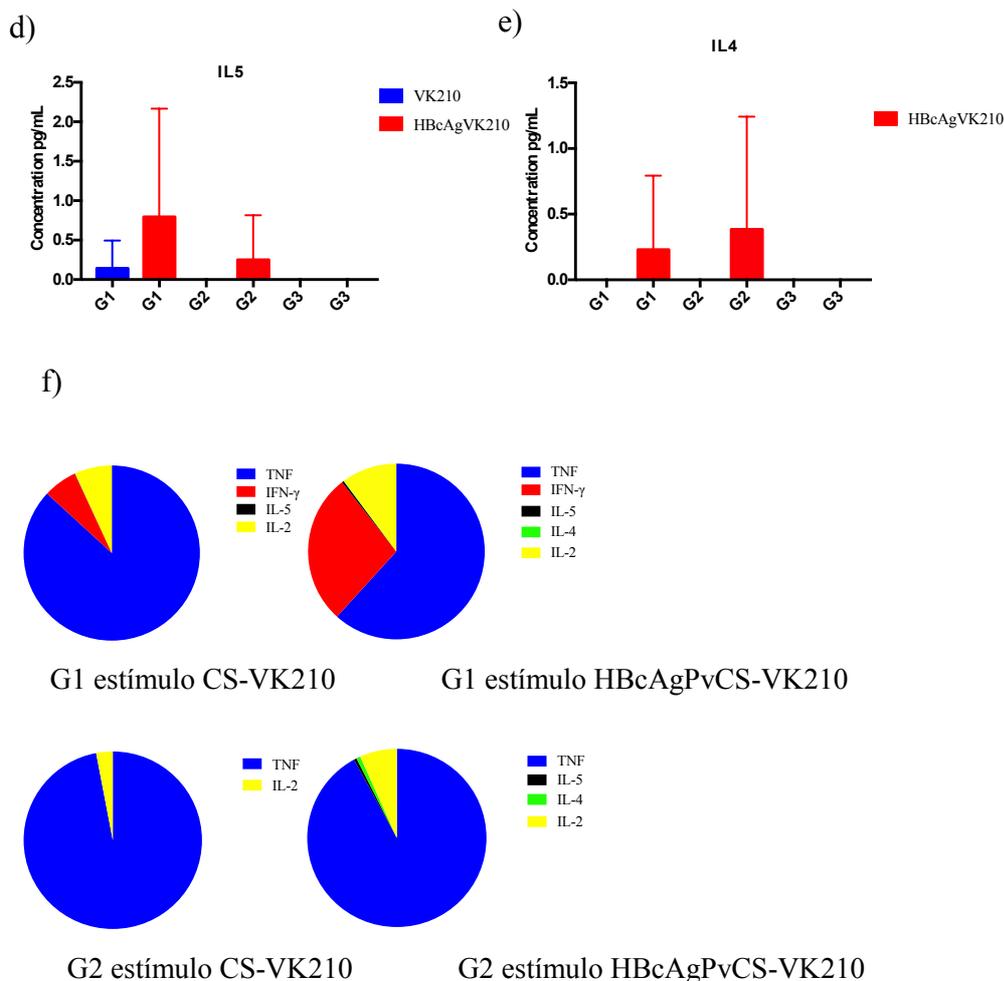
A figura 27d, representa a secreção da citocina IL5. Mesmo que em níveis baixos, a IL5 foi estimulada no grupo com MPLA de *B. pertussis* e Alhydrogel, no entanto somente com o estímulo da VLP é que encontramos a secreção desta citocina nos animais imunizados com Poly I:C e AddaVax.

Com relação a citocina IL4 (Figura 27e), não conseguimos estimular as células de forma eficiente com a proteína CS-VK210. Níveis detectáveis da citocina IL4, somente foi possível com a estimulação utilizando a VLP HBcAgPvCS-VK210. Assim, como podemos observar na figura 32e, ambas as formulações induziram IL4 frente ao estímulo com a VLP.

Com relação a porcentagem de citocinas encontrada em cada formulação, podemos dizer que os animais imunizados com a formulação Poly I:C e AddaVax tiveram uma resposta predominante de TNF e IL2 em resposta a proteína CS-VK210 (Figura 27e), enquanto que o grupo que recebeu MPLA e Alhydrogel, teve uma predominância das citocinas TNF e IL2.

Figura 27. Secreção de citocinas associadas aos estímulos CS-VK210 e HBcAgPvCS-VK210.





Fonte: A autora. Os esplenócitos foram coletados individualmente dos animais imunizados com as diferentes formulações. **G1**: HBcAgPvCS-VK210 + MPLA *B. pertussis* + Alhydrogel; **G2**: HBcAgPvCS-VK210 + Poly I:C + Addavax; **G3**: PBS. As células foram estimuladas durante 120 horas, com a proteína recombinante CS-VK210 de *P. vivax* (10ug) e ou com a VLP HBcAgPvCS-VK210 (10ug). O sobrenadante foi coletado e imediatamente utilizado para a realização da análise das citocinas TNF, IFN- γ , IL-5, IL-4 e IL-2 pelo método de CBA. Os eventos foram adquiridos em citômetro FACSCantoII™, seguido da análise no software FCAP Array™, tendo os resultados expressos em pg/mL (a-d) em porcentagem (f).

5.6 Ensaios de desafio

Para a avaliar se nossas formulações seriam capazes de gerar proteção, realizamos o ensaio de desafio. Portanto, dois camundongos BALB/c foram utilizados para a inoculação com os esporozoítos transgênicos. Após cerca de 5 dias, a presença dos gametócitos foi confirmada nos animais inoculados, pela visualização dos eritrócitos infectados, em lâminas com esfregaço sanguíneo. A partir da confirmação, foi realizada a alimentação dos mosquitos com sangue desses animais positivos (Figura 28).

Figura 28. Alimentação dos mosquitos no camundongo infectado com parasitas transgênicos.



Fonte: A autora. Animal BALB/c previamente infectado com os parasitas transgênicos *P. berghei* [CS vivax], sendo utilizado para alimentar e infectar os mosquitos *A. stephensi*.

No dia 14 após o reforço vacinal, os mosquitos foram dissecados tendo a glândula salivar removida para obtenção dos esporozoítos (Figura 29).

Figura 29. Obtenção dos esporozoítos para ensaio do desafio.



Fonte: A autora. a) *A. stephensi* sendo dissecado para remoção das glândulas salivares. b) Glândula salivar removida para posterior obtenção dos esporozoítos.

Após a remoção das glândulas salivares, os esporozoítos foram contados em câmara de hemocítmetro e diluídos na concentração de 10^4 esporozoítos/mL (Figura 30). Cada animal recebeu 100 μ L injetados pela via intravenosa na região caudal (Figura 31).

Figura 30. Esporozoítos extraídos das glândulas salivares.



Fonte: A autora. Câmara de hemocítômetro para contagem de esporozoítos transgênicos. O círculo vermelho delimita a presença de dois parasitas transgênicos *P. berghei* [*CS vivax*].

Figura 31. Inoculação i.v. dos animais para o ensaio de desafio.

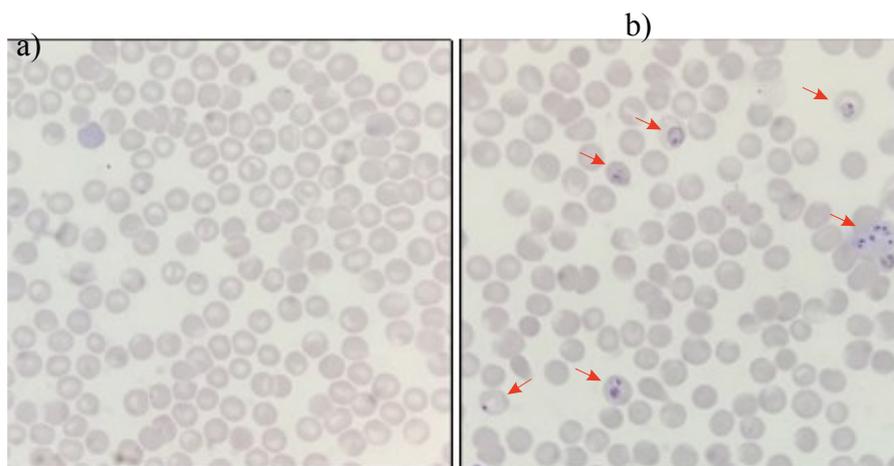


Fonte: A autora. Camundongo BALB/c em contenção para a realização das inoculações i.v. na cauda. Cada animal recebeu um volume final de 100 μ L contendo 10000 esporozoítos *P. berghei* [*CS vivax*].

Após o 5^o dia da realização do desafio, todos os animais tiveram sangue coletado diariamente para a avaliação da progressão da parasitemia (Figura 32). Na figura 32a não

observamos a presença dos parasitos infectando as células sanguíneas, sendo, portanto, este animal protegido pela imunização realizada com nosso candidato vacinal. Já na figura 32b, as células infectadas indicadas pelas setas, demonstram que os animais do grupo controle não foram protegidos frente ao desafio com os parasitos transgênicos.

Figura 32. Esfregaço sanguíneo dos animais submetidos ao ensaio de desafio.

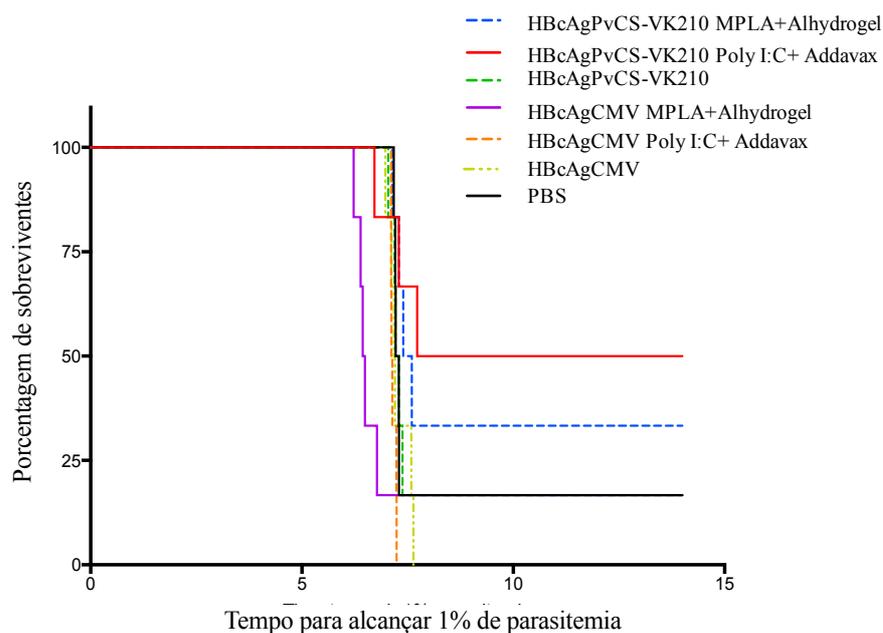


Fonte: A autora. **a)** Esfregaço sanguíneo corado em GIEMSA, de um animal do grupo imunizado (HBcAgPvCS-VK210 Poly I:C+AddaVax) e protegido. **b)** Esfregaço sanguíneo de um animal do grupo controle (PBS), não protegido frente ao desafio.

Para comprovarmos a eficácia protetora das formulações vacinais, procedemos os ensaios de desafio utilizando o modelo murino. A figura 33 mostra os resultados das curvas de sobrevivência dos animais imunizados com as diferentes formulações vacinais e posteriormente desafiados (14 dias) com parasitas vivos transgênicos *P. berghei* [*CS vivax*].

A formulação vacinal contendo os adjuvantes Poly I:C e AddaVax foi a responsável pela maior proteção conferida aos animais (+/- 50% - Tabela 1), em seguida o grupo imunizado com MPLA de *B. pertussis* e Alhydrogel (+/- 30%- Tabela 1). Já a VLP sozinha, sem a adição de qualquer substância adjuvante, não foi capaz de proteger os animais. Comprovamos ainda, a ausência de proteção inespecífica com os animais imunizados com uma VLP equivalente, apresentando epítomos do CMV e não da CS e após serem desafiados com *P. berghei* [*CS vivax*]. Estes resultados demonstram que nosso candidato induz uma resposta imune específica contra as repetições centrais da CS, capaz de conter a infecção pelo parasito.

Figura 33. Curva de mortalidade das formulações frente ao desafio com esporozoítos transgênicos.



Fonte: A autora. Animais desafiados com de *P. berghei* [*CS vivax*] expressando a proteína CS-VK210 imunizados com as duas formulações vacinais foram observados até o 15º dia após a infecção. O gráfico mostra a porcentagem de sobrevivência.

Tabela 1. Porcentagem dos camundongos protegidos contra a infecção induzida por *P. berghei* [*CS vivax*].

Antígeno	Adjuvantes	Grupo	Média Sobrevivência (dias)	Nº de animais protegidos/total imunizados (%)	P<0.05*
HBcAgPvCS-VK210	MPLA B. pertussis+Alhydrogel	G1	7.5	2/6 (33%)	0.1422
HBcAgPvCS-VK210	Poly I:C+AddaVax	G2	10.9	3/6 (50%)	0.0366*
HBcAgPvCS-VK210	-	G3	7.3	1/6 (16%)	0.5820
HBcAgCMV	MPLA B. pertussis+Alhydrogel	G4	6.5	1/6 (16%)	0.3250
HBcAgCMV	Poly I:C+AddaVax	G5	7.1	0/6 (0%)	0.2907
HBcAgCMV	-	G6	7.2	0/6 (0%)	
PBS	-	G7	7.3	1/6 (16%)	0.4801

Fonte: A autora. A análise estatística foi realizada utilizando a curva de sobrevivência Kaplan-Meier survival e o valor de p foi calculado usando o teste Kaplan-Meier Log-rank (Mantel-Cox). $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo ($*P < 0.05$, $**P \leq 0.001$, e $***P < 0.0001$).

Ao analisar o valor de p na comparação entre os que receberam a VLP HBcAgPvCS-VK210 e o grupo dos animais que receberam PBS como controle negativo, não obtivemos nenhuma diferença estatisticamente significativa (Tabela 1), podendo ser explicado pela falha da infecção de um animal do grupo G7 (controle não imunizado) após a inoculação dos parasitas.

Sendo assim, optamos por comparar os grupos imunizados com HBcAgPvCS- VK210 com o controle negativo da VLP grupo G6 (HBcAgCMV). Dessa forma, temos o controle negativo da resposta protetora frente a imunização, como também, o controle da resposta induzida pela porção do HBcAg.

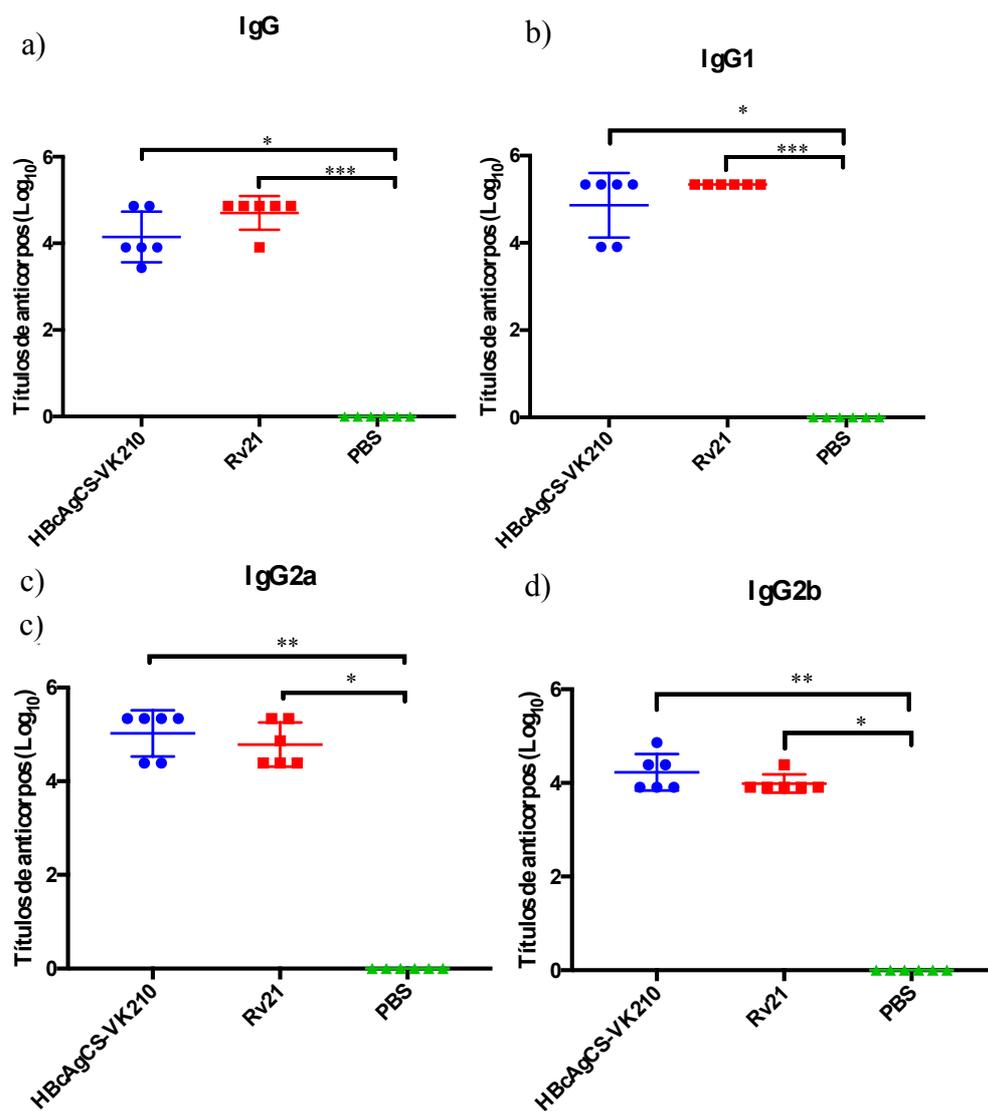
A análise mostrou que entre os grupos G1 e G2, a maior proteção alcançada foi com a formulação Poly I:C ($p=0.0366$), enquanto que a diferença observada entre os grupos G1 (vacinados com MPLA/Alhydrogel) e G5 (controle negativo experimental) não atingiram significância estatística (proteção de 33% versus 0%, $p=0,1422$), com muita probabilidade pelo tamanho pequeno dos grupos experimentais. Baseados nesses resultados, foi escolhida a formulação Poly I:C e AddaVax (Formulação 2) para o segundo experimento.

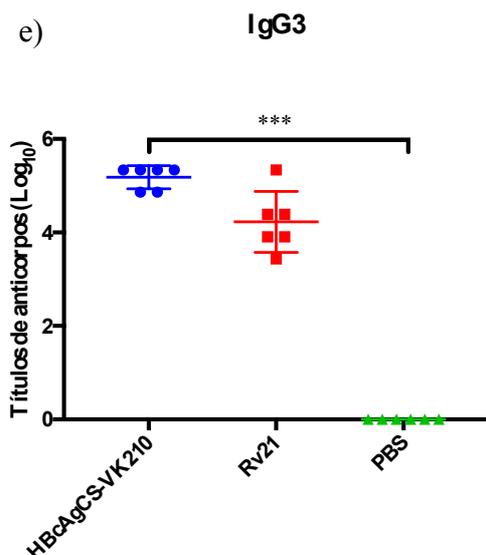
Tendo observado que o nosso candidato vacinal induzia uma imunogenicidade intensa sendo capaz de gerar proteção frente ao ensaio de desafio, selecionamos a melhor formulação obtida pelo resultado do desafio no experimento de triagem e confirmamos a proteção alcançada anteriormente, utilizando como um controle positivo a vacina Rv21, que tinha produzido em trabalhos anteriores, alta proteção frente ao desafio. Como controle negativo, utilizamos animais imunizados somente com PBS, uma vez que no experimento anterior demonstramos que a porção do HBcAg não confere proteção cruzada.

Para isso realizamos o segundo experimento com a VLP HBcAgCS-VK210 com a formulação Poly I:C e AddaVax.

Ao reavaliar a resposta de anticorpos induzida pela formulação contendo Poly I:C e AddaVax, confirmamos a indução de elevados títulos de anticorpos e estatisticamente maiores que os animais controles, imunizados somente com PBS. Na comparação entre nosso candidato vacinal e o candidato Rv21, padrão ouro nesse experimento, a VLP HBcAgPvCS-VK210 manteve a capacidade de induzir uma resposta humoral balanceada, não havendo diferença estatística entre os títulos gerados nas diferentes subclasses (Figura 34).

Figura 34. A formulação HBcAgPvCS-VK210 Poly I:C AddaVax gera altos títulos de anticorpos sendo imunogenicamente similar ao candidato vacinal Rv21.

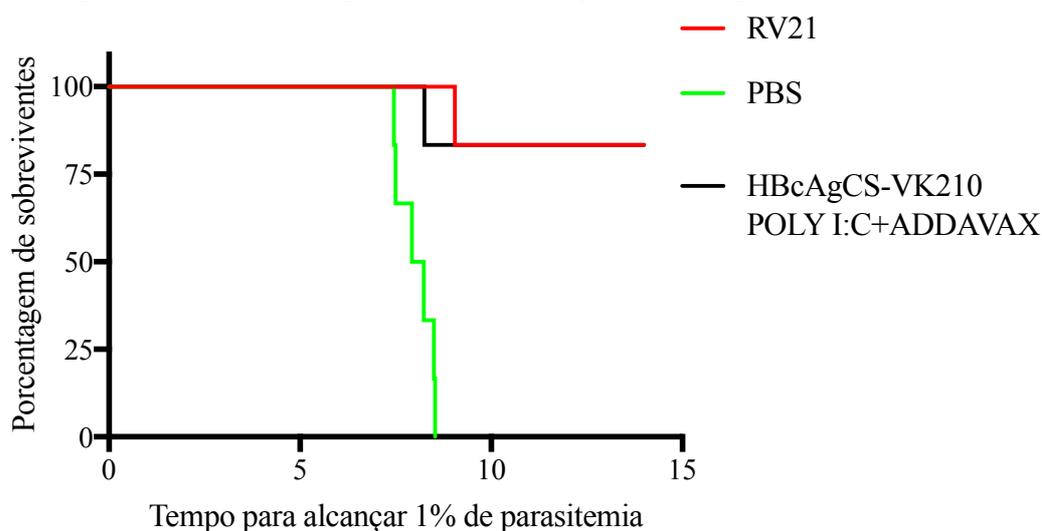




Fonte: A autora. Camundongos BALB/c foram imunizados duas vezes, pela via intramuscular, com 10 μ g da VLP HBcAgPvCS-VK210 ou Rv21 emulsificada com a formulação Poly I:C e AddaVax com intervalo de 14 dias. Os resultados estão expressos como média aritmética dos títulos de anticorpos de cada grupo $\log_{10} \pm \text{SEM}$, e foram estatisticamente comparados utilizando o teste *One-way* ANOVA seguido de Tukey test ou Kruskal-Wallis. Diferenças estatisticamente significativa foram destacadas como: *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$ e * $p < 0.01$. Leituras foram obtidas à 405 nm no leitor BioTech Microplate Reader

Ao realizarmos novamente o ensaio de desafio, demonstramos a eficácia da formulação HBcAgPvCS-VK210 Poly I:C/AddaVax em proteger 83% dos animais desafiados, sendo muito similar ao controle positivo (Rv21) (Figura 35 e tabela 2).

Figura 35. Eficácia da formulação HBcAgPvCS-VK210 PolyI:C/AddaVax frente ao desafio com esporozoítos de *P. berghei* [*CS vivax*] expressando a proteína CS-VK210.



Fonte: A autora. Animais desafiados com de *P. berghei* [*CS vivax*] expressando a proteína CS-VK210 imunizados com HBcAgPvCS-VK210 na formulação Poly I:C e AddaVax, foram observados até o 15º dia após a infecção. O gráfico mostra a porcentagem de sobrevivência.

Os resultados obtidos no segundo experimento comprovam que nosso candidato vacinal aliado aos adjuvantes Poly I:C e AddaVax possui uma altíssima capacidade de proteção frente ao desafio, sendo comparável ao candidato Rv21 desenvolvido recentemente na Universidade de Oxford (Tabela 2).

Tabela 2. Confirmação da porcentagem de proteção conferida pela formulação HBcAgPvCS-VK210-PolyI:C/AddaVax.

Antígeno	Adjuvantes	Média Sobrevivência (dias)	Nº de animais protegidos/total imunizados (%)	P<0.05
HBcAgPvCS-VK210	Poly I:C+AddaVax	13	5/6 (83%)	0.0031*
Rv21	Poly I:C+AddaVax	13.2	5/6 (83%)	0.0005***
PBS	-	8.0	0/6 (0%)	

Fonte: A autora. A análise estatística foi realizada utilizando a curva de sobrevivência Kaplan-Meier survival e o valor de p foi calculado usando o teste Kaplan-Meier Log-rank (Mantel-Cox). $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo em relação ao grupo PBS (* $P < 0.05$, ** $P \leq 0.001$, e *** $P < 0.0001$).

O G1 foi estatisticamente diferente ao grupo G3, no entanto apresentou um $p = 0.9486$ na comparação com o candidato Rv21, sendo considerado, um promissor candidato no combate a malária humana.

6. Discussão

As vacinas deram uma contribuição fundamental ao prolongamento da expectativa e qualidade de vida (RAPPUOLI; SANTONI; MANTOVANI, 2018). No entanto, apesar dos inúmeros esforços realizados para o desenvolvimento de uma vacina contra malária, esta doença permanece ainda como um desafio à saúde pública global. O controle mundial da doença ainda não foi atingido, levando ao óbito milhares de pessoas anualmente (WHO, 2018). Sendo assim, se faz necessário o desenvolvimento de uma vacina protetora, segura e econômica, com fácil produção e administração. A nova geração de vacinas baseadas em antígenos recombinantes pode cobrir muitas dessas características para a vacina contra a malária. No entanto, um dos desafios é a baixa imunogenicidade dos antígenos recombinantes, que devem ser considerados para o desenvolvimento de novos candidatos vacinais (DRAPER et al., 2015).

No presente estudo, selecionamos o antígeno HBcAg como carreador de epítomos heterólogos, embasados por estudos que demonstram a elevada imunogenicidade desse antígeno tanto na infecção natural pelo HBV como quando administrado na forma de proteínas recombinantes. Nem o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B, que está presente na vacina comercial contra *P. falciparum* é tão imunogênico quanto o HBcAg (HOOFNAGLE; GERETY; BARKER, 1973; MILICH et al., 1987). Por meio da fusão genética, o HBcAg pode receber inserções de antígenos heterólogos nas regiões N-, C-terminal, assim como na região do *loop*. Além disso, o HBcAg tem a vantagem de poder ser produzido utilizando diferentes sistemas de expressão, procariotos ou eucariotos, sendo ainda passível de ser utilizado em sistemas muito simples como com a bactéria *E. coli*, o que não

ocorre com o antígeno HBsAg, que necessita de modificações pós-traducionais, elevando o seu custo de produção.

Diversas VLPs baseadas no HBcAg foram geradas pelo nosso grupo de pesquisa durante os últimos anos, na tentativa de usar esta plataforma para a geração de múltiplos candidatos vacinais contra Paracoccidiodomicose (HOLANDA et al., 2017) e *P. vivax* (ALMEIDA et al., 2014). Neste trabalho construímos uma VLP com repetições da proteína CSP de *P. vivax* (CS-VK247, nanopetídeo ANGAGNQPG) diferente daquela obtida anteriormente (variante CS-VK210 nanopetídeo AGDRADGQP). Em paralelo realizamos um estudo avançado sobre as tecnologias otimizadas de vacinação e sobre a proteção induzida *in vivo* contra parasitas transgênicos *P. berghei* [*CS vivax*] usando a VLP HBcAgCS-VK210, que tinha sido só em parte caracterizada até o momento.

As vacinas baseadas nas variantes CS-VK210 e CS-VK247 da proteína CS de *P. vivax* poderão conferir proteção contra as principais isoformas de CS, sendo imunologicamente ideal para a eliminação da maioria dos parasitas *P. vivax* circulantes no mundo (YADAVA et al., 2007). A variante CS-VK210 tem a maior distribuição global, sendo encontrada em países como Brasil, Índia, Tailândia e Peru (COCHRANE et al., 1990; FRANKE et al., 1992; MACHADO; PÓVOA, 2000; WIRTZ et al., 1990). No Brasil, estudos sorológicos e moleculares mostram a prevalência dos três genótipos especialmente na região Amazônica (MACHADO; PÓVOA, 2000). A distribuição de cada variante é diferentemente encontrada em cada região endêmica, no entanto a variante CS-VK210 se mantém como a mais prevalente (STORTI-MELO et al., 2009).

No presente trabalho, geramos duas formulações vacinais com diferentes adjuvantes na tentativa de induzir um perfil imune balanceado entre as respostas Th1/Th2. As VLPs construídas pelo nosso grupo foram desenvolvidas para a proteção contra as principais formas circulantes, porém ainda necessitaríamos de uma terceira VLP contendo a variante *Vivax-like* para então produzirmos uma vacina universal contra *P. vivax*.

Segundo Geldmacher et al., (2004), partículas do cerne da Hepatite B toleram a inserção de polipeptídeos de até 120 aminoácidos na região imunodominante da proteína para formação das partículas quiméricas. A análise *in silico* da inserção das 4 cópias da sequência ANGAGNQPG na estrutura do HBcAg não alterou a conformação estrutural da proteína recombinante, demonstrando que nossa construção manteve a estrutura dos monômeros do HBcAg, sendo muito semelhante as partículas descrita por Bottcher, B. Wynne, S.A. Crowther, (1997). O uso de soluções não redutoras, durante a etapa de purificação para

obtenção das VLPs pode ter melhorado o rendimento dos eluatos, visto que o uso de ureia ou guanidina por exemplo, pode competir com as histidinas inseridas na construção e ligar-se à fase estacionária da coluna acarretando na perda de material. Além disso é muito importante que aconteça a correta formação estrutural da partícula, pois a imunogenicidade das VLPs é fortemente dependente da capacidade de manter a conformação estrutural, como demonstrado em um estudo conduzido por Lechmann et al., (2001), no qual a vacinação com partículas do cerne do vírus da Hepatite C desnaturadas pelo calor resultou em respostas reduzidas de anticorpos e células T específicas para o antígeno.

A análise *in silico* apesar de apresentar uma boa previsão da formação dos capsídeos da VLP não pode ser considerada como confirmatória. O servidor o *Swiss-model* realiza a modelagem por homologia, com base em um banco de dados de proteínas, não existindo uma validação da qualidade do modelo. No entanto, a realização da microscopia eletrônica pode ser usada como uma das técnicas disponíveis em nossa universidade, que permite avaliar se a estrutura conformacional do nosso candidato se manteve como aquela descrita originalmente. Nossas imagens de microscopia demonstram partículas morfologicamente muito similares às partículas encontradas por Crowther et al., (1994), confirmando que a purificação não alterou a capacidade de automontagem. Além da microscopia eletrônica, poderíamos ainda ter aplicado a técnica de imuno-eletromicroscopia usando ouro coloidal conjugado com os anticorpos, que tem sido amplamente utilizada na pesquisa e caracterização das VLPs, necessária não só para a visualização da formação da partícula, como também da localização de antígenos na superfície da VLP (ZELTINS, 2013). Em nosso trabalho, optamos pela comprovação biofísica das VLPs, pela microscopia eletrônica e aliada a essa técnica utilizamos uma técnica imuno-biológica com a utilização dos anticorpos monoclonais anti-CS-VK247 e anti-CS-VK210, pelo ensaio de W.B. O reconhecimento de ambas as VLPs (HBcAgPvCS-VK247 e HBcAgPvCS-VK210) pelos anticorpos específicos contra a proteína CS, confirma que os epítomos B por nós inseridos, encontram-se corretamente expostos na superfície do antígeno HBcAg.

Após a confirmação da geração das VLPs, iniciamos os ensaios de imunização dos animais e a avaliação da resposta imune induzida pelas formulações administradas em animais da linhagem BALB/c. Para isso selecionamos uma primeira formulação de adjuvantes, levando em consideração o fato de termos pelo menos uma formulação baseada em substâncias cujo uso em humanos fosse permitido e ainda que cada adjuvante fosse de diferentes classes, com perfil imunológico complementar.

Primeiramente, realizamos as imunizações com o candidato HBcAgCS-VK247 emulsionado ou não com adjuvantes. Até o momento somente cinco adjuvantes são licenciados para uso em humanos, os sais de alumínio, o MF59, os virossomas, o AS03 e o AS04 (LEE; NGUYEN, 2015). Nossa primeira formulação foi a emulsão da VLP HBcAgCS-VK247 com os adjuvantes MPLA de *B. pertussis* e Alhydrogel.

A escolha pela combinação dos adjuvantes MPLA e Alhydrogel, foi baseada na formulação AS04 a qual é aprovada para uso em humanos. O adjuvante AS04 encontra-se presente nas vacinas contra HPV e demonstram que a atividade adjuvante é mediada pela resposta de anticorpos aumentada aos antígenos do HPV, sendo estritamente dependente do AS04. A adição de MPLA ao sal de alumínio aumenta a resposta humoral celular, desencadeando rapidamente uma resposta de citocinas local e transitória que leva a uma ativação aumentada de células apresentadoras de antígenos e resulta em uma melhor apresentação do antígeno às células T CD4⁺ consequentemente a uma maior produção de anticorpos (GARON et al., 2011).

O uso do MPLA de *B. pertussis* é inédito e, caso adequado daria uma utilidade importante a um dos principais subprodutos da fabricação da vacina contra a coqueluche.

O primeiro estudo da eficácia humana para uma vacina baseada na proteína CS de *P. vivax* foi executado em 2010. Tal como no primeiro estudo de eficácia com a vacina RTS,S, o Vivax Malaria Protein 001 (VMP001) foi testada com adjuvante AS01, que resultou em alta imunogenicidade. Além disso, a vacina atrasou as manifestações da infecção em 59% dos vacinados, no entanto a vacina não induziu proteção estéril (BENNETT et al., 2016).

Em nosso estudo, a imunização dos animais foi feita com duas doses da VLP HBcAgPvCS-VK247 com ou sem a formulação de MPLA+Alhydrogel. Para avaliar o potencial imunogênico desse novo candidato, realizamos os ensaios de ELISA. Nossos resultados demonstraram que as imunizações com o candidato HBcAgCSVK-247 geraram anticorpos capazes de reconhecer a proteína inteira variante CS-VK247. Mesmo na ausência dos adjuvantes, essa VLP induziu anticorpos IgG e IgG1 anti-CS, porém se aliada à formulação MPLA e Alhydrogel, induz anticorpos da subclasse IgG2a anti-CS.

Apesar de termos demonstrado que a VLP HBcAgCS-VK247 é capaz de induzir resposta imune com a produção de anticorpos reconhecedores da proteína CS, nós decidimos dar continuidade ao trabalho utilizando a VLP HBcAgCS-VK210 que se encontrava melhor caracterizada por experimentos prévios realizados pelo nosso grupo. Comparamos a formulação MPLA e Alhydrogel, com uma segunda formulação composta pelos adjuvantes Poly I:C e AddaVax. O agonista de TLR-3, Poly I:C, é composto por uma dupla fita de RNA

sintético. Este adjuvante foi escolhido, pois foi relatado ser um adjuvante efetivo na indução de anticorpos e células TCD4⁺ em resposta a *P. falciparum*, em primatas não humanos (TEWARI et al., 2010). O adjuvante de Freund tem sido amplamente utilizado na geração de altos títulos de anticorpos contra proteínas de interesse. No entanto, sua utilização em teste de antígenos potenciais candidatos vacinais em modelos animais é questionável. Questões éticas relativas às reações adversas associadas ao seu uso, nos persuadiram a considerar alternativas. Portanto, selecionamos o AddaVax™, análogo ao adjuvante humano licenciado MF59 e que está em fase de ensaios pré-clínicos.

Na avaliação da produção de anticorpos com o candidato HBcAgCS-VK210, anti-CS-VK210, nossos resultados demonstram a eficiente capacidade de indução da imunoglobulina IgG, assim como das subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Uma maior média de títulos de anticorpos foi alcançada pela formulação com os adjuvantes Poly I:C e AddaVax, seguida pela formulação com MLPA e Alhydrogel, e por último a VLP sem adição dos adjuvantes. Apesar da análise estatística não revelar diferenças, a VLP sem adição de adjuvantes induziu anticorpos IgG1 e IgG 3 anti-CS-VK210 maiores em relação ao grupo não vacinado. Talvez a menor média de títulos obtidas para os anticorpos da subclasse IgG 1 e IgG3 pode explicar a falta de proteção nos animais imunizados sem adjuvantes. Muito embora os mecanismos de proteção contra malária não estejam totalmente elucidados, estudos sobre o padrão de anticorpos IgG1 e IgG3 contra CS de *P. falciparum* encontrados em adultos e crianças de áreas com baixa endemia de malária, mostraram anticorpos citofílicos dominantes para o estágio pré-eritrocítico (JOHN et al., 2008; NARUM et al., 2018; NOLAND et al., 2015). Resultados *in vitro* têm demonstrado que monócitos podem eliminar parasitas assincrônicos na presença de anticorpos IgG3 e IgG1, estes anticorpos facilitam a fagocitose e matam os *Plasmodium* (BOUHAROUN-TAYOUN et al., 1995).

Apesar de não encontrarmos diferença significativa entre os títulos referentes às subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 para as formulações que receberam adjuvantes, notamos uma média de títulos mais elevada para todas as subclasses nos animais imunizados com Poly I:C. e AddaVax. No entanto o papel de cada anticorpo envolvendo o bloqueio da invasão nos hepatócitos pelos esporozoítos precisa ser investigado.

A resposta imune celular gerada pela imunização dos camundongos com a VLP HBcAgPvCS-VK210 e os diferentes adjuvantes foi avaliada ainda frente a produção de citocinas que caracterizam um perfil Th1 e ou Th2 e imunofenotipagem das populações de linfócitos T frente ao estímulo específico com a proteína CS variante CS-VK210. As citocinas identificadas após estímulo caracterizam um perfil Th1 de resposta, para ambas as

formulações utilizadas, sendo estes resultados similares aos obtidos pela vacina RTS,S. Durante a avaliação da fase clínica III dessa vacina, o sobrenadante das células estimuladas com CS revelou um padrão de resposta Th1 associado com a proteção da vacina RTS,S/AS01E (AS01E adjuvante lipossomal contendo MPLA e QS21) (MONCUNILL et al., 2017).

A secreção da citocina IL2 e TNF- α detectada em nossos experimentos, pode estar relacionada com a proteção gerada por ambas as formulações. A proteção em humanos com a vacina RTS,S têm identificado pelo menos a presença de dois dos marcadores CD40L, TNF- α , IL2 ou IFN- γ após a estimulação *in vitro*, sendo o fenótipo CD40L⁺/IL2⁺ o mais frequentemente encontrado (KESTER et al., 2009). Apesar de não termos identificado a secreção de IFN- γ no grupo imunizado com Poly I:C e AddaVax, os níveis elevados de TNF- α , podem estar relacionados com a proteção devido à potencial atividade citotóxica de certas células T CD4⁺ TNF- α contra células infectadas com esporozoítos e IL2 induz a proliferação de células B ajudando na produção de anticorpo, assim como ajudam na proliferação de células T amplificando as funções efetoras podendo ainda induzir a ativação de células Natural Killer e secreção de IFN- γ (DEPINAY et al., 2011; HOROWITZ et al., 2012).

A triagem clínica da vacina RTS,S revelou a produção de elevados títulos de IgG e moderada resposta celular TCD4⁺ Th1 (BARBOSA et al., 2009; HOROWITZ et al., 2012). Em adultos vacinados e desafiados com *P. falciparum* a resposta de células TCD4⁺ e IFN- γ mensurada por ELISPOT foi associada com a proteção (KESTER et al., 2009; LUMSDEN et al., 2011; SUN et al., 2003). A capacidade da VLP HBcAgPvCS-VK210 em gerar resposta imune celular foi demonstrada em estudos conduzidos por Almeida et al. na presença do adjuvante montanide ISA720, no qual a capacidade desse candidato em gerar células T de memória foi avaliada (ALMEIDA et al., 2014).

A VLP HBcAgPvCS-VK210 sem adjuvantes foi capaz de induzir menores títulos de anticorpos anti-CS-VK210, porém na análise da parasitemia obtida pelo ensaio de desafio revelou que apesar das VLPs funcionarem como auto adjuvantes, somente os animais imunizados com HBcAgPvCS-VK210 na presença dos adjuvantes foram protegidos contra o desafio. A resposta imune induzida foi específica para *P. vivax*, uma vez que todos os animais imunizados com a VLP sem epítomos da CS, com ou sem adjuvante, não foram protegidos, descartando a possibilidade de proteção cruzada gerada pela porção correspondente ao vírus da Hepatite B. Ao compararmos a VLP emulsionada com as diferentes formulações, tivemos uma proteção estatisticamente maior em particular, ao

combinar os adjuvantes Poly I:C e AddaVax, sendo esta a formulação responsável pelo maior número de animais protegidos de forma estéril. Estes resultados indicam a importância tanto da VLP quanto do adjuvante na indução de respostas imunes protetoras com este regime de vacinação. Whitacre; Lee; Milich, (2009) utilizando a VLP baseada na proteína HBcAg do vírus da Hepatite B de marmotas, também alcançaram proteção estéril utilizando uma formulação de adjuvantes contendo alumínio e QS21 (Saponina de *Quillaja*), no entanto para alcançar a proteção, foram necessárias altas doses da VLP (100 µg).

Como encontramos um menor número de animais infectados no primeiro experimento com a utilização dos adjuvantes Poly I:C e AddaVax, conduzimos um segundo experimento para comprovar a eficácia alcançada aumentando, no entanto, o intervalo para a infecção dos animais com os parasitas transgênicos foi maior.

Levando em consideração os resultados obtidos por Nussenzweig et al. (2001) e Bruña-Romero et al., (2001), onde uma melhora na ativação de células T foi alcançada ao considerar mais tempo entre as imunizações, possivelmente devido à completa ativação de células T e à diminuição de apoptose sobre a população de células TCD4+ e CD8+ quando comparado com um intervalo maior, decidimos aumentar o intervalo entre o *boost* e o desafio que poderia contribuir para o aumento da eficácia protetora.

Nesse segundo experimento de desafio, nosso candidato foi capaz de gerar 85% de proteção estéril, utilizando apenas 10µg da VLP. Estudos realizados em Oxford e publicados por Salman et al. demonstram que a proteção gerada pela VLP Rv21, baseada na proteína de superfície do vírus da Hepatite B, está relacionada aos altos títulos de anticorpos gerados (SALMAN et al., 2017). As emulsões baseadas em óleo esqualeno, como é o caso do adjuvante AddaVax, possuem a capacidade de induzir ambas respostas Th1 e Th2 (CALABRO et al., 2013). O uso do adjuvante AddaVax com a vacina Rv21 já foi avaliada e não obteve proteção, porém atrasou a parasitemia sanguínea de forma significativa (SALMAN et al., 2017).

A utilização do adjuvante Poly I:C em combinação com a proteína CS de *P. falciparum*, foi reportada como sendo indutora de uma resposta do tipo Th1 de longa duração em primatas não humanos (TEWARI et al., 2010). Compostos baseados em dsRNA, como o Poly I:C possuem uma meia vida curta e podem ser degradados pelas RNases presente nos fluidos corpóreos (BUMCROT et al., 2006; HARTMANN, 2016; NAUMANN et al., 2013), porém combinações deste adjuvante com outro pertencente à classe de depósito ou sistema de entrega, podem prevenir a degradação do Poly I:C (MEHRIZI et al., 2018).

A proteção estéril alcançada após a vacinação com RTS,S é principalmente dependente da resposta de anticorpos contra as repetições centrais da proteína CS. É provável que os níveis de proteção observados, pelo menos em parte, estejam relacionados à capacidade dos anticorpos reduzirem o número de esporozoítos que entram nos hepatócitos. A ligação de anticorpos anti-CS inibe a motilidade dos esporozoítos, o que é necessário para a invasão de hepatócitos, e também inibem a ligação do esporozoito à membrana plasmática dos hepatócitos nos sinusóides hepáticos, expondo-os ao sistema imunológico por mais tempo. A CS desempenha um papel na invasão dos hepatócitos e, portanto, os anticorpos anti-CS podem também bloquear fisicamente a invasão dos hepatócitos. Incapazes de invadir o fígado, os esporozoítos opsonizados são rapidamente fagocitados pelos macrófagos e outros polimorfonucleócitos ou lisados após a ativação do complemento (CASARES; RICHIE, 2009; HUTCHINGS et al., 2007; STEWART et al., 1986).

Uma vacina contra *P. vivax* pode facilitar a eliminação desse agente em muitas áreas endêmicas, onde as ferramentas de controles atuais (fármacos ou controle vetorial) enfrentam desafios ainda maiores devido à biologia do parasita. Acreditamos que para melhorar nosso candidato, poderíamos incluir em nossa construção epítopos TCD8⁺ fusionados na porção C-terminal do antígeno HBcAg. A atividade de linfócitos T CD8⁺ mediada pela liberação de interferon- γ talvez seja o mecanismo efetor mais importante para a destruição do parasito durante a fase pré-eritrocítica (ARÉVALO-HERRERA et al., 2002). O interferon- γ , produzido principalmente por células T CD8⁺ pode estimular a citólise por aumentar o número de moléculas de MHC-I na superfície dos hepatócitos, fazendo com que estes se tornem melhores alvos dos LTCs, e por ativar células efetoras subsidiárias como células NK e macrófagos, que também são capazes de induzir citólise. O trabalho recentemente publicado por (JUNQUEIRA et al., 2018), demonstrou ainda que células T CD8⁺, são capazes de reconhecer e matar reticulócitos infectados por *P.vivax*. durante a fase sanguínea do parasito, este resultado nos faz pensar ainda na possibilidade de incluir proteínas de fase sanguínea de *P. vivax* em nossa formulação.

Uma questão a ser abordada ao usar o HBcAg como base para uma plataforma vacinal é o fato de que o HBcAg é um antígeno que ocorre naturalmente durante a infecção por HBV e que a infecção leva à indução de uma resposta anti-HBc. Dessa forma, os anticorpos pré-existentes específicos contra HBc poderiam teoricamente, aumentar a eficácia das vacinas carreadoras de HBc promovendo a opsonização das VLPs e subsequente apresentação de antigênica, ou não ter efeito algum, ou ainda reduzir a imunogenicidade da vacina pela

opsonização das partículas vacinas, que serão capturadas e destruídas pelos macrófagos. No entanto, a resposta para essa indagação pode ser resolvida com os resultados obtidos por Schodel et al., (1994) no qual a imunidade anti-HBc preexistente não interferiu significativamente na geração da resposta específica ao antígeno de interesse. Da mesma forma, a imunidade anti-HBc não inibiu as respostas imunes ao hantavírus ou ao influenza A em camundongos previamente vacinados com partículas recombinantes HBc na ausência do antígeno específico (DE FILETTE et al., 2008; GELDMACHER et al., 2004). Além disso, a repetitiva disposição dos antígenos na superfície da partícula pode tornar o HBcAg inacessível. A imunidade pré-existente contra o HBV, parece não influenciar na geração de anticorpos anti-CS na vacina RTS,S, e níveis mais elevados de anticorpos anti-HBs foram recentemente associados com um menor risco de malária causada por *P. falciparum* em indivíduos imunizados com a vacina RTS,S (UBILLOS et al., 2018).

Outra questão mais prática que pode ocorrer é em relação à confusão na interpretação sorológica de indivíduos infectados quanto às respostas de anticorpos induzidas pelas vacinas baseadas no HBcAg. Essa situação pode ser resolvida pelos ensaios diferenciais anti-HBs, HBsAg e anti-HBe ou ainda pela análise da carga viral. No caso da utilização do antígeno de superfície na vacina anti-malárica, esta questão não seria tão facilmente resolvida, uma vez que este mesmo antígeno é compartilhado com a vacina contra o HBV.

Em resumo, os dados apresentados neste trabalho demonstraram que a imunização com a VLP e adjuvantes, em protocolos dose/reforço, foram eficientes na geração de resposta imune humoral caracterizada pelos elevados títulos de anticorpos. Além disso, demonstramos que nosso protocolo tem capacidade de gerar alta proteção. A vacina ideal pré-eritrocítica, deve primeiramente reduzir a infecção assim como, prevenir o estabelecimento das formas hipnozoítas, reduzindo, portanto, o risco de relapsos da infecção que contribuem para a transmissão. Acreditamos que o candidato aqui descrito possa auxiliar na consecução de todos esses objetivos.

7. Conclusão

Nossos resultados corroboram com a hipótese de que é possível produzir formulações vacinais baseadas na plataforma VLP utilizando o antígeno HBcAg e a proteína CS indutores de imunidade protetora contra a malária causada por *P. vivax* e que podem servir como base para o desenvolvimento de uma vacina universal.

- Construímos uma nova VLP baseada no antígeno HBcAg contendo epítomos capazes de gerar anticorpos contra a proteína CS variante VK247 de *P. vivax*.
- A expressão e purificação das VLPs HBcAgPvCS-VK247 e HBcAgPvCS-VK210 com cauda de histidinas expressas em *E. coli* foi bem-sucedida, sendo a estrutura conformacional da partícula comprovada pela microscopia eletrônica e W.B.
- As VLPs utilizadas no presente trabalho, foram capazes de gerar anticorpos específicos contra as duas variantes mais prevalentes da CS de *P. vivax*.
- As formulações aqui propostas foram capazes induzir a secreção das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-2, requeridas na proteção contra *P. vivax*.
- A VLP HBcAgPvCS-VK210, necessita da adição dos adjuvantes para conferir proteção.

- Os adjuvantes MPLA de *B. pertussis*/Alhydrogel, Poly I:C/AddaVax não resultaram em resposta imune humoral diferente estatisticamente. No entanto, a emulsão contendo Poly I:C e AddaVax foi capaz de proteger um maior número de animais contra o desafio.

8. Considerações finais e perspectivas futura

Os resultados apresentados nesse estudo demonstram que nosso candidato vacinal antimalárico, possui a capacidade de proteger contra a infecção causada por *P. vivax*. As utilizações da combinação de adjuvantes com perfil imunológico complementar, melhoraram significativamente a proteção frente ao desafio com os parasitas transgênicos, além disso, demonstramos que um intervalo maior dado entre a última dose da vacina e a exposição ao parasito melhorou satisfatoriamente o número de animais protegidos. No entanto, precisamos ainda investigar os mecanismos envolvidos e responsáveis pela melhor proteção alcançada, assim como, vemos a necessidade de avaliar a inclusão de antígenos alvos correspondente a outros estágios do parasito e a via subcutânea para a imunização.

Referências

- ADA, G.; ISAACS, D. Carbohydrate – protein conjugate vaccines. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, p. 70–85, 2003.
- ADAMS, J. H.; MUELLER, I. The Biology of Plasmodium vivax. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 9, 2017.
- ADU-BOBIE, J. et al. Two years into reverse vaccinology. **Vaccine**, v. 21, n. 7–8, p. 605–610, 2003.
- AKIRA, S. Toll-like Receptors and Innate Immunity. n. 1992, p. 1–56, 2001.
- ALEXOPOULOU, L. et al. Recognition of double stranded RNA and activation of NF κ B by TLR 3. **Lectures to Nature**, v. 413, n. 18, 2001.
- ALMEIDA, A. P. M. M. et al. Long-lasting humoral and cellular immune responses elicited by immunization with recombinant chimeras of the Plasmodium vivax circumsporozoite protein. **Vaccine**, v. 32, n. 19, p. 2181–2187, 2014.
- ANDRE, F. E. et al. Vaccination greatly reduces disease, disability, death and inequity worldwide. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, n. 2, p. 140–146, 2008.
- ANSARI, H. R. et al. Genome-scale comparison of expanded gene families in Plasmodium ovale wallikeri and Plasmodium ovale curtisi with Plasmodium malariae and with other Plasmodium species. **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 11, p. 685–696,

2016.

ARÉVALO-HERRERA, M. et al. Identification of HLA-A2 restricted CD8+ T-lymphocyte responses to Plasmodium vivax circumsporozoite protein in individuals naturally exposed to malaria. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 3, p. 161–169, 2002.

ARIAS, E. United States Life Tables , 2008. **National Statistics Reports**, v. 61, n. 3, 2012.

ARNOT, D. E. et al. Circumsporozoite protein of Plasmodium vivax: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science**, v. 230, n. 4727, p. 815–818, 1985.

ARUN KUMAR, K. et al. The circumsporozoite protein is an immunodominant protective antigen in irradiated sporozoites. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 937–940, 2006.

AVERY, B. Y. O. T.; GOEBEL, W. F. C h e m o - i m m u n o l o g i c a l studies on conjugated carbohydrate-proteins. V. The immunological specificity of an antigen prepared by combining the capsular polysaccharide of type III pneumococcus with foreign protein. **Journal of Experimental Medicine**, v. 54, p. 347–447, 1931.

AWATE, S.; BABIUK, L. A.; MUTWIRI, G. Mechanisms of action of adjuvants. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. MAY, p. 1–10, 2013.

BALLALAI, I. Vacinação e Longevidade. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 06, p. 741–742, 2017a.

BALLALAI, I. Vaccination and Longevity. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 20, n. 6, p. 741–742, dez. 2017b.

BARBOSA, A. et al. Plasmodium falciparum-specific cellular immune responses after immunization with the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in an area of high endemicity in Mozambique. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4502–4509, 2009.

BENNETT, J. W. et al. Phase 1/2a Trial of Plasmodium vivax Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. 1–16, 2016.

BIRKETT, A et al. A Modified Hepatitis B Virus Core Particle Containing Multiple Epitopes of the. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6860–6870, 2002.

BOTTCHER, B. WYNNE, S.A. CROWTHER, R. A. Bottcher, 1997 Determination of fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy.pdf. **Nature**, v. 38688–91, 1997.

BÖTTCHER, B.; WYNNE, S. A.; CROWTHER, R. A. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. **Nature**, v. 386, n. 6620, p. 88–91, 1997.

BOUHAROUN-TAYOUN, H. et al. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 1, p. 123–123, 1995.

BRUÑA-ROMERO, O. et al. Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, p. 11491–11496, 2001.

BUMCROT, D. et al. RNAi therapeutics: A potential new class of pharmaceutical drugs. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 12, p. 711–719, 2006.

CALABRO, S. et al. The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect. **Vaccine**, v. 31, n. 33, p. 3363–3369, 2013.

CALMETTE, A.; GUERIN, C. CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'IMMUNITÉ ANTITUBERCULEUSE CHEZ LES BOVIDÉS. **Annales de l'Institut Pasteur**, 1899.

CASARES, S.; RICHIE, T. L. Immune evasion by malaria parasites: a challenge for vaccine development. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 3, p. 321–330, 2009.

CDC. **History of Smallpox Origin of Smallpox Historical Highlights**: Disponível em: <<https://www.cdc.gov/smallpox/history/history.html>>. Acesso em: 16 mar. 2019.

CDC. **Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>>. Acesso em: 28 ago. 2018.

CLARKE, B. E. et al. Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. **Nature**, v. 330, n. 26, p. 381–384, 1987.

COCHRANE, A. H. et al. Widespread reactivity of human sera with a variant repeat of the circumsporozoite protein of Plasmodium vivax. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 1990.

COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 492–503, 2010.

COPPI, A. et al. Heparan Sulfate Proteoglycans Provide a Signal to Plasmodium Sporozoites

to Stop Migrating and Productively Invade Host Cells. **Cell Host and Microbe**, v. 2, n. 5, p. 316–327, 2007.

COPPI, A. et al. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 2, p. 341–356, 2011.

CROWTHER, R. A. et al. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. **Cell**, v. 77, n. 6, p. 943–950, 1994.

D'AMELIO, E.; SALEMI, S.; D'AMELIO, R. Anti-Infectious Human Vaccination in Historical Perspective. **International Reviews of Immunology**, v. 35, n. 3, p. 260–290, 2015.

DE FILETTE, M. et al. Universal influenza A M2e-HBc vaccine protects against disease even in the presence of pre-existing anti-HBc antibodies. **Vaccine**, v. 26, n. 51, p. 6503–6507, 2008.

DE GREGORIO, E.; CAPRONI, E.; ULMER, J. B. Vaccine adjuvants: Mode of action. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. JUL, p. 1–6, 2013.

DE GREGORIO, E.; RAPPUOLI, R. From empiricism to rational design: A personal perspective of the evolution of vaccine development. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 505–514, 2014.

DELANY, I.; RAPPUOLI, R.; DE GREGORIO, E. Vaccines for the 21st century. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, n. 6, p. 708–720, 2014.

DEPINAY, N. et al. Inhibitory effect of TNF- α on malaria pre-erythrocytic stage development: Influence of host hepatocyte/parasite combinations. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011.

DIAS, W. O. et al. New approaches in pertussis vaccines for developing countries. **Applied Microbiology**, p. 668–672, 2007.

DIDIERLAURENT, A. M. et al. AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6186–6197, 2009.

DRAPER, S. J. et al. Recent advances in recombinant protein-based malaria vaccines. **Vaccine**, v. 33, n. 52, p. 7433–7443, 2015.

DUPUIS, M. et al. Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 10, p. 2910–2918, 2001.

FENNER, F.; HENDERSON, D. A.; ARITA, I.; JEZEK, Z.; LADNYI, I. D. Smallpox and its eradication. **Journal of epidemiology and community health**, v. 43, n. 1, p. 92, 1988.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. **British journal of experimental pathology**, p. 226–236, 1929.

FRANKE, E. D. et al. Prevalence of antibody to the variant repeat of the circumsporozoite protein of Plasmodium vivax in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 1992.

FRAZER, I. H.; COX, J. Finding a vaccine for human papillomavirus. **Lancet**, v. 367, n. 9528, p. 2058–2059, 2006.

FREUND, J.; CASALS, J.; HOSMER, E. P. Sensitization and Antibody Formation after Injection of Tubercle Bacilli and Paraffin Oil. **Cowdry's Special Cytology**, v. 2, 1937.

GARON, N. et al. Development of an AS04-adjuvanted HPV vaccine with the adjuvant system approach. **BioDrugs**, v. 25, n. 4, p. 217–226, 2011.

GELDMACHER, A. et al. An amino-terminal segment of hantavirus nucleocapsid protein presented on hepatitis B virus core particles induces a strong and highly cross-reactive antibody response in mice. **Virology**, v. 323, n. 1, p. 108–119, 2004.

GENTON, B. et al. Plasmodium vivax and mixed infections are associated with severe malaria in children: A prospective cohort study from Papua New Guinea. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 6, p. 0881–0889, 2008.

GIRARD, M. P. et al. A review of vaccine research and development: Human enteric infections. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 2732–2750, 2006.

GIULIANI, M. M. et al. A Universal Vaccine for Serogroup B Meningococcus. **PNAS**, v. 26, n. 103, p. 10834–10839, 2006.

GLENNY, A. T. et al. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. **J Pathol Bacteriol**, v. 29, p. 38–39, 1926.

GLENNY, A. T.; HOPKINS, B. E. Diphtheria Toxoid As an Immunizing Agent. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 17, n. 5, p. 524–529, 1923.

GOLDBLATT, D. Conjugate vaccines. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 119, p. 1–3, 2000.

GRGACIC, E. V. L.; ANDERSON, D. A. Virus-like particles: Passport to immune recognition. **Methods**, v. 40, p. 60–65, 2006.

GSK. **Engerix® -b Hepatitis B vaccine (recombinant) Available**, 2013a.

GSK. **CERVARIX® Human Papillomavirus Vaccine Types 16 and 18 (Recombinant, AS04 adjuvanted)**, 2013b. Disponível em: <https://au.gsk.com/media/265100/cervarix_cmi_version_006.pdf>

GSK. **Gardasil - Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6, 11, 16, 18) Recombinant Vaccine Distribution**, 2014. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Product+monograph#2>>

GSK. Gardasil® 9. p. 1–41, 2016.

HARTMANN, G. Nucleic Acid Immunity. In: [s.l: s.n.]. p. 3–49.

HIELLMAN, M. R. et al. Live, Attenuated Rubella-Virus Vaccine. **The New England Journal of Medicine**, p. 300, 1968.

HOLANDA, R. A. et al. Recombinant vaccines of a CD4+T-cell epitope promote efficient control of *Paracoccidioides brasiliensis* burden by restraining primary organ infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1–20, 2017.

HOOFNAGLE, J. H.; GERETY, R. J.; BARKER, L. F. Antibody To Hepatitis-B-Virus Core in Man. **The Lancet**, v. 302, n. 7834, p. 869–873, 1973.

HOROWITZ, A. et al. Antigen-Specific IL-2 Secretion Correlates with NK Cell Responses after Immunization of Tanzanian Children with the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 10, p. 5054–5062, 2012.

HUTCHINGS, C. L. et al. Combination of protein and viral vaccines induces potent cellular and humoral immune responses and enhanced protection from murine malaria challenge. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 12, p. 5819–5826, 2007.

HUTCHISON, S. et al. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 3, p. 1272–1279, 2012.

IBGE- DIRETORIA DE PESQUISA, D. **Expectativa de vida do brasileiro sobe para 75,8 anos**. Disponível em: <

de-noticias/noticias/18469-expectativa-de-vida-do-brasileiro-sobe-para-75-8-anos>. Acesso em: 12 fev. 2019.

ISAACS, A.; COX, R. A.; ROTEM, Z. Foreign Nucleic Acids As the Stimulus To Make Interferon. **The Lancet**, v. 282, n. 7299, p. 113–116, 1963.

JENNINGS, G. T.; BACHMANN, M. F. The coming of age of virus-like particle vaccines. **Biological Chemistry**, v. 389, n. 5, p. 521–536, 2008.

JOHN, C. C. et al. Antibodies to Pre-erythrocytic Plasmodium falciparum Antigens and Risk of Clinical Malaria in Kenyan Children . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 4, p. 519–526, 2008.

JUNQUEIRA, C. et al. Cytotoxic CD8+ T cells recognize and kill Plasmodium vivax–infected reticulocytes. **Nature Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1330–1336, 2018.

KAPPE, S. H. I.; BUSCAGLIA, C. A.; NUSSENZWEIG, V. Plasmodium Sporozoite Molecular Cell Biology . **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 29–59, 2004.

KATO, H. et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. **Nature**, v. 441, n. 1, p. 101–105, 2006.

KESTER, K. E. et al. Randomized, Double-Blind, Phase 2a Trial of Falciparum Malaria Vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in Malaria-Naive Adults: Safety, Efficacy, and Immunologic Associates of Protection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 3, p. 337–346, 2009.

KIM, K. S. et al. Current status of human papillomavirus vaccines. **Clinicalexperimental Vaccine Research**, v. 3, p. 168–175, 2014.

KOCH, R. The etiology of anthrax, based on the life history of Bacillus anthracis. **Contributions to the biology of plants**, v. 2, n. 2, p. 277–310, 1876.

KOMMAREDDY, S.; SINGH, M.; O’HAGAN, D. T. **Mf59**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2017.

KOPROWSKI, H.; JERVIS, G. A.; NORTON, T. W. Immune responses in human volunteers upon oral administration of a rodent-adapted strain of poliomyelitis virus. **American Journal of Epidemiology**, v. 55, n. 1, p. 108–126, 1952.

KORI, L. D.; VALECHA, N.; ANVIKAR, A. R. Insights into the early liver stage biology of Plasmodium. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 55, n. 1, p. 9–13, 2018.

KUNDI, M. New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system. **Expert Review of Vaccines**, v. 6, n. 2, p. 133–140, 2007.

LAZDINA, U. et al. Molecular Basis for the Interaction of the Hepatitis B Virus Core Antigen with the Surface Immunoglobulin Receptor on Naive B Cells. **Journal of Virology**, v. 75, n. 14, p. 6367–6374, 2001.

LECHMANN, M. et al. Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. **Hepatology**, v. 34, n. 2, p. 417–423, 2001.

LEE, S.; NGUYEN, M. T. Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases. **Immune Network**, v. 15, n. 2, p. 51, 2015.

LIU, B. et al. Innate immune memory and homeostasis may be conferred through crosstalk between the TLR3 and TLR7 pathways. **Science Signaling**, v. 9, n. 436, p. ra70–ra70, 2016a.

LIU, J. et al. Virus like particle-based vaccines against emerging infectious disease viruses. **Virologica Sinica**, v. 31, n. 4, p. 279–287, 2016b.

LONGHI, M. P. et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4 + Th1 immunity with poly IC as adjuvant. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 7, p. 1589–1602, 2009.

LUA, L. H. L. et al. Bioengineering virus-like particles as vaccines. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 425–440, 2014.

LUMSDEN, J. M. et al. Protective immunity induced with the RTS,S/AS vaccine is associated with IL-2 and TNF- α producing effector and central memory CD4 + T cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

MACHADO, R. L. D.; PÓVOA, M. M. Distribution of Plasmodium vivax variants (VK210, VK247 and P.vivax-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 377–381, 2000.

MAGUIRE, J. D.; BAIRD, J. K. The “non-falciparum” malarias: the roles of epidemiology, parasite biology, clinical syndromes, complications and diagnostic rigour in guiding therapeutic strategies. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 104, n. 4, p. 283–301, 2010.

MAHMOUDI, S.; KESHAVARZ, H. Efficacy of phase 3 trial of RTS, S/AS01 malaria vaccine: The need for an alternative development plan. **Human Vaccines and**

Immunotherapeutics, v. 13, n. 9, p. 2098–2101, 2017.

MANNHALTER, J. W. et al. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. **Clinical and experimental immunology**, v. 61, n. 1, p. 143–51, 1985.

MARRACK, P.; MCKEE, A. S.; MUNKS, M. W. Towards an outstanding of the adjuvant action of aluminium.pdf. v. 9, n. April, p. 287–293, 2009.

MCCARTHY, V. C.; CLYDE, D. F. Plasmodium vivax: Correlation of circumsporozoite precipitation (CSP) reaction with sporozoite-induced protective immunity in man. **Experimental Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 167–171, 1977.

MEDINA-MORALES, D. A. et al. Severe and benign Plasmodium vivax malaria in Emberá (Amerindian) children and adolescents from an endemic municipality in Western Colombia. **Journal of Infection and Public Health**, v. 9, n. 2, p. 172–180, 2016.

MEHRIZI, A. A. et al. Poly(I:C) adjuvant strongly enhances parasite-inhibitory antibodies and Th1 response against Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 (42-kDa fragment) in BALB/c mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 207, n. 2, p. 151–166, 2018.

MÉNARD, R. et al. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity Robert. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 701–712, 2013.

MENDONÇA, V. R. R. et al. Associations between hepcidin and immune response in individuals with hyperbilirubinaemia and severe malaria due to Plasmodium vivax infection. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2015.

MERCK. **Recombivax Hb (hepatitis B vaccine [recombinant])**, 2014. Disponível em: <https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/r/recombivax_hb/recombivax_pi.pdf>

MILICH, D.; LIANG, T. J. Exploring the Biological Basis of Hepatitis B e Antigen in Hepatitis B Virus Infection. **Hepatology**, v. 38, n. 5, p. 1075–1086, 2003.

MILICH, D. R. et al. Antibody production to the nucleocapsid and envelope of the hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site. **Nature**, v. 329, p. 547–549, 1987.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Dos Centros De Referência Para Imunobiológicos Especiais**. 3^a ed. [s.l: s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informe Técnico para Implantação da Vacina Adsorvida Difteria, Tétano e Coqueluche (Pertussis Acelular) Tipo adulta-dTpa**. [s.l: s.n.].

- MONCUNILL, G. et al. Distinct helper t cell type 1 and 2 responses associated with malaria protection and risk in rts,s/as01e vaccinees. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 5, p. 746–755, 2017.
- MOSCA, F. et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 30, p. 10501–10506, 2008.
- MURPHY, S. L. et al. Mortality in the United States , 2017. n. 328, p. 1–8, 2018.
- NARUM, D. L. et al. Correlation of High Levels of Antibodies To Multiple Pre-Erythrocytic Plasmodium Falciparum Antigens and Protection From Infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 1, p. 222–228, 2018.
- NAUMANN, K. et al. Activation of dendritic cells by the novel toll-like receptor 3 agonist RGC100. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, 2013.
- NEST, G. VAN et al. The history of MF59 ® adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 1, p. 13–30, 2013.
- NOLAND, G. S. et al. Effect of transmission intensity and age on subclass antibody responses to Plasmodium falciparum pre-erythrocytic and blood-stage antigens. **Acta Tropica**, v. 142, p. 47–56, 2015.
- NURLEILA, S. et al. Serious and fatal illness associated with falciparum and vivax malaria among patients admitted to hospital at West Sumba in Eastern Indonesia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 1, p. 41–49, 2012.
- NUSSENZWEIG, R. S. et al. Specificity of protective immunity produced by X-irradiated plasmodium berghei sporozoites. **Nature**, v. 222, n. 5192, p. 488–489, 1969.
- NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S. Circumsporozoite proteins of malaria parasites. **Cell**, v. 42, n. 2, p. 401–403, 1985.
- O’HAGAN, D. T. **MIM series Vaccine Adjuvants**. [s.l: s.n.].
- O’HAGAN, D. T. et al. The mechanism of action of MF59 - An innately attractive adjuvant formulation. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4341–4348, 2012.
- OLIVEIRA, G. A. W. K. et al. Phase I trial to assess safety and immunogenicity of Malarivax, a recombinant hepatitis virus core particle containing repeat and T cell epitopes of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2003.

- OTT, G. et al. MF59 Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines. In: **Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach**. [s.l.: s.n.]. p. 152–169.
- PANHUIS, W. G. VAN et al. NIH Public Access. v. 369, n. 22, p. 2152–2158, 2013.
- PARK, S. BIN. Hepatitis E vaccine debuts. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 21–22, 2012.
- PASQUALE, A. et al. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. **Vaccines**, v. 3, n. 2, p. 320–343, 2015.
- PASTEUR, L. De l'atténuation du virus du choléra des poules. **Comptes Rendus des Séances de L'académie des sciences**, v. 91, p. 673–680, 1880a.
- PASTEUR, L. The attenuation casual agent of fowl cholera. **Immunology**, p. 126–131, 1880b.
- PASTEUR, L. Membres de l'Académie des sciences depuis sa création : Louis Pasteur Note de L. Pasteur -. **Comptes Rendus des Séances de L'académie des sciences**, v. 101, p. 765–772, 1885.
- PINZON-ORTIZ, C. et al. The Binding of the Circumsporozoite Protein to Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans Is Required for Plasmodium Sporozoite Attachment to Target Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 29, 2001.
- POPE, B.; KENT, H. M. High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 3, p. 536–537, 1996.
- PRADEL, G.; GARAPATY, S.; FREVERT, U. Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 637–651, 2002.
- PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites: The Plasmodium liver stage. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 849–856, 2006.
- PUMPENS, P.; GRENS, E. HBV Core Particles as a Carrier for B Cell / T Cell Epitopes. **Intervirolgy**, v. 1067, n. 44, p. 98–114, 2001.
- PUMPENS, P.; GRENS, E. The true story and advantages of the famous hepatitis B virus core particles: Outlook 2016. **Molecular Biology**, v. 50, n. 4, p. 489–509, 2016.
- QARI, S. H. et al. Identification of Plasmodium vivax-like human malaria parasite. **The Lancet**, v. 341, n. 8848, p. 780–783, 1993.

- QUINTILIO, W. et al. Bordetella pertussis monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. **Vaccine**, v. 27, n. 31, p. 4219–4224, 2009.
- RAMON, G. Sur la toxine et sur l’anatoxine diphtheriques. **Annales de l’Institut Pasteur**, v. 38, p. 1–10, 1924.
- RAMON, G.; ZOELLER, C. Les “vaccins associés” par union d’une anatoxine et d’un vaccin microbien (T.A.B.) ou par mélange d’anatoxines. **CR Soc Biol**, v. 13, p. 155–165, 1926.
- RAPPUOLI, R. et al. Vaccines for the twenty-first century society. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 12, p. 865–872, 2011.
- RAPPUOLI, R. Inner Workings: 1885, the first rabies vaccination in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 34, p. 12273–12273, 2014.
- RAPPUOLI, R.; MALITO, E. History of Diphtheria Vaccine Development. In: **Corynebacterium diphtheriae and Related Toxigenic Species**. [s.l: s.n.]. p. 225–238.
- RAPPUOLI, R.; SANTONI, A.; MANTOVANI, A. Vaccines: An achievement of civilization, a human right, our health insurance for the future. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 1, p. 7–9, 2018.
- REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, n. 12, p. 1597–1608, 2013.
- RELYVELD, E. H. History of Toxoids. **History of Vaccine Development**, p. 57–64, 2011.
- REYES-SANDOVAL, A. et al. CD8+ T Effector Memory Cells Protect against Liver-Stage Malaria. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 3, p. 1347–1357, 2011.
- RODRIGUES LP, SCHNEERSON R, R. J. Immunity to Hemophilus influenzae type b. I. The isolation, and some physicochemical, serologic and biologic properties of the capsular polysaccharide of Hemophilus influenzae type b. **Journal of immunology**, v. 107, n. 4, p. 1071– 80., 1971.
- ROSENBERG, R. et al. Circumsporozoite Protein Heterogeneity in the Human Malaria Parasite Plasmodium vivax. **Science**, v. 245, n. 19, p. 973–976, 1989.
- ROY, P.; NOAD, R. Virus-like particles as a vaccine delivery system: Myths and facts. **Human Vaccines**, v. 4, n. December 2014, p. 5–8, 2008.
- RUTLEDGE, G. G. et al. Plasmodium malariae and P. ovale genomes provide insights into malaria parasite evolution. **Nature**, v. 542, n. 7639, p. 101–104, 2017.

SALK, J. E.; PITTSBURGH, M. D. POLIOMYELITIS VACCINE PREPARATION AND ADMINISTRATION. **The Journal of the American Medical Association**, v. 169, n. 16, 1959.

SALMAN, A. M. et al. Rational development of a protective *P. vivax* vaccine evaluated with transgenic rodent parasite challenge models. **Scientific Reports**, v. 7, n. April, p. 1–19, 2017.

SCHODEL, F. et al. Immunity to malaria elicited by hybrid hepatitis B virus core particles carrying circumsporozoite protein epitopes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 3, p. 1037–1046, 1994.

SCHÖDEL, F. et al. The position of heterologous epitopes inserted in hepatitis B virus core particles determines their immunogenicity. **Journal of virology**, v. 66, n. 1, p. 106–14, 1992.

SEEGER, C.; MASON, W. S. Hepatitis B Virus Biology. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, v. 64, n. 1, p. 51–68, 2000.

SELA, M.; HIELLMAN, M. R. Therapeutic vaccines: Realities of today and hopes for the future. **PNAS**, v. 101, n. 12, p. 15559, 2004.

SEUBERT, A. et al. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 8, p. 5402–12, 2008.

SMITH, R. C.; VEGA-RODRÍGUEZ, J.; JACOBS-LORENA, M. The Plasmodium bottleneck: Malaria parasite losses in the mosquito vector. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 644–661, 2014.

STANLEY, W. M. THE PREPARATION AND PROPERTIES OF INFLUENZA VIRUS VACCINES CONCENTRATED AND PURIFIED BY DIFFERENTIAL CENTRIFUGATION. **Methods**, p. 49–68, 1945.

STEFAN, R. Edward Jenner and the history of a smallpox and vaccination. **Baylor University Medical Center Proceedings**, v. 18, n. 21, p. 21–25, 2005.

STEIN, K. E. Thymus-Independent and Thymus-Dependent Responses to Polysaccharide Antigens Author (s): Kathryn E . Stein Source : The Journal of Infectious Diseases , Vol . 165 , Supplement 1 . Epidemiology , Pathogenesis , and Prevention of Haemophilus influenzae Di. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 165, p. 49–52, 1992.

STEWART, M. J. et al. Plasmodium berghei sporozoite invasion is blocked in vitro by sporozoite-immobilizing antibodies. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 3, p. 859–864, 1986.

STEWART, M. J.; VANDERBERG, P. J. Malaria Sporozoites Release Circumsporozoite Protein from Their. **The Journal of protozoology**, v. 38, n. 4, p. 411–421, 1991.

STORTI-MELO, L. M. et al. Plasmodium vivax circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 7, p. 672–678, 2009.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 2006.

SUN, P. et al. Protective Immunity Induced with Malaria Vaccine, RTS,S, Is Linked to Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein-Specific CD4 + and CD8 + T Cells Producing IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 12, p. 6961–6967, 2003.

TEIXEIRA, L. H. et al. Immunogenicity of a prime-boost vaccine containing the circumsporozoite proteins of plasmodium vivax in rodents. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 2, p. 793–807, 2014.

TEWARI, K. et al. Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi- functional CD4+ T cell responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein (CSP) and α DEC-CSP in Non Human Primates. v. 28, n. 30, p. 3921–3932, 2010.

UBILLOS, I. et al. Baseline exposure, antibody subclass, and hepatitis B response differentially affect malaria protective immunity following RTS,S/AS01E vaccination in African children. **BMC medicine**, v. 16, n. 1, p. 197, 2018.

VALENZUELA, P. et al. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. **Nature**, v. 298, n. 5872, p. 347–350, 1982.

VANDERBERG, J. P.; FREVERT, U. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of Plasmodium berghei sporozoites injected into skin by mosquitoes. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 9, p. 991–996, 2004.

VOGEL, F. R. Improving Vaccine Performance with Adjuvants. **Vaccine Adjuvants**, n. 1, p. 266–270, 2000.

VON BEHRING, E.; KITASATO, S. Uber das zustandekommen der diphtherie-immunitat und der tetanus-immunitat bie tieren. **Molecular Immunology**, v. 28, n. 49, p. 1317, 1319–20, 1890.

VONO, M. et al. The adjuvant MF59 induces ATP release from muscle that potentiates response to vaccination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 52, p.

21095–21100, 2013.

WELLER, T. H.; ROBBINS, F. C.; ENDERS, J. F. Cultivation of Poliomyelitis Virus in Cultures of Human Foreskin and Embryonic Tissues. **Experimental Biology and Medicine**, v. 72, n. 1, p. 153–155, 1949.

WEN, Y.; SHI, Y. Alum: an old dog with new tricks. **Emerging microbes & infections**, v. 5, n. November 2015, p. e25, 2016.

WHITACRE, D. C.; LEE, B. O.; MILICH, D. R. Use of hepadnavirus core proteins as vaccine platforms. v. 8, n. 11, p. 1565–1573, 2009.

WHO. **World Malaria Report. 2018.** [s.l: s.n.].

WILLIS, N. J. Edward Jenner and the eradication of smallpox. **Scottish Medical Journal**, v. 42, n. 4, p. 118–121, 1997.

WIRTZ, R. A. et al. Prevalence of antibody to heterologous circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in Thailand. **The Lancet**, v. 336, n. 8715, p. 593–595, 1990.

YADAVA, A. et al. A novel chimeric *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein induces biologically functional antibodies that recognize both VK210 and VK247 sporozoites. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 3, p. 1177–1185, 2007.

YOSHIDA, N. et al. Hybridoma Produces Protective Antibodies Directed Against the Sporozoite Stage of Malaria Parasite. v. 207, n. 4, p. 71–73, 1980.

ZELTINS, A. Construction and characterization of virus-like particles: A review. **Molecular Biotechnology**, v. 53, n. 1, p. 92–107, 2013.

ZHANG, X. et al. Robust manufacturing and comprehensive characterization of recombinant hepatitis E virus-like particles in Hecolin®. **Vaccine**, v. 32, n. 32, p. 4039–4050, 2014.

ZHAO, Q. et al. Virus-like particle-based human vaccines: Quality assessment based on structural and functional properties. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 11, p. 654–663, 2013.

ZHOU, J. et al. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. **Virology**, v. 185, n. 1, p. 251–257, 1991.