



UFAM



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

EMMILY MYRELLA VASCONCELOS MOURÃO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE POR VIA DE MUCOSA CONTRA
ANTÍGENOS CANDIDATOS A VACINA PARA MALÁRIA CAUSADA POR
*Plasmodium falciparum***

**MANAUS – AM
2023**

EMMILY MYRELLA VASCONCELOS MOURÃO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE POR VIA DE MUCOSA CONTRA
ANTÍGENOS CANDIDATOS A VACINA PARA MALÁRIA CAUSADA POR
*Plasmodium falciparum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador:

Dr. Luís André Morais Mariúba

Coorientadores:

Dr. Gemilson Soares Pontes
Dra. Késsia Caroline Souza Alves

**MANAUS – AM
2023**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M929a Mourão, Emmily Myrella Vasconcelos
Avaliação da resposta imune por via de mucosa contra antígenos
candidatos a vacina para malária causada por *Plasmodium*
falciparum / Emmily Myrella Vasconcelos Mourão . 2023
96 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Luís André Morais Mariúba
Coorientador: Gemilson Soares Pontes
Coorientadora: Késsia Caroline Souza Alves
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Imunidade. 2. Mucosa. 3. Vacina. 4. CSP - Proteína
Circunsporozoíto. 5. MSP-3 - Proteína de Superfície do Merozoíto
3. I. Mariúba, Luís André Morais. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

À minha mãe, cujos esforços são incansáveis na busca pela realização de todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por Sua bondade infinita, Sua misericórdia constante e por sempre guiar e abençoar minha vida. Em todos os momentos de dificuldade, Ele ouviu minhas preces e confortou meu coração.

Agradeço imensamente à minha mãe e à minha avó por todo o suporte dado em todas as etapas da minha vida. Mesmo diante das dificuldades encontradas, elas nunca mediram esforços para me proporcionar o apoio necessário para a realização dos meus sonhos. Nunca conseguirei expressar meus profundos agradecimentos a tudo que fizeram por mim.

Aos membros da minha querida família buscapé, às minhas tias e ao meu tio, expresso meu profundo agradecimento pelo apoio inabalável que sempre me proporcionaram. Agradeço infinitamente por constituírem uma sólida rede de apoio, por celebrarem cada uma das minhas conquistas e por não pouparem esforços para me auxiliar ao longo desta árdua jornada acadêmica.

Agradeço à minha querida irmãzinha, Maria Luiza, por tudo o que fez por mim. Talvez você não tenha ideia de quanto contribuiu para a realização deste sonho. Você é minha fonte de força. Farei o máximo para realizar todos os seus sonhos de criança no futuro, sem poupar esforços.

Aos meus orientadores, o Professor Dr. Gemilson Soares Pontes e o Professor André Mariúba, quero expressar minha profunda gratidão por todo o empenho, paciência, dedicação e ensinamento que me proporcionaram durante esses dois anos de mestrado e além. Desde o início da minha jornada científica até a realização deste sonho, vocês estiveram ao meu lado. Meus mais sinceros agradecimentos a ambos.

Agradeço imensamente às minhas queridas amigas que esse mundo científico me proporcionou, Regiane e Josiane, por todo o apoio, pela amizade, pelas conversas e conselhos valiosos, e por serem uma grande fonte de energia nesta vida acadêmica tão intensa e desafiadora. Meus mais profundos agradecimentos por tudo o que fizeram por mim. Agradeço especialmente à Regiane pelos anos de amizade contínua, por sempre me tratar como parte da família e por ser uma companheira incansável nesta jornada.

Agradeço ao Jean e ao Regison pela amizade compartilhada durante a minha jornada acadêmica. Tenho plena confiança de que posso sempre contar com vocês, assim como espero que saibam que também podem contar comigo. Obrigada!

À minhas amigas de longa data Eduarda, Mayara e Myllena, quero expressar minha profunda gratidão por serem sempre uma fonte inestimável de força e incentivo em minha vida. Seja em Jundiá ou Recife, vocês sempre estiveram presentes em minhas conquistas acadêmicas e pessoais. Vocês são fundamentais na minha vida. Muito obrigada!

Agradeço aos meus colegas e parceiros de pesquisa do Laboratório de Virologia e Imunologia do INPA, em especial ao Eduardo, Paulo, Leonardo e Anderson, por compartilharem alegrias e aflições ao longo da minha jornada acadêmica. Também expresso minha gratidão aos colaboradores do prédio de Microbiologia Médica do INPA. Obrigada por toda a assistência prestada e por tornarem meus dias mais leves e divertidos.

À Késsia e à Edilene meus sinceros agradecimentos por todo apoio que me proporcionaram na realização deste trabalho, pelos ensinamentos valiosos e por estarem sempre disponíveis para me ajudar. Muito obrigada!

A todos os colaboradores do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ-AM) que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao Professor Yuri pelo auxílio nos testes de dosagem de citocinas e à Fiocruz de Rondônia pelo auxílio nos testes realizados neste trabalho.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ-AM), expresso minha sincera gratidão por toda a estrutura, apoio técnico e materiais fornecidos, fundamentais para a concretização deste projeto de pesquisa.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), pela estrutura disponibilizada para a realização dos testes *in vivo* no Biotério Central.

Agradeço ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade concedida para ingressar e concluir o curso de mestrado.

Agradeço a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

*“Mesmo as noites totalmente sem estrelas podem anunciar a aurora de uma grande
realização”*

(Martin Luther King)

RESUMO

A malária é a doença parasitária de maior importância do mundo, sendo o *Plasmodium falciparum* responsável pela maioria dos óbitos. Os últimos dados divulgados pela Organização Mundial de Saúde, estima-se que ocorreram 247 milhões casos de malária registrados em 2021 com cerca de 619 mil mortes. Diante dessa preocupante realidade, surge a necessidade de desenvolver estratégias vacinais eficazes e economicamente acessíveis contra a malária. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de resposta imune induzido pela administração via intranasal das proteínas rPfMSP-3 e rPfCSP recombinantes de *P. falciparum* em modelo murino. As proteínas rPfMSP-3 e rPfCSP foram expressas em um hospedeiro bacteriano, posteriormente purificadas utilizando a técnica de Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado (CAMI) e quantificadas por meio do método de Bradford. Para a avaliação da resposta imunológica, camundongos da linhagem BALB/c fêmeas, com idades entre 6 e 8 semanas, foram divididos em 10 grupos contendo 7 animais cada. Estes animais foram imunizados via intranasal com diferentes concentrações das proteínas recombinantes, recebendo duas doses do imunizante (rPfCSP, rPfMSP-3 e PBS 1x) com um intervalo de 14 dias. Amostras de sangue foram coletadas antes da primeira imunização e nos dias 14 e 28 para avaliação da resposta imune induzida. A produção de anticorpos anti-rPfMSP-3 e anti-rPfCSP foi analisada por meio de ensaio imunoenzimático indireto e teste de invasão do merozoíto, enquanto o perfil sérico de citocinas foi avaliado utilizando citometria de fluxo. Os resultados deste estudo revelaram que as proteínas recombinantes utilizadas apresentam um perfil imunogênico, com destaque para a rPfCSP que demonstrou maior imunogenicidade no estudo. A rPfMSP-3 também induziu uma resposta humoral significativa e os anticorpos anti-rPfMSP-3 foram capazes de inibir a invasão do merozoíto nas hemácias. Esses dados são promissores e podem servir como base para o desenvolvimento de novas estratégias vacinais contra a malária, particularmente aquelas que exploram a administração mucosal em modelos murinos, sem a necessidade de adjuvantes.

Palavras-chave: Imunidade; Mucosa; Vacina; CSP; MSP3.

ABSTRACT

Malaria is the most important parasitic disease in the world, with *Plasmodium falciparum* responsible for the majority of deaths. The latest data released by the World Health Organization estimates that there were 241 million cases of malaria registered in 2020, with around 627 thousand deaths. In the face of this alarming reality, there is a need to develop effective and economically accessible vaccine strategies against malaria. The objective of this study was to evaluate the immune response profile induced by intranasal administration of recombinant rPfMSP-3 and rPfCSP proteins from *P. falciparum* in a murine model. The rPfMSP-3 and rPfCSP proteins were expressed in a bacterial host, subsequently purified using the Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) technique and quantified using the Bradford method. To evaluate the immunological response, female BALB/c mice, aged between 6 and 8 weeks, were divided into 10 groups containing 7 animals each. These animals were immunized intranasally with different concentrations of recombinant proteins, receiving two doses of the immunizer (rPfCSP, rPfMSP-3, and PBS 1x) with an interval of 14 days. Blood samples were collected before the first immunization and on days 14 and 28 to evaluate the induced immune response. The production of anti-rPfMSP-3 and anti-rPfCSP antibodies was analyzed using indirect enzyme immunoassay and merozoite invasion test, while the serum cytokine profile was evaluated using flow cytometry. The results of this study revealed that the recombinant proteins used have an immunogenic profile, with emphasis on rPfCSP, which demonstrated greater immunogenicity in the study. rPfMSP-3 also induced a significant humoral response, and anti-rPfMSP-3 antibodies were able to inhibit merozoite invasion into red blood cells. These data are promising and could serve as a basis for the development of new malaria vaccine strategies, particularly those that explore mucosal administration in murine models, without the need for adjuvants.

Keywords: Immunity; Mucosal; Vaccine; CSP; MSP3.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica mundial da infecção por plasmódio.	15
Figura 2: Mapa de risco da Malária nos estados brasileiros	16
Figura 3: Ciclo de vida do plasmódio	18
Figura 4: Invasão do Merozoíto nas hemácias do hospedeiro.	19
Figura 5: As principais respostas imunológicas em cada ciclo do Plasmodium spp.	21
Figura 6: Principais vacinas estudadas presentes no ciclo de vida do plasmódio.....	27
Figura 7: Estrutura completa da Proteína de Superfície do Merozoíto 3 (MSP-3) e sequência da vacina GMZ2	29
Figura 8: As vacinas RTS, S/AS01 e R21/Matrix-M.....	34

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALUM – Hidróxido de Alumínio

AMA-1 - Antígeno 1 da Membrana Apical

BALT - Tecido linfoide associado ao brônquio

BSA – Albumina de Soro Bovino

CAMI – Cromatografia com metal imobilizado

CBA – Cytometric Bead Array

CDC - Centro de controle e prevenção de doenças

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CSP – Proteína Circunsporozoíto

DAMPS – Padrões Moleculares Associados ao dano

DCS – Células Dendríticas

DO – Densidade Óptica

EBA 175 - Antígeno 175 de ligação ao eritrócito

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

GALT – Tecido linfoide associado ao intestino

GLURP – Proteína Rica em Glutamato

GPI - Âncora glicosilfosfatidilinositol

H2SO4 – Ácido Sulfúrico

ICAM 1 – Molécula de adesão intercelular 1

IFN- γ – Interferon gama

IgG – Imunoglobulina G

IL - Interleucina

INPA – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

kDa - Kilo Dalton

KSC – Células de Kupffer

LPS – Lipopolissacarídeos

LSECs – Células Endoteliais Sinusoidais do Fígado

MALT – Tecido linfóides associados à mucosa

MLP – Monofosforil Lipídio

MSP-3 – Proteína de Superfície do Merozoíto 3

MSPs – Proteínas de Superfície do Merozoíto

NALT – Tecido linfoide associado à nasofaringe

NK- Células Natural Killers

NLRs – Receptores do tipo NOD

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

PAMPS – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBS – Tampão fosfato-salino

PfCSP – Proteína Circunsporozoíta de *Plasmodium falciparum*

PfMSP-3 – Proteína de Superfície do Merozoíto 3 de *Plasmodium falciparum*

PRRs – Receptores de Reconhecimento Padrão

SIVEP – Sistema de Informação e Vigilância Epidemiológica

TLRs – Receptores tipo TOLL

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TSP – Trambospondina

VCAM-1 – Molécula de adesão celular vascular 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Epidemiologia da Malária	14
2.2 Ciclo de vida do plasmódio	17
2.3 Resposta imunológica na malária	20
2.3.1 Ciclo pré-eritrocítico	22
2.3.2 Ciclo eritrocítico	23
2.4 Candidatos vacinais.....	26
2.4.1 Proteína de Superfície do Merozoíto 3	28
2.4.2 Proteína circunsporozoíta.....	30
2.5 Vacina RTS, S/AS01.....	32
2.6 Vantagens da imunização de mucosa	35
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. CAPÍTULO 1.....	39
5. CONCLUSÃO GERAL	76
6. REFERÊNCIAS	77
7. ANEXOS	96

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença parasitária altamente letal, com 247 milhões de casos e 619 mil mortes relatadas em 2021 principalmente entre crianças menores de 5 anos, representando 80% de todos os óbitos nesse grupo (OMS, 2021). A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo o *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium falciparum* as principais espécies que infectam os seres humanos, colocando aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas em risco de infecção (OMS, 2021).

A transmissão da malária ocorre por meio da picada de mosquitos fêmeas infectados do gênero *Anopheles* (COX, 2010). As principais espécies causadoras de infecções por malária no mundo são o *P. falciparum* e o *P. vivax*. No entanto, outras espécies também foram identificadas como capazes de infectar seres humanos, incluindo o *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e o *Plasmodium knowlesi* (SATO, 2021; TUTEJA, 2017).

Por muitos anos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) dedicou esforços à erradicação da malária, incentivando pesquisas para o desenvolvimento de vacinas. No entanto, esse processo enfrenta desafios significativos, incluindo a diversidade antigênica do parasita, a curta duração da memória imunológica e a seleção da via de imunização adequada (GREENWOOD; TARGETT, 2009).

A partir de 2021, a OMS recomendou o uso da vacina RTS, S/AS01 em crianças que residem em regiões de alto risco para infecção por malária, com o objetivo de reduzir o impacto global dessa doença nesse grupo de risco (Relatório Mundial da Malária, 2021). No entanto, o uso da vacina em conjunto com outras medidas profiláticas demonstrou uma eficácia limitada, alcançando 39% de proteção contra novos casos e 29% de prevenção contra formas graves de malária causadas pelo *P. falciparum* em indivíduos imunizados (TINTO et al., 2019). A vacina RTS, S tem como alvo a proteína circunsporozoíta (CSP) do *P. falciparum*, uma proteína de superfície dos esporozoítos, sendo uma das principais candidatas vacinais devido à sua notável capacidade imunogênica (DE ALMEIDA et al., 2022).

A proteína circunsporozoíta (CSP) é a principal proteína de superfície dos esporozoítos, encontrada em todas as espécies de *Plasmodium* (ZHAO et al., 2016). No caso do *P. falciparum*, a CSP se distingue pela presença de um domínio central repetitivo altamente imunogênico. Esta proteína desempenha um papel crucial na invasão e inoculação dos esporozoítos nos hepatócitos, além de estar envolvida no desenvolvimento

dos estágios do ciclo exo-eritrocítico (TEWARI et al., 2002; THATHY et al., 2002). Várias estratégias promissoras foram implementadas no desenvolvimento de possíveis formulações vacinais, explorando a vasta rede de proteínas encontradas no ciclo de vida do plasmódio e empregando diversos tipos de adjuvantes para melhorar e potencializar a resposta imune ao antígeno (CECH et al., 2011; PRATT-RICCIO et al., 2017).

Os antígenos que surgem como promissores para a malária clinicamente sintomática são encontrados no estágio eritrocitário do parasita. Entre esses, as Proteínas de Superfície do Merozoíto (MSPs) representam uma classe de proteínas altamente promissoras para formulações vacinais (BEESON et al., 2016). Dentre as MSPs, os antígenos MSP-1, MSP-2 e MSP-3 são os mais bem caracterizados na literatura, sendo as principais MSPs capazes de induzir uma resposta imune no hospedeiro, uma vez que estão diretamente expostas aos anticorpos circulantes (COWMAN et al., 2022; LIN et al., 2016; RICHARDS et al., 2013; WOEHLBIER et al., 2006).

Estudos soroepidemiológicos demonstraram níveis de anticorpos específicos contra a MSP-3 associados à proteção contra a malária, além de evidenciarem a capacidade desses anticorpos de inibir o parasita *in vitro* (BOYLE et al., 2015; OEUVRAY et al., 1994b). O potencial da MSP-3 em estimular o sistema imune por meio da inibição celular dependente de anticorpos representa um mecanismo intrigante para a comunidade científica envolvida no estudo da imunogenicidade de antígenos maláricos (DESHMUKH et al., 2018). A proteína MSP-3, que está presente na superfície do merozoíto de *P. falciparum*, está envolvida em uma complexa interação proteica com MSP-1 e MSP-7. A MSP-3 possui um peso molecular aproximado de 48 kDa e sua estrutura apresenta porções N e C terminais, bem como domínios de aminoácidos (DESHMUKH et al., 2018). Uma vacina utilizando a proteína MSP-3 como alvo, GMZ22, recentemente alcançou a fase 2 de ensaios clínicos, o que demonstra a segurança e a imunogenicidade em suas fases iniciais. Isso evidencia o alto poder imunogênico e promissor da proteína MSP-3 como alvo do estágio eritrocítico (ESEN et al., 2009; JEPSEN et al., 2013).

Apesar dos avanços na pesquisa e da aprovação da vacina RTS,S/AS01 para uso em áreas endêmicas de malária, há a necessidade de desenvolver uma segunda vacina capaz de estimular eficazmente o sistema imunológico contra a infecção por *P. falciparum*, visto que é a espécie mais perigosa para a população. Entender como o sistema imunológico responde a antígenos encontrados em diferentes estágios de vida do parasita é essencial para criar novas vacinas contra a malária. Portanto, o principal

objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de resposta imune induzido pela administração via intranasal das proteínas MSP-3 e CSP recombinantes de *P. falciparum* em modelo murino.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia da Malária

A infecção malárica é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, o parasita é transmitido por meio da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectado no momento do repasto sanguíneo (PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006a). O gênero *Plasmodium* possui mais de 170 espécies, entretanto, as espécies comumente identificadas causadoras de malária em humanos são *P. falciparum*, com alta prevalência no continente africano, principalmente em crianças e imunocomprometidos, *P. vivax* com maior incidência na Ásia e Américas, *P. ovale* e *P. malarie* são consideradas espécies com baixa carga global, sendo principalmente casos oriundos do continente africano e a espécie recentemente identificada causadora de malária humana *P. knowlesi*, contudo esta espécie está mais associada a infecções zoonóticas, com transmissão de macacos para humanos no sudoeste asiático (LOZANO et al., 2021; MILNER, 2018). *P. falciparum* e *P. vivax* são as principais espécies infectantes em seres humanos e juntas expõem milhares de pessoas ao risco da infecção por malária (OMS, 2021).

A malária é uma das doenças parasitárias de maior impacto na saúde pública e exerce um efeito negativo significativo no desenvolvimento econômico global, especialmente em regiões tropicais e subtropicais em desenvolvimento (KAR et al., 2014). De acordo com os dados mais recentes do boletim epidemiológico da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2021, foi relatado que em 2021 ocorreram aproximadamente 247 milhões de casos de malária, com uma estimativa de 619 mil óbitos atribuídos à infecção malárica.

Quase metade da população mundial vive em risco de infecção pelo *Plasmodium* (figura 1). No entanto, é importante destacar que crianças africanas com menos de cinco anos de idade e indivíduos imunocomprometidos constituem os principais grupos populacionais com maior suscetibilidade à infecção por malária. Isso é particularmente relevante no caso das crianças, que representam aproximadamente 80% de todos os óbitos atribuídos ao *P. falciparum*. (MIRZOHREH et al., 2022; OMS, 2020).

O *P. falciparum* é o principal responsável pelos altos índices de mortalidade mundial, sendo responsável pela grande maioria dos óbitos relacionados à malária no continente africano. De fato, essa espécie é responsável por aproximadamente 99% de óbitos no continente (SONKO et al., 2014; WHITE, 2022). Embora a infecção pelo *P. vivax* raramente progride para fatalidade, é importante ressaltar que tanto a infecção pelo *P. falciparum* quanto por *P. vivax* podem levar ao desenvolvimento de complicações graves. Um exemplo notável é a anemia severa, uma condição debilitante que pode resultar das infecções de ambas as espécies. Em casos mais graves, ocasionados pela infecção por *P. falciparum*, existe o risco de desenvolvimento da malária cerebral, uma complicação neurológica fatal associada a essa espécie de parasita (LUZOLO; NGOYI, 2019; QUINTERO et al., 2011).

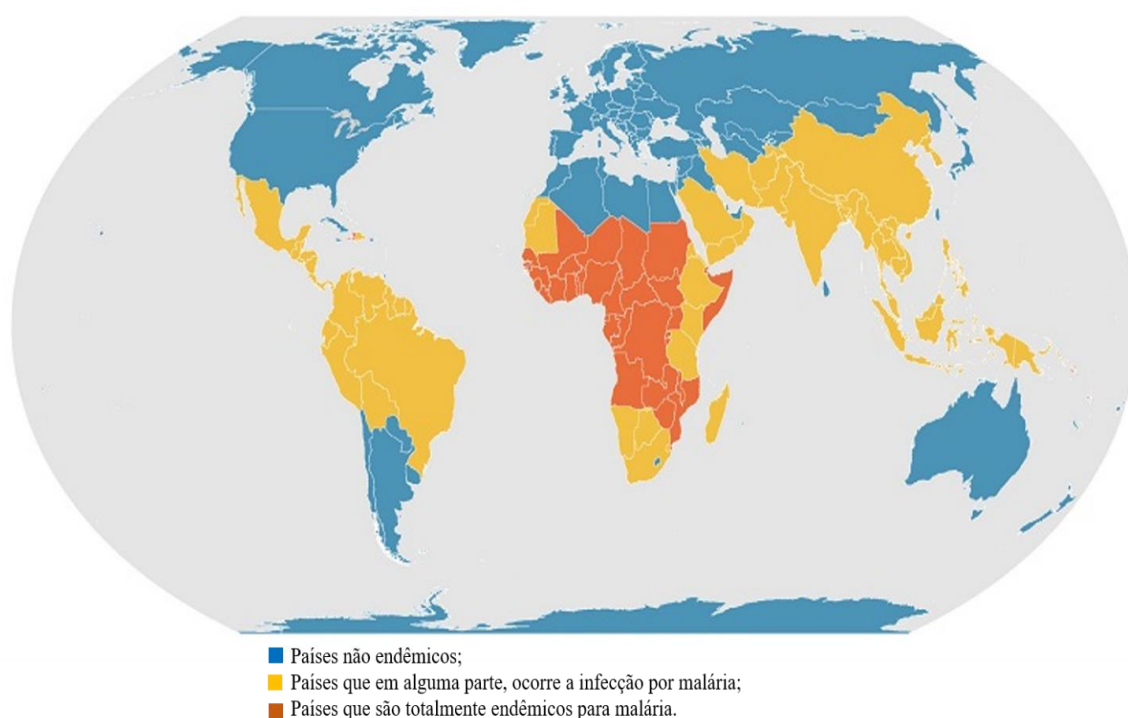
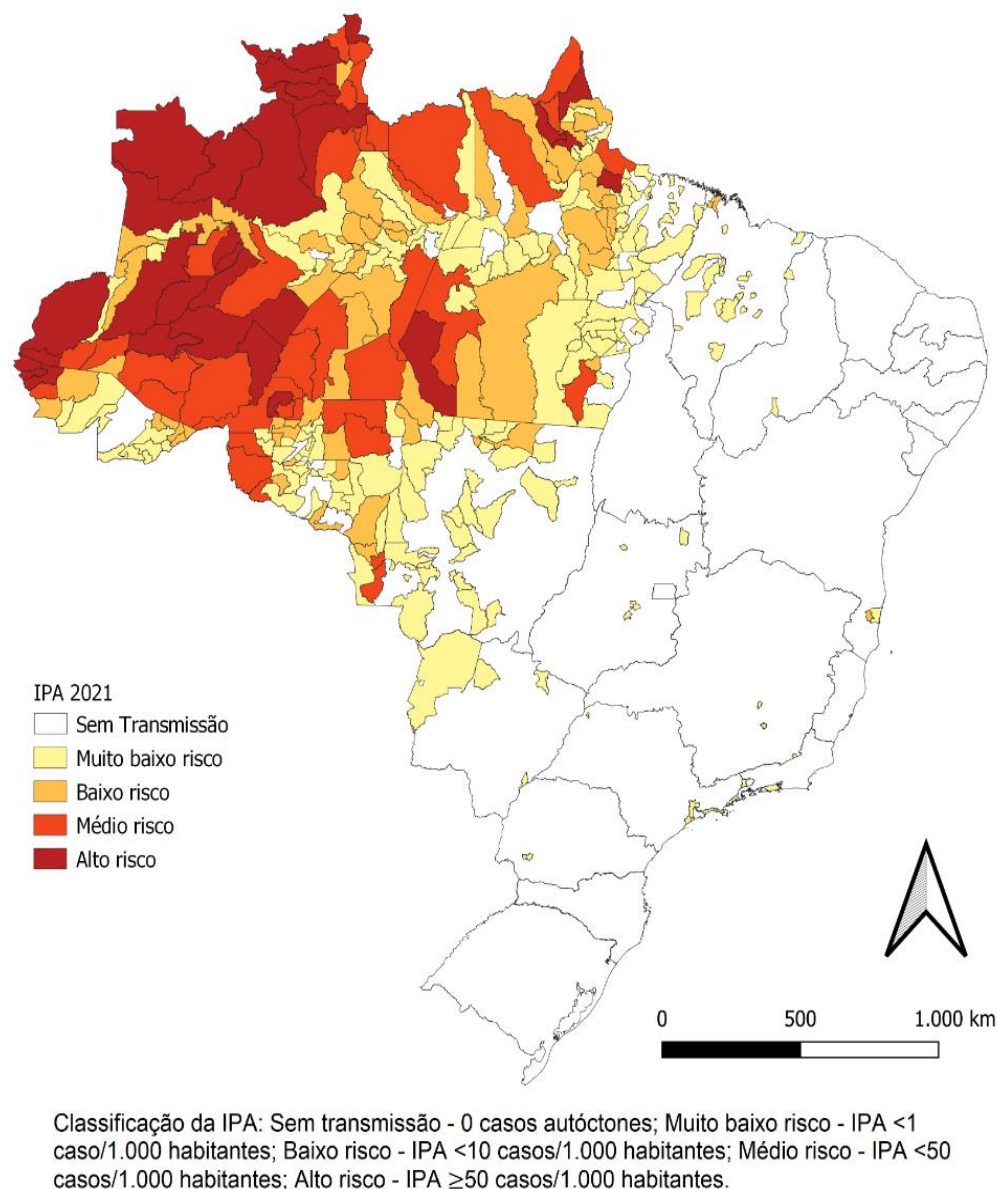


Figura 1: Distribuição geográfica mundial da infecção por plasmódio.

Fonte: CDC, 2020.

No Brasil, a espécie mais prevalente é o *P. vivax*, sendo responsável por cerca de 83% dos casos notificados de malária, seguido de *P. falciparum* com 17% dos casos notificados (Brasil, 2021). Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), no ano de 2021, houve aproximadamente 145.205 mil casos maláricos no Brasil,

apresentando uma queda de 4,1% dos casos quando comparados ao boletim epidemiológico do ano anterior. Estima-se que grande parte desses casos relatados no Brasil sejam de casos considerados autóctones (OPAS, 2021). A distribuição endêmica no país ocorre principalmente na região da Amazônia Legal, que abrange os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e Mato Grosso (BEZERRA et al., 2020; HERMES et al., 2013). Na figura 2, pode-se observar os principais estados endêmicos para malária no Brasil.



Data de atualização dos dados: 05 de julho de 2022. Fonte: Sivep-Malária/SVS/MS e Sinan.

Figura 2: Mapa de risco da Malária nos estados brasileiros

Fonte: Sivep-Malária (2022).

2.2 Ciclo de vida do plasmódio

O ciclo do parasita é complexo e constituído de multiestágios, apresenta duas etapas principais: a fase assexuada no homem e a fase sexuada presente no mosquito (VENUGOPAL et al., 2020). Cada estágio de vida do plasmódio apresenta proteínas, estruturas, morfologias e funções distintas ao longo do ciclo, o que justifica a grande complexidade em desenvolver vacinas e tratamentos, em decorrência das adversidades encontradas no ciclo que auxiliam o parasita a fugir da resposta imune do hospedeiro (FLORENS et al., 2002; SINGH et al., 2009).

O parasita requer a expressão de proteínas de superfície específicas para a sobrevivência em ambos os hospedeiros. Essas proteínas possuem funções distintas e são essenciais para garantir a sobrevivência intracelular e extracelular do parasita, além de participarem da invasão das células no estágio hepático, sanguíneo e estágio sexual (ACHARYA et al., 2017). A expressão diversificada de proteínas durante o ciclo de vida do plasmódio consiste em estratégias promissoras para o desenvolvimento de formulações vacinais imunogênicas (FLORENS et al., 2002). O ciclo se inicia por meio da picada do mosquito fêmea *Anopheles* infectado, os mosquitos inoculam os esporozoítos via glândulas salivares (figura 3) (GRAUMANS et al., 2020). Os esporozoítos de *P. falciparum* desencadeiam a esquizogonia imediata, diferentemente dos esporozoítos de *P. vivax* que podem ou não desencadear a esquizogonia imediata ou esquizogonia tardia (TUTEJA, 2007).

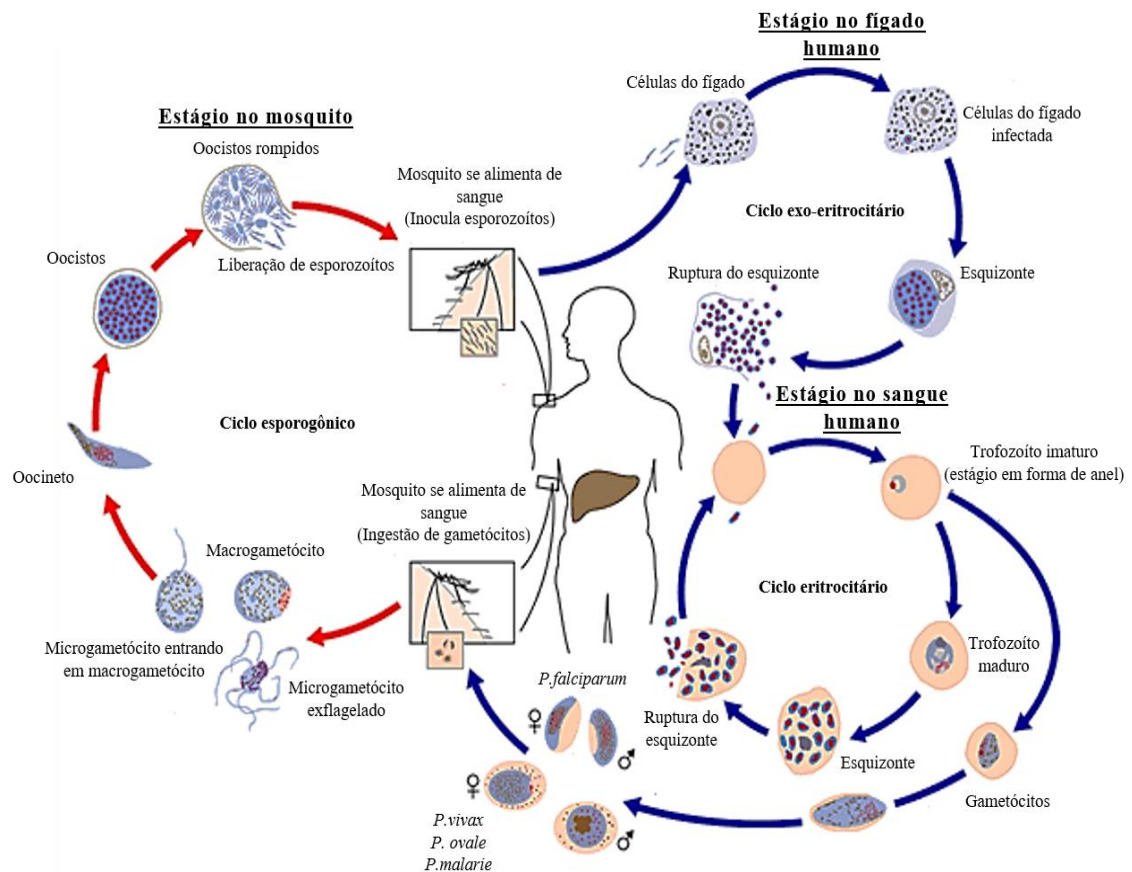


Figura 3: Ciclo de vida do plasmódio no hospedeiro vertebrado, homem e no hospedeiro invertebrado, mosquito *Anopheles* sp.

Fonte: CDC, 2020.

Após os esporozoítos serem inoculados, esses atravessam o tecido epitelial até chegarem aos vasos sanguíneos, na circulação sanguínea, movimentam-se para o fígado, onde invadem os hepatócitos a partir da interação de diferentes proteínas (GARCIA; PUENTES; PATARROYO, 2006). Dentre elas, destaca-se a participação ativa da proteína do circunsporozoíta (CSP), presentes nos esporozoítos que interagem com diferentes proteoglicanos na superfície das células hepáticas, facilitando a invasão nessas células (EJIGIRI; SINNIS, 2009; HERRERA et al., 2015).

Dentro dos hepatócitos, os esporozoítos mantêm-se viáveis por um período que varia de 9 a 16 dias, durante o qual ocorre uma fase de replicação assexuada conhecida como esquizogonia exoeritrocítica. É nesse estágio que os esporozoítos se multiplicam, originando os esquizontes hepáticos (GRAEWE et al., 2012). Os merozoítos são formados após o rompimento dos esquizontes (SNOW et al., 1999). Dentro dos hepatócitos, cada merozoíto gera milhares de outros merozoítos, e cada merozoíto

liberado tem a capacidade de invadir um eritrócito após a saída do estágio hepático, resultando em um aumento exponencial no número de parasitas (BEESON et al., 2016; GAZZINELLI et al., 2014; PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006).

Os merozoítos infectantes adentram os eritrócitos circulantes por meio de um processo de invasão constituído por diferentes fases: (i) ocorre o reconhecimento e aderência reversível na membrana eritrocitária; (ii) surge o vacúolo parasitóforo, a partir da ligação irreversível da reorientação e formação das junções das extremidades apical do merozoíto; (iii) ocorre a junção e invaginação da membrana eritrocitária em torno do merozoíto, que está associada a remoção da superfície do merozoíto; (iv) ocorre o fechamento das membranas do eritrócito ao redor do merozoíto para que o parasita ocupe a porção interior da célula e seja circundado pelo vacúolo parasitóforo (figura 4) (COWMAN; CRABB, 2006; KOCH; BAUM, 2016).

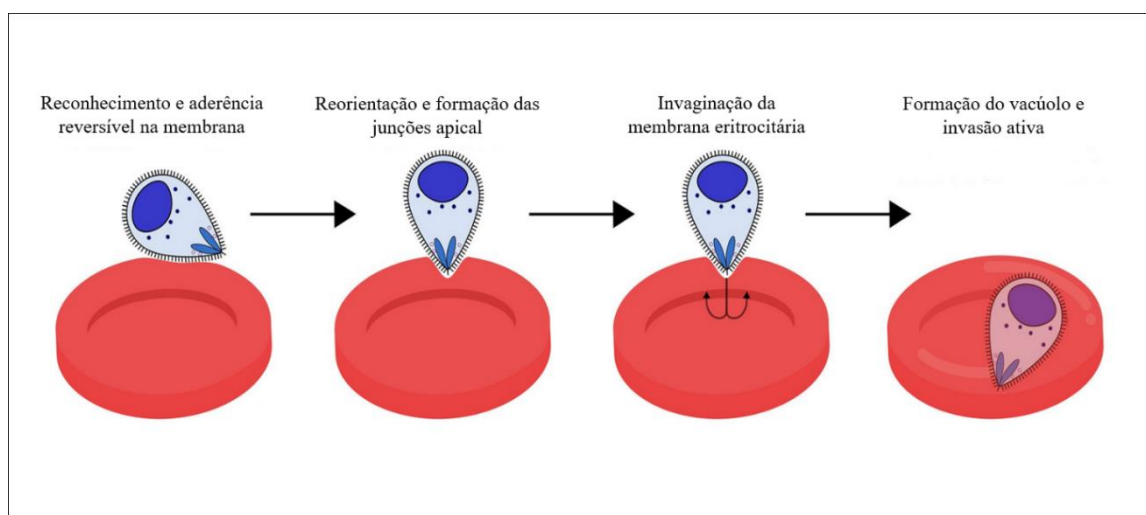


Figura 4: Invasão do Merozoíto nas hemácias do hospedeiro.

Fonte: BOYLE; WILSON; BEESON, 2013

Esse reinício ocorre por meio da lise de hemácias, esse processo de replicação e liberação de novos merozoítos coincide com o surgimento dos sintomas da doença (GAZZINELLI et al., 2014a; MILLER et al., 2013). Em *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, esse ciclo repetitivo de invasão, multiplicação, liberação e invasão contínua tem período de 48 h (TUTEJA, 2017). Entretanto, alguns esporozoítos da espécie de *P. vivax* podem não se desenvolver e permanecer em latência por meses e ou anos, e a qualquer momento sofrer a ativação da esquizogonia exoeritrocítica e dar início ao novo ciclo eritrocítico, processo chamado de hipnozoíto (HULDEN; HULDEN, 2011).

Alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos (machos e fêmeas), estes são ingeridos pelos anofelinos durante seu repasto sanguíneo, iniciando o ciclo sexuado do parasita no mosquito. Dentro do tubo digestivo do parasito, os gametas unem-se formando um oocineto, que atravessam o epitélio intestinal do mosquito diferenciando-se em oocisto, iniciando o processo replicativo no mosquito. Os oocistos são rompidos e ocorre a liberação de esporozoítos que invadem a hemolinfa que por meio da corrente circulatória, migram para as glândulas salivares dos anofelinos e permanecem até que ocorra uma nova inoculação no hospedeiro vertebrado (VALE; AGUIAR; GOMES, 2014).

2.3 Resposta imunológica na malária

A resposta imune à malária é um processo complexo e multifacetado que envolve a interação entre o parasita e o sistema imunológico do hospedeiro (BELACHEW, 2018). A resposta imune pode ser adaptada de forma específica para cada estágio de vida do parasita, e essa resposta é composta por uma complexa rede de mecanismos que ainda não foram completamente compreendidos, em grande parte devido à complexidade da infecção, que envolve múltiplos estágios, diversas formas do parasita e uma considerável variabilidade genética (figura 5). Além disso, a incapacidade do sistema imunológico em controlar a rápida replicação do parasita e os efeitos imunopatológicos resultantes de inflamação excessiva também desempenham papéis significativos na limitação de uma resposta eficaz contra o parasita (DEROOST et al., 2016; HISAEDA; YASUTOMO; HIMENO, 2005; TAKALA; PLOWE, 2009).

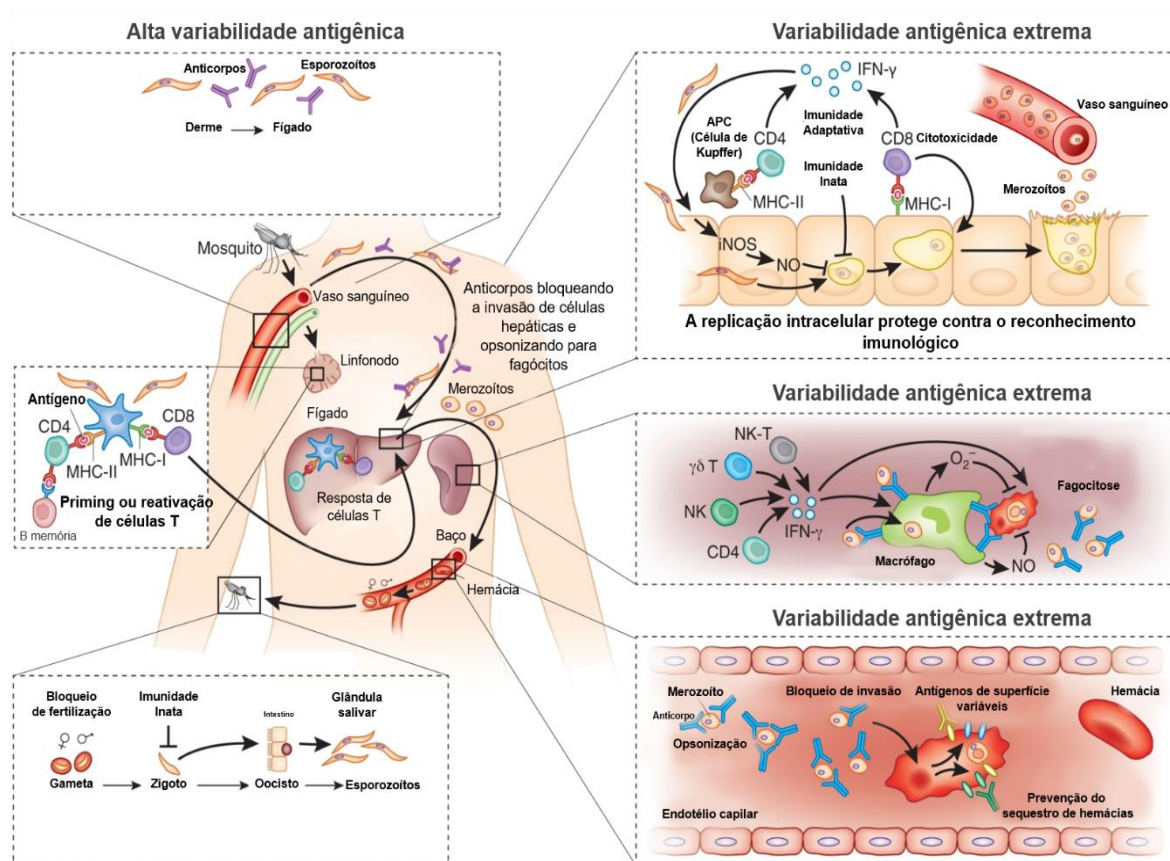


Figura 5: As principais respostas imunológicas em cada ciclo do *Plasmodium* spp.

Fonte: (RILEY; STEWART, 2013)

A resposta imune do hospedeiro, é dividida em dois componentes: o sistema imune inato e o adaptativo. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa, as principais células imunes responsáveis por essa resposta imediata são os neutrófilos, monócitos, macrófagos e células NK, que reagem prontamente quando estimulados por antígenos estranhos e desencadeiam a resposta imune adaptativa (MARSHALL et al., 2018).

Em relação a imunidade naturalmente adquirida, os indivíduos que estão diretamente expostos a suscetíveis infecções por malária, apresentam maior probabilidade de desenvolver esse tipo de proteção, apresentando baixa parasitemia ou até mesmo ausência de sintomas clínicos (DOOLAN; DOBAÑO; BAIRD, 2009; LANGHORNE et al., 2008). Contudo, até chegar a esse tipo de imunidade, envolve diferentes tipos de mecanismo imunológico, sendo um processo complexo e sensível, influenciado principalmente pelas altas taxas de transmissão nas áreas endêmicas para malária e pela idade dos indivíduos expostos, crianças acima de 5 anos e adultos residentes em regiões endêmicas estão mais aptos a adquirir a proteção imunológica (DOOLAN, 2011).

Cada estágio do desenvolvimento do parasita exhibe uma diversidade de antígenos que provocam respostas imunes específicas (BANSAL; KUMAR, 2018). A trajetória dos esporozoítos da pele até o fígado envolve uma migração complexa e desencadeia uma resposta imunológica nos gânglios linfáticos adjacentes, os quais são responsáveis pela drenagem da área infectada (YAMAUCHI et al., 2007).

2.3.1 Ciclo pré-eritrocítico

A princípio, era comum a suposição de que os esporozoítos inoculados na derme migravam rapidamente do local de inoculação, e que as interações significativas entre o hospedeiro e o parasita só se iniciassem após a penetração dos esporozoítos nos hepatócitos e o início do seu desenvolvimento intracelular (SINNIS; ZAVALA, 2012). Contudo, têm-se revelado que os esporozoítos podem permanecer na derme por um período prolongado, desencadeando uma resposta imunológica nos gânglios linfáticos adjacentes responsáveis pela drenagem (CHAKRAVARTY et al., 2007; YAMAUCHI LUCY M. et al., 2007).

Estudos de microscopia intravital mostraram que os esporozoítos têm um movimento aleatório na pele até se encontrarem com células endoteliais dos vasos sanguíneos ou do sistema linfático e migrarem para o fígado a fim de seguir com o seu ciclo de vida (AMINO et al., 2006; VANDERBERG; FREVERT, 2004). Além disso, uma parte dos esporozoítos permanece na pele, evitando evolução para estágios que afetariam as células sanguíneas. Esse processo também induz a ativação de neutrófilos e monócitos para neutralizar os esporozoítos na derme (HOPP; SINNIS, 2015; MAC-DANIEL et al., 2014).

A trajetória dos esporozoítos até o seu destino final, o fígado, envolve uma série de mecanismos de barreiras celulares, esse processo é mediado principalmente por meio das atividades de fibroblastos dérmicos, células endoteliais, células endoteliais sinusoidais do fígado (LSECs) e células de Kupffer (KCs) (TAVARES et al., 2013). Essas células, apresentam capacidade de fagocitose e expressam tanto moléculas de MHC de classe I e II e moléculas coestimulatórias, como CD86. Além disso, também estimulam a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1 (BHANDARI et al., 2020).

As células dendríticas (DCs) são consideradas as células apresentadoras de antígenos mais eficientes do organismo, devido a sua ação fagocítica e apresentação de antígenos em moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e II, ativando assim células T CD8 ou T CD4 naives (RANDOLPH; ANGELI; SWARTZ,

2005). Presentes em todas as fases do ciclo do *Plasmodium* no hospedeiro humano, essas células reconhecem antígenos na superfície dos esporozoítos, incluindo a proteína mais abundante do esporozoítos, a CSP (AMORIM et al., 2016; MAUDUIT et al., 2012). A resposta imune na fase pré-eritrocítica está diretamente relacionada à exposição dos esporozoítos em circulação e aos hepatócitos infectados. Anticorpos contra esporozoítos livres e a proteína CSP desempenham um papel crucial na prevenção da invasão dos hepatócitos (BELACHEW, 2018).

A eliminação eficaz dos hepatócitos infectados pelos esporozoítos depende das células T CD8 citotóxicas (CTLs) (RADTKE et al., 2015). Nesse contexto, as citocinas interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são fundamentais, sendo secretadas tanto por células T CD8 quanto por células T CD4. As células T CD4+ induzem uma resposta predominantemente pró-inflamatória, através da indução de interleucina-12 (IL-12), modulando uma resposta imune para o perfil Th1 (BUTLER; SCHMIDT; HARTY, 2010; NGANOU-MAKAMDOP et al., 2012). Portanto, os linfócitos T citotóxicos, atuam liberando citocinas, tal como IFN- γ e o TNF- α , que atuam ativando células fagocíticas, estimulando a inflamação local e induzindo a ação apoptótica com a finalidade de eliminar as células infectadas com esporozoítos (TORRE; SPERANZA; MARTEGANI, 2002).

Em resumo, a resposta imune durante o estágio pré-eritrocítico do parasita é caracterizada pela proeminência das células dendríticas, que têm um papel crucial na apresentação de antígenos. Simultaneamente, as células T CD8+ são importantes na identificação e eliminação de células hepáticas infectadas. Esse processo é influenciado pela exposição aos esporozoítos e pela indução da resposta humoral, marcando uma fase essencial na defesa contra a malária.

2.3.2 Ciclo eritrocítico

Alguns esporozoítos podem evadir dos mecanismos imunológicos encontrados na fase pré eritrocítica, os esporozoítos sobreviventes se replicaram até que ocorra a lise hepática dando origem a milhares de merozoítos na circulação sanguínea (CIRIMOTICH et al., 2010; GOMES et al., 2016). Na circulação sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos, que apresentam uma superfície com diferentes proteínas, evitando o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa gerada especificamente aos esporozoítos (BUCŞAN; WILLIAMSON, 2020). Dentro dos eritrócitos, os merozoítos formam um vacúolo parasitóforo, onde crescem e se multiplicam assexuadamente até que

ocorra novamente a lise celular, durante esse processo de multiplicação e invasão de novos eritrócitos ocorre os sintomas clínicos da malária no hospedeiro (PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006b).

Como relatado anteriormente, as células T CD8⁺ apresentam uma importante função imunológica no ciclo pré-eritrocitário, através da sua atividade citotóxica. Contudo, acredita-se que esses linfócitos apresentem baixa contribuição no controle da fase sanguínea da infecção malárica, devido à ausência de MHC de classe I nos eritrócitos (KURUP; BUTLER; HARTY, 2019). Entretanto, o parasita, através do vacúolo parasitóforo, apresenta antígenos na superfície das hemácias infectadas, sendo esses antígenos reconhecidos pelas células B, estimulando assim a produção de anticorpos (COWMAN et al., 2016).

A imunidade a infecção causada pelo parasita no estágio sanguíneo é mediada principalmente pela presença IFN- γ que atua ativamente na coordenação entre o sistema imune inato e adaptativo, envolvendo DCs, células NK e linfócitos T auxiliares CD4⁺ e linfócitos B (MANDALA et al., 2021). Em relação a resposta imune adaptativa, os monócitos desempenham um papel significativo na produção de citocinas pró-inflamatórias, através da sua ação fagocítica (XUAN et al., 2023).

Os receptores tipo Toll (TLRs) e os Receptores tipo Nod (NLRs) representam componentes fundamentais da imunidade inata (KAWAI; AKIRA, 2010). Durante a infecção malárica, PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) e DAMPs (Padrões Moleculares Associados ao Dano) e os PRRs (Receptores de Reconhecimento Padrões), esses estão intrinsicamente ligados ao reconhecimento desses receptores (GAZZINELLI et al., 2014).

As PAMPs, desencadeiam uma resposta inflamatória, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Os principais PAMPs identificados na infecção malárica, são as âncoras GPI, a hemozoina, RNA e DNA do parasita (DOBBS; CRABTREE; DENT, 2020). Essa forte resposta inflamatória no ciclo sanguíneo é responsável pelos principais sintomas maláricos no hospedeiro, com a ocorrência de febres recorrentes, calafrios, dores de cabeça e mal-estar (GOWDA; WU, 2018).

A hemozoína, formada através da degradação da hemoglobina pelo parasita no ciclo sanguíneo, apresenta-se como um potente imunoestimulador do sistema imune através da ativação das DCs por meio do reconhecimento do DNA do parasita via TLR9 (LIEHL; MOTA, 2012). As âncoras GPI são moléculas que ancoram proteínas de superfície a membrana do *Plasmodium* que estão envolvidas na invasão aos eritrócitos,

essas ancoras são reconhecidas principalmente pelos receptores TLR2 e TLR4, e a GPI se ligam especificamente ao receptor TLR2, induzindo a produção de óxido nítrico em células endoteliais. Essa ligação resulta em apoptose de células infectadas e também na indução de citocina pró-inflamatórias por macrófagos (KRISHNEGOWDA et al., 2005; ZHU et al., 2011; ZHU; KRISHNEGOWDA; GOWDA, 2005).

As células Natural Killers (NK) têm uma função crucial em todo o ciclo de vida do parasita. Em condições normais, essas células estão abundantemente presentes no sangue, baço, medula óssea e fígado (BONANNI et al., 2019). Como são linfócitos citotóxicos significativos, as células NK desempenham um papel benéfico tanto na fase inicial quanto durante o ciclo sanguíneo do parasita, contribuindo para o controle da infecção malárica, e cooperam com as células mieloides para a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IFN- γ e TNF- α . (WOLF; SHERRATT; RILEY, 2017). O IFN- γ , em particular, desempenha um papel fundamental na ativação da resposta Th1, estimulando os macrófagos e aumentando sua capacidade fagocítica. Isso também resulta na produção de espécies reativas de oxigênio, que são prejudiciais para a sobrevivência do parasita, consequentemente, fortalecendo a resposta imune adaptativa (STEVENSON; RILEY, 2004).

No entanto, uma resposta pró-inflamatória excessiva pode ser prejudicial ao hospedeiro, levando a problemas imunopatológicos (CLARK et al., 2006). Nesse sentido, as células NK também têm a capacidade de induzir a produção da citocina anti-inflamatória reguladora IL-10, que pode atuar na prevenção de complicações graves da doença, como a malária cerebral (MARTINEZ-ESPINOSA; SERRATO; ORTIZ-QUINTERO, 2022)

Em contraste com a fase pré-eritrocítica, onde a resposta celular é dominante, na fase eritrocítica, o controle da infecção é principalmente mediado pela imunidade humoral, envolvendo a produção de anticorpos (LIMA-JUNIOR; PRATT-RICCIO, 2016). A ativação dos anticorpos estimula as células B a secretar anticorpos IgG altamente específicos e de alta afinidade direcionados ao parasita (DUPS; PEPPER; COCKBURN, 2014). Esses anticorpos desempenham um papel crucial na eliminação do parasita na fase tardia da infecção. Além disso, as citocinas produzidas pelas células T específicas durante o ciclo eritrocítico podem influenciar os tipos de anticorpos produzidos, moldando assim o perfil da resposta imunológica mediada por anticorpos (KURUP; BUTLER; HARTY, 2019)

Portanto, a interação sinérgica entre a imunidade celular e humoral durante os dois principais ciclos da infecção malárica no hospedeiro mostra como o sistema imunológico responde ao parasita. Compreender esses mecanismos é essencial para o desenvolvimento de fármacos ou vacinas que possam ajudar a proteger contra a doença.

2.4 Candidatos vacinais

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra malária persiste como um desafio para a comunidade científica há muitos anos (BASU; SAHI, 2017; HILL, 2011). O ciclo do plasmódio proporciona o aparecimento de proteínas com funções distintas que atuam nos diferentes ciclos do parasita. As expressões dessas proteínas são necessárias para a sobrevivência intracelular e extracelular do parasita, atuam nos multiestágios do ciclo do *Plasmodium*, como invasão aos hepatócitos e hemácias, além de participar da resposta imunológica do hospedeiro (FLORENS et al., 2002; TUJU et al., 2017).

A principal vacina recomendada em amplo uso pela OMS, RTS, S/AS01 apresenta fragmentos da proteína CSP em sua estrutura (COPPI et al., 2011). Mais de 5.000 proteínas já foram codificadas no genoma do parasita, algumas proteínas encontradas no ciclo do plasmódio estão sendo avaliadas como candidatas em ensaios clínicos (figura 6) (GARDNER et al., 2002b; TUJU et al., 2017).

A MSP-3 é um antígeno promissor encontrado no estágio eritrocitário do parasita que participa de uma ampla rede de proteínas de superfície do merozoíto e tem sido associada a evasão da resposta imune (OEUVRAY et al., 1994c). Contudo, existem diversos antígenos com capacidade antigênica descobertos na literatura (figura 6), alguns evoluíram para estudos clínicos (SKWARCZYNSKI et al., 2020). No entanto, algumas proteínas da classe de MSPs, a proteína CSP, e o Antígeno 1 da Membrana Apical (AMA-1), ainda são os antígenos mais promissores e bem elucidados na literatura (RICHARDS et al., 2013).

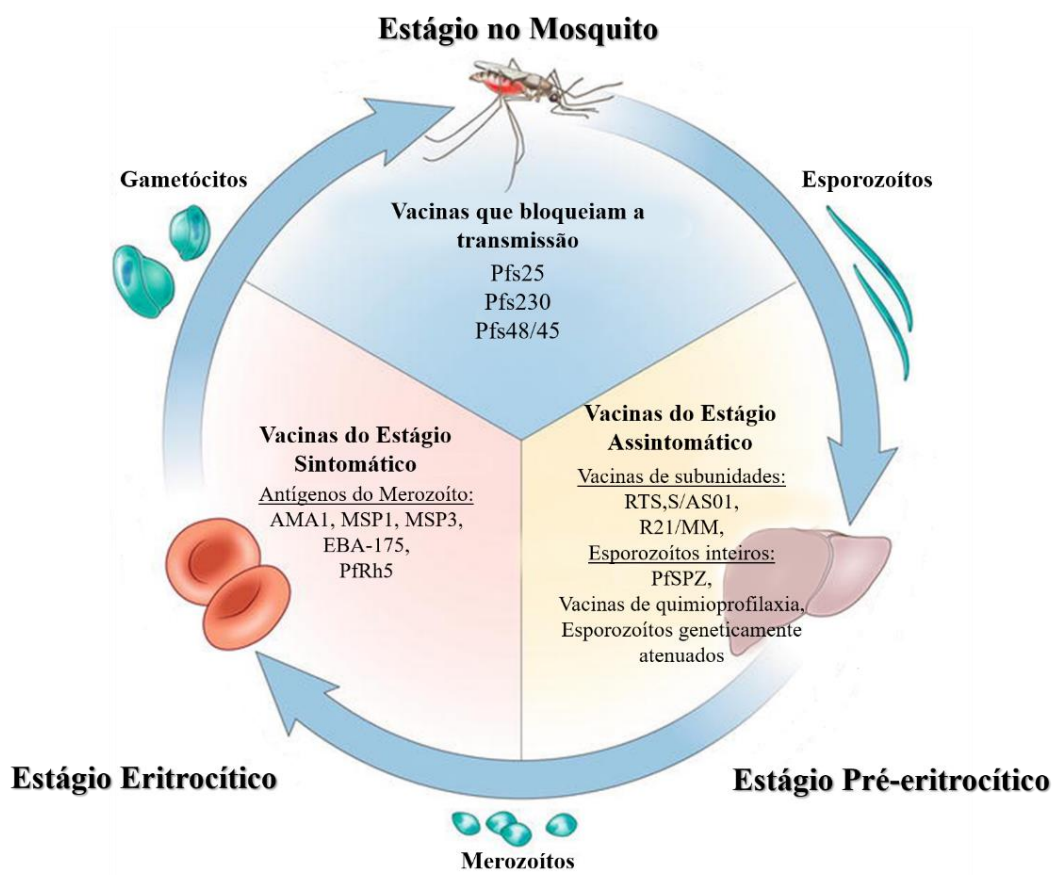


Figura 6: Principais vacinas estudadas presentes no ciclo de vida do plasmódio

Fonte: Adaptado de Duffy et al. 2020.

Um bom produto vacinal pode ser desenvolvido a partir de fases específicas do ciclo ou uma vacina mista com dois ou mais antígenos de outras fases (SOARES; RODRIGUES, 1998). A rede proteômica expressa a partir dos diferentes estágios de vida do *Plasmodium* apresenta-se como o principal alvo dos pesquisadores para a formulação de produtos vacinais ou medicamentos antimaláricos, além disso, possui papel importante na sobrevivência intra e extracelular do parasita e participam no processo de invasão celular e são capazes de induzir a resposta imune do hospedeiro (BELETE, 2020; GARDNER et al., 2002).

A proteína CSP é o principal antígeno utilizado no desenvolvimento de vacinas do estágio pré-eritrocítico, devido a sua alta imunogenicidade (REEDER et al., 2021). Além do mais, foi o primeiro antígeno pré-eritrocítico capaz de estimular o sistema imune do hospedeiro e o principal alvo da vacina recomendada para amplo uso pela OMS (JELÍNKOVÁ et al., 2021a). O desenvolvimento de uma vacina para o estágio pré-

eritrocítico, bloquearia o desenvolvimento da malária clinicamente sintomática, caracterizada pelo estágio eritrocítico (ZAVALA et al., 1985).

O ciclo eritrocitário compreende um dos estágios mais promissores do ciclo de vida do plasmódio, devido a ser o estágio de desenvolvimento da infecção clínica da malária (MOHANDAS; AN, 2012; RONO et al., 2018). As Proteína de Superfície do Merozoíto (MSPs) são altamente imunogênicas, com capacidade de induzir o sistema imune através da sua exposição a anticorpos circulantes (MAZUMDAR et al., 2010a). A MSP-3 mostrou ser alvo das respostas imunes protetoras em humanos após descobertas em isolados da África e Ásia, que mostraram que o domínio C-terminal é altamente conservado (HUBER et al., 1997). O desenvolvimento vacinal visando os principais ciclos de vida do plasmódio, apresenta-se como o melhor caminho a ser seguido, logo a CSP e MSP-3 são imunógenos promissores para o desenvolvimento de formulações vacinais (DE ALMEIDA et al., 2021; ELLIS et al., 2010; PATTARADILOKRAT et al., 2016).

2.4.1 Proteína de Superfície do Merozoíto 3

Na década de 90, Oeuvray et al. (1994) identificaram pela primeira vez a Proteína de Superfície de Merozoíto 3 (MSP-3) como alvo de soro hiperimune em residentes em Papua Nova Guiné (OEUVRAY et al., 1994)

No ciclo eritrocítico, há o aparecimento de várias proteínas de superfície do merozoíto (MSPs), essas proteínas atuam, principalmente, no processo de invasão aos eritrócitos, assim, seu poder imunogênico vem sendo explorado como alvos para o desenvolvimento de uma vacina para malária, e algumas vacinas progrediram para o estágio clínico (RICHARDS; BEESON, 2009). O complexo proteico formado por MSPs são divididos em proteínas ancoradas à membrana do merozoíto através da âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) (MSP-1, MSP-4, MSP-5, MSP-8 e MSP-10), e proteínas solúveis, MSP-3; MSP-6; MSP-7 e MSP-9, que estão presente na superfície do merozoíto fazendo ligação pela interação proteína-proteína (CHAUHAN; YAZDANI; GAUR, 2010; GAUR; MAYER; MILLER, 2004).

A MSP-3 é caracterizada como um antígeno polimórfico secretado associado a merozoítos e possui importância no processo de invasão do parasita nas células sanguíneas, sendo assim, caracteriza-se como um candidato vacinal promissor do ciclo eritrocitário do parasita (TSAI et al., 2009). A MSP-3 possui seu peso molecular de aproximadamente 48 kDa. A MSP-3 apresenta uma região N terminal; um domínio

composto por três blocos de repetições heptadas ricas em alanina; um domínio rico em ácido glutâmico, além de apresentar leucina na porção C-terminal relativamente conservado (figura 7) (BURGESS; SCHUCK; GARBOCZI, 2005; MCCOLL; ANDERS, 1997). Além disso, a MSP-3 forma estruturas oligoméricas alongadas, através da associação proteína-proteína que acontece na região C-terminal (BURGESS; SCHUCK; GARBOCZI, 2005).

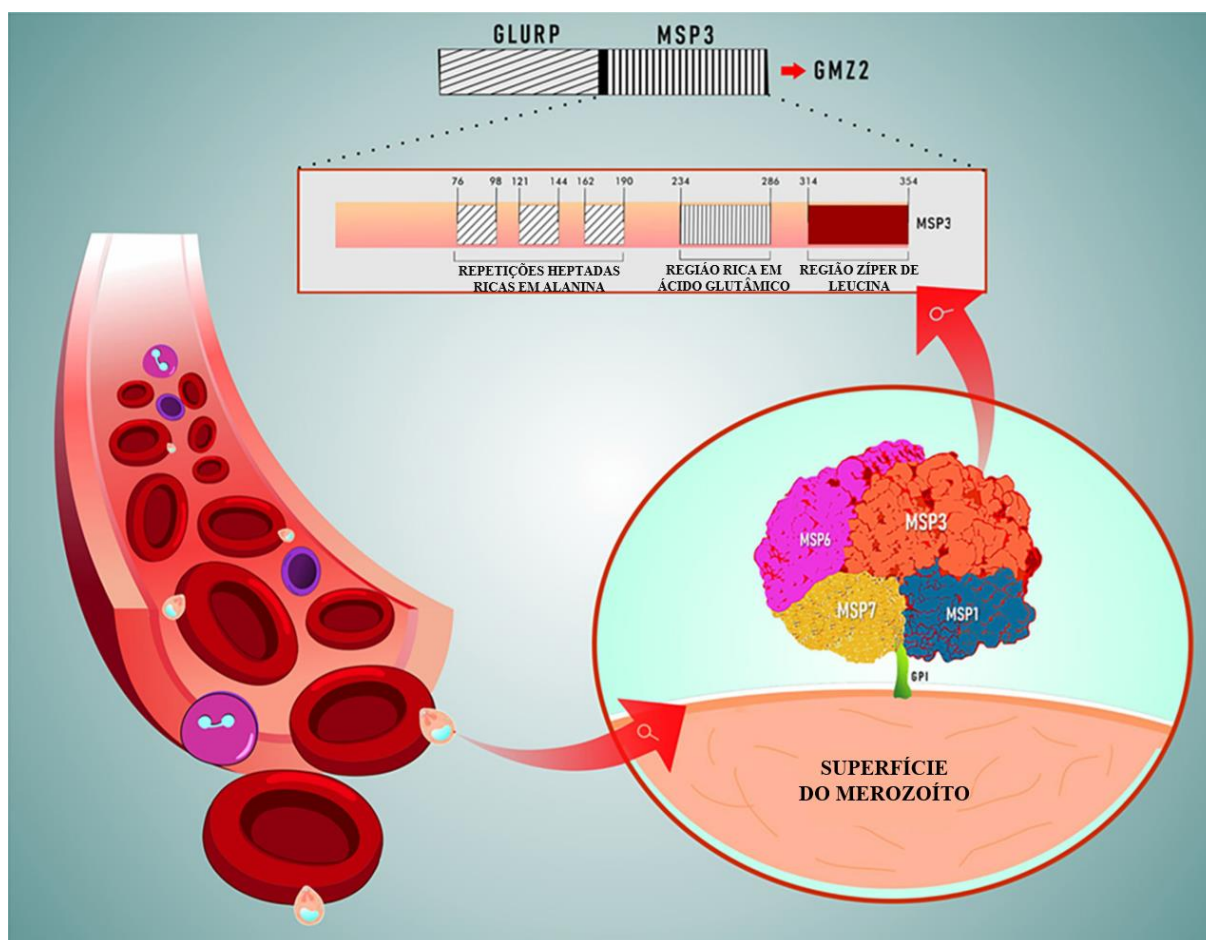


Figura 7: Estrutura completa da Proteína de Superfície do Merozoíto 3 (MSP-3) e sequência da vacina GMZ2

Fonte: ALVES et al. (2022).

No estágio intra-eritrocitário ocorre a degradação das hemoglobinas, que é um processo essencial para o desenvolvimento do parasita, mediado por proteases e ocorre dentro do vacúolo alimentar do eritrócito infectado (MOORE et al., 2006). Nesse processo, o heme tóxico é liberado e convertido em formas poliméricas não tóxicas chamadas de hemozoína (FONG; WRIGHT, 2013). Interferir na formação da hemozoína apresenta-se como um bom mecanismo de atividade antiparasitárias de alguns

antimaláricos, como é o caso da cloroquina, sendo mecanismo alvo de potenciais drogas e estimulação de ferramentas vacinais para malária (EGAN, 2008).

Embora o mecanismo de ligação da proteína MSP-3 ao grupo heme não esteja bem elucidado, a ligação da MSP-3 ao grupo heme já foi caracterizada em um estudo *in vitro* e pode estar associado a formação de estruturas agregadas, como os oligômeros (IMAM et al., 2014). Essas características de ligar-se ao heme e formar oligômeros a credenciam como um dos antígenos promissores para o desenvolvimento de formulações vacinais (BEESON et al., 2016; BURGESS; SCHUCK; GARBOCZI, 2005).

A MSP-3 tem sido classificada como candidata promissora a vacina devido à associação de anticorpos anti-MSP-3, além de estar relacionada a imunidade protetora em estudos em humanos (RICHARDS; BEESON, 2009). A extremidade C terminal da proteína é altamente conservada, enquanto a extremidade N terminal apresenta polimorfismo elevado, portanto, a principal região da proteína para formulações vacinais compreende o domínio C terminal (ESCALANTE; LAL; AYALA, 1998; MCCOLL et al., 1994). Uma candidata a vacina utilizando um Peptídeo Sintético Longo (LPS) recombinada com região conservada da MSP-3, apresentou imunogenicidade à anticorpos IgG, principalmente a subclasse de IgG3, contudo, as respostas não foram duradouras, entretanto os anticorpos mostraram agir em cooperação com os monócitos para inibição da replicação do parasita (DRUILHE et al., 2005).

Estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciaram o alto poder imunogênico da MSP-3, alguns estudos soroepidemiológicos indicaram a presença de anticorpos específicos para MSP-3, além disso, Oeuvray et al. (1994) caracterizaram a MSP-3 com capacidade de eliminar o parasita num estudo *in vitro* (BOYLE et al., 2015; OEUVRAY et al., 1994; SINGH et al., 2009). A GMZ2/Alum é um produto vacinal à base de antígeno MSP-3 fundido com a proteína rica em glutamato (GLURP), essa formulação vacinal apresentou segurança e boa imunogenicidade nas participantes do estudo (BÉLARD et al., 2011). Essa formulação vacinal, apresentou uma redução na incidência da infecção clínica em ensaios clínicos de fase 2b realizado em crianças africanas. (SIRIMA et al., 2016).

2.4.2 Proteína circunsporozoíta

Em 1980, Ruth e Victor Nussenzweigs descobriram um importante antígeno da superfície do esporozoíta, a Proteína Circunsporozoíta (CSP) em *P. berghei* (YOSHIDA et al., 1980). A partir disso, o papel da CSP na proteção contra a malária em outras espécies de plasmódio tem sido extensivamente estudado a respeito de sua capacidade

imunológica como antígeno vacinal (LUMSDEN et al., 2012; YOSHIDA et al., 1980). A CSP possui sua massa molecular de aproximadamente 40-60 kDa, sendo uma molécula multifuncional que desempenha um papel crucial no ciclo de todas as espécies de *Plasmodium* e está associada a invasão e inoculação dos esporozoítos aos hepatócitos (TEWARI et al., 2002; THATHY et al., 2002).

A CSP está presente na membrana plasmática por meio da âncora glicosilfosfatidilinosito (GPI) na região C-terminal, essa proteína é encontrada em todas as espécies de *Plasmodium* (PLASSMEYER et al., 2009). Estruturalmente, a proteína CSP apresenta-se com uma região N terminal, a região C terminal, contém um domínio de repetição da região trambospondina (TSP), além disso, apresenta uma região central de repetição altamente imunogênica (SINNIS; NARDIN, 2002; ZHAO et al., 2016). A estrutura da CSP pode ser vista na figura 8.

Durante muitos anos, a formulação de uma vacina foi exclusivamente concentrada na região central de repetição da CSP, devido à existência de epítomos imunodominantes de células B (WHITE et al., 2015). Contudo, a região C terminal também apresenta uma região interessante para o desenvolvimento de vacinas, devido à presença de epítomos de células T e a região trambospondina, além de apresentar a âncora GPI (GPI) que atua principalmente ligando a proteína a antígenos (BERGMANN-LEITNER et al., 2013; GORDON et al., 1995).

A região central de repetição contém epítomos de células B imunodominantes e constitui uma região promissora para o desenvolvimento de vacinas, devido a estimular anticorpos específicos que poderiam evitar o avanço da doença malárica (ZAVALA et al., 1983). A CSP desempenha um papel importante nas fases de ligação de esporozoítos às glândulas salivares do mosquito, no hospedeiro vertebrado sua função está relacionada a ligação de esporozoítos ao proteoglicano de sulfato de heparina no fígado, uma das etapas essenciais para a invasão dos esporozoítos às células hepáticas (KOJIN et al., 2016; PINZON-ORTIZ et al., 2001; ZHAO et al., 2016).

Uma vacina recombinante à base de uma sequência de tetrapeptídeo de CSP expressa em *Escherichia coli* apresentou resultados promissores por análise *in vitro*, com altas concentrações de anticorpos anti-CSP com capacidade de bloquear a invasão aos hepatócitos (YOUNG et al., 1985). Posteriormente, em 1987, houve a realização do primeiro ensaio clínico, através da utilização de peptídeos sintéticos de aminoácidos que estão presente no epítomo imunodominante de PfCSP (Proteína do circunsporozoíto de *P. falciparum*) conjugados ao toxóide tetânico e juntamente com um adjuvante à base de

hidróxido de alumínio para potencializar a resposta imunológica dos indivíduos imunizados (HERRINGTON et al., 1987). A partir desses primeiros resultados, os estudos utilizando a CSP como antígeno vacinal cresceram rapidamente devido ao grande potencial imunogênico apresentado pela proteína.

A estrutura da RTS, S/AS01 apresenta porções da região imunodominantes central de *PfCSP* e a região C terminal ligada ao antígeno de superfície da hepatite B (MORIS; JONGERT; VAN DER MOST, 2017). A utilização do antígeno CSP como principal componente da vacina RTS, S/AS01, evidencia o grande avanço nas pesquisas de imunógenos para vacina da doença parasitária de maior letalidade do mundo, causada pelo *P. falciparum* (LAURENS, 2020).

Mediante as características estruturais da CSP, bem como seu papel essencial na invasão aos hepatócitos e por ser a proteína mais abundante da superfície dos esporozoítos, credenciaram essa proteína a principal proteína alvo para o desenvolvimento de vacinas para o estágio pré-eritrocítico (SCALLY et al., 2018). Como exemplos de ferramentas vacinais utilizando a CSP como antígeno alvo, a vacina RTS, S é o produto com os resultados mais avançado aprovada para amplo uso pela OMS e a vacina R21 com eficácia de 75% nos primeiros estudos (NADEEM et al., 2022).

2.5 Vacina RTS, S/AS01

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra malária representa um avanço significativo na saúde pública. Por várias décadas, pesquisadores têm se empenhado na criação de uma vacina segura e eficaz para combater as principais espécies responsáveis pela malária humana em todo o mundo (OUATTARA; LAURENS, 2014).

A vacina RTS, S/AS01, conhecida comercialmente como MosquirixTM, produzida pela GlaxoSmithKline Biologicals (GSK SA, Reino Unido) é um grande avanço para a ciência, e abre portas para novas formulações vacinais (GOSLING; VON SEIDLEIN, 2016). Os primeiros estudos com a vacina RTS, S iniciaram na década de 80. Na época esperavam avaliar a resposta da vacina baseada em resultados anteriores de que os esporozoítos atenuados por radiação estimulavam o sistema imune (CLYDE et al., 1973). A RTS, S/AS01 é composta por partículas semelhantes ao vírus do antígeno de superfície da hepatite B fundida com uma porção de *PfCSP* e utiliza o adjuvante à base de lipossomas como potencializador da resposta imune (LAURENS, 2020).

Estruturalmente, a RTS, S/AS01 apresenta duas proteínas geneticamente modificadas expressas em leveduras de *Saccharomyce cerevisiae*, dando origem a uma

proteína quimérica pela parte carboxiterminal contendo epítomos de células T da CSP (identificado como RT), fundido com o antígeno da superfície do vírus da hepatite B (identificado como S) (BALLOU, 2009) (figura 8).

O sucesso da vacina RTS, S/AS01 demorou décadas até chegar ao êxito, devido a obstáculos encontrados na doença (PRAET et al., 2022), tais como um ciclo de vida complexo e ser constituído de multiestágios, além da diversidade antigênica, a curta memória imunológica e via de administração constituem os principais desafios encontrados na busca por um candidato vacinal seguro e eficaz (FERREIRA; DA SILVA NUNES; WUNDERLICH, 2004; MATUSCHEWSKI, 2017).

Nos ensaios da fase 3 da vacina, crianças de 5 a 17 meses e crianças de 6 a 12 semanas foram imunizadas seguindo o regime de imunização que consistia em quatro doses feitas por via intramuscular, em crianças imunizadas de 5 a 17 meses a eficácia foi acima de 50%, e em bebês de 6 a 12 semanas os resultados apresentaram cerca de 31% de eficácia (PARCERIA DE ENSAIOS CLÍNICOS RTS, S, 2017).

Durante o período de 18 meses de estudo, a vacina RTS, S/AS01 forneceu uma modesta proteção contra a malária clínica e grave e uma redução significativa nas internações hospitalares por malária (MAHMOUDI; KESHAVARZ, 2017). Embora não apresente uma resposta imune duradoura, espera-se que com a nova recomendação da OMS para uso da vacina RTS, S/AS01 em crianças menores de 5 anos, ocorra uma redução na incidência de casos graves de malária na população vacinada. A imunização em conjunto com as medidas profiláticas já existentes, salve vidas e diminuída cada vez mais o fardo socioeconômico e risco à saúde pública causado pela infecção malárica (LORENZ; KARANIS; KARANIS, 2014; PENNY et al., 2015)

A vacina utiliza epítomos de células T e B composto pela sequência de repetição de aminoácidos asparagina-alanina-asparagina-prolina (NANP) (COHEN et al., 2010). O adjuvante AS01 consiste em um sistema adjuvante à base de lipossomas com dois imunoestimulantes à base de Monofosforil Lipídio A (MLP) junto com saponina QS-21 (GARÇON; VAN MECHELEN, 2011).

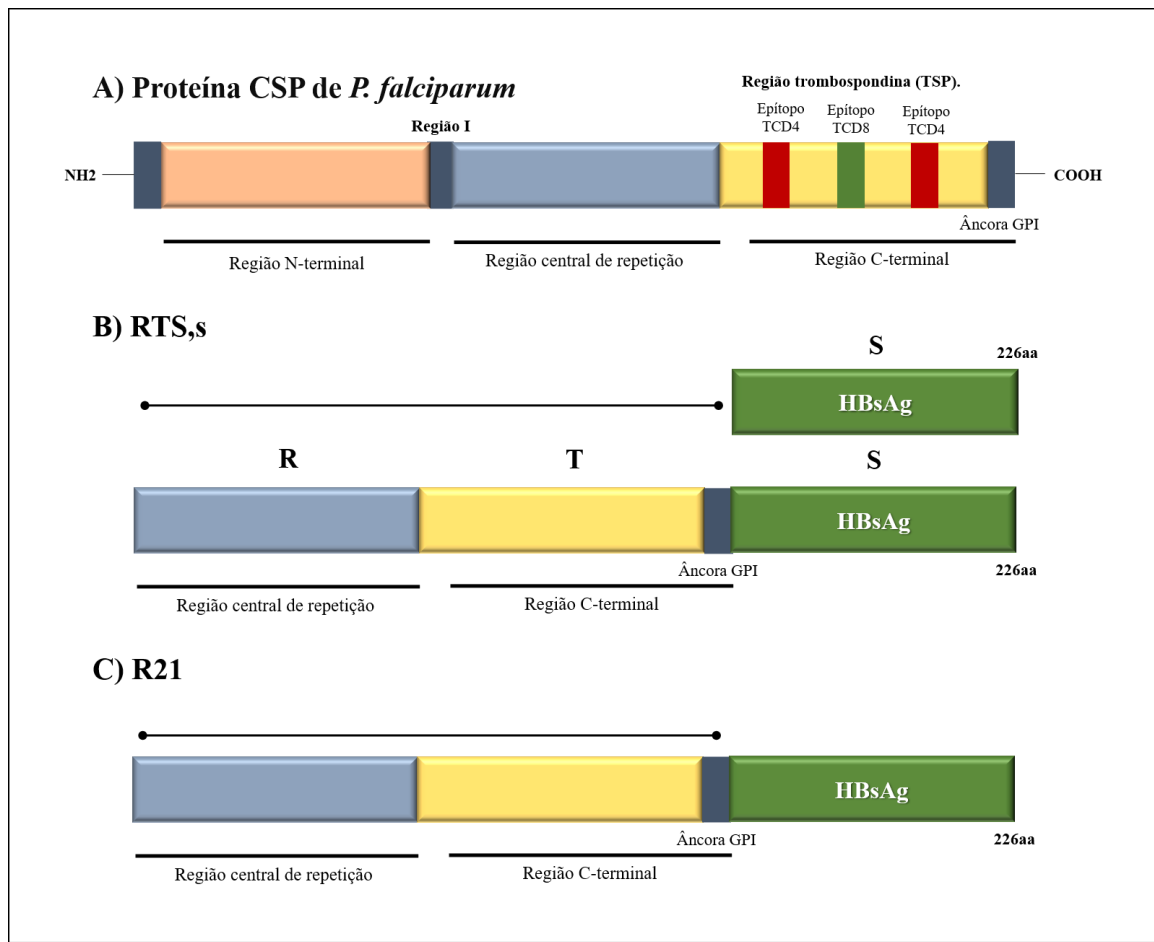


Figura 8: As vacinas RTS, S/AS01 e R21/Matrix-M.

(A) Estrutura da proteína circunsporozoíta; (B) Estrutura da vacina RTS, S/AS01; (C) Estrutura da vacina R21/Matrix-M.

Fonte: COLLINS et al. (2017); KASLOW; BIERNAUX, (2015).

O produto vacinal mais avançado continua sendo a RTS, S/AS01, embora a eficácia tenha sido modesta, os avanços na pesquisa da Mosquirix abriram caminhos para os pesquisadores que buscam uma vacina com a resposta imune duradoura e eficaz, contudo há a necessidade do desenvolvimento de outras formulações vacinais com o intuito de diminuir o fardo que a infecção pelo plasmódio causa no mundo, ou até mesmo, a erradicação da doença (ARORA; C ANBALAGAN; PANNU, 2021; FLORES-GARCIA et al., 2021).

A vacina R21/Matrix-M tem sido considerada uma das mais promissoras para vacinas de outras gerações, um estudo de fase 1/2b realizado em crianças africanas apresentou impressionantes 80% de proteção na população estudada, assim a R21/Matrix-M atingiu a meta pré estabelecida pela OMS de 75% de eficácia durante dois anos de acompanhamento na população estudada (DATOO et al., 2022).

Assim como a RTS, S/AS01, a vacina R21/Matrix-M também utiliza a CSP como antígeno alvo, ambas proteínas são expressas em partículas semelhantes a vírus da hepatite fundida a região central de repetição junto com a região C terminal da proteína CSP. Contudo, a R21/Matrix-M utiliza uma porção maior do antígeno CSP na superfície particulada do vírus, portanto com imunogenicidade maior para a CSP, além disso, faz uso do adjuvante Matrix-M (figura 8) (COLLINS et al., 2017; DATOO et al., 2021).

Embora as vacinas RTS, S/AS01 e R21/Matrix-M tenham resultados promissores e esperançosos, ambas atuam no estágio pré-eritrocítico do parasita, portanto há a necessidade do desenvolvimento de outras vacinas com foco em outros estágios do ciclo de vida do plasmódio, visto que vacinas do estágio pré-eritrocítico atuam exclusivamente no estágio alvo, não protegendo nos estágios subsequentes (COLLINS et al., 2017; SAUERWEIN, 2009). Atualmente, os principais candidatos a antígeno vacinal do estágio sanguíneo são proteínas que participam do processo de invasão nos merozoítos: antígeno de membrana apical 1 (AMA-1) e antígeno de ligação a eritrócitos 175 (EBA 175), além destas, as proteínas presente na superfície do merozoíto (MSP-1 e MSP-3) apresentam-se como candidatas promissoras (CAI et al., 2021).

Atualmente, existe uma formulação vacinal MSP-3-GLURP (GMZ2) em estudo utilizando a fusão de proteínas recombinantes, os antígenos MSP-3 e a proteína rica em glutamato (GLURP), essa vacina utiliza como adjuvante o hidróxido de alumínio (Alum) (THEISEN et al., 1998). Os resultados da fase 2b mostraram uma eficácia relativamente baixa para a vacina GMZ2/Alum, contudo a vacina estimulou o sistema imune através do aumento dos níveis de anticorpos específicos dos pacientes voluntários para o estudo, evidenciando a imunogenicidade da proteína MSP-3 de *P. falciparum* (SIRIMA et al., 2016).

2.6 Vantagens da imunização de mucosa

Atualmente, as principais vacinas em fase de desenvolvimento incluem a RTS, S/AS01, que é administrada por via parenteral. Esta via de imunização, em alguns casos, está associada a ocorrência de edemas e dor no local da injeção, bem como a custos elevados, riscos de infecções relacionadas a objetos perfurocortantes e desafios na disposição adequada de materiais contaminados, o que pode resultar em infecções por patógenos (SYED, 2022; ZHANG; WANG; WANG, 2015).

Por outro lado, as imunizações de mucosa oferecem várias vantagens, incluindo menor investimento, maior capacidade de produção em larga escala e facilidade de

distribuição, especialmente em países em desenvolvimento. Além disso, as abordagens de imunização oral e intranasal representam regimes de imunização mais acessíveis para a população em geral (LYCKE, 2012).

Em relação ao sistema imunológico associado às mucosas, esse sistema é subdividido em locais indutores e locais efetores, cada um desempenhando um papel específico na resposta imune adaptativa (TAMURA; KURATA, 2004). Nos locais indutores, ocorre a ativação inicial das células imunes em resposta à presença de antígenos, desencadeando uma cascata de eventos que levará à resposta imune adaptativa. Já nos locais efetores, essas respostas adaptativas são efetivamente executadas para combater patógenos ou substâncias estranhas, promovendo a proteção da mucosa contra invasores (LAVELLE; WARD, 2021).

Existem escassas formulações vacinais que empregam técnicas de imunização mucosa, como as vias oral e intranasal, para infecções não-mucosas, como as causadas pelo *Plasmodium spp.* transmitidos por mosquitos do gênero *Anopheles* (WANG et al., 2015). A administração oral e intranasal são as rotas mucosas mais comuns utilizadas no desenvolvimento de vacinas (MIQUEL-CLOPÉS et al., 2019). O sistema imunológico das mucosas compreende um sistema especializado e distinto da imunidade inata e adaptativa, encontrado principalmente nos tecidos linfóides associados às mucosas (MALT). Os componentes mais elucidados do MALT incluem o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e o tecido linfóide associado à nasofaringe (NALT) (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005).

As vacinas orais e intranasais desencadeiam respostas locais nos tecidos mucosos e, adicionalmente, estimulam respostas imunes sistêmicas de natureza humoral e celular (WANG et al., 2015). A resposta imunológica resultante da imunização oral está relacionada principalmente à mucosa gastrointestinal, enquanto a imunização intranasal estimula principalmente o tecido linfóide associado à nasofaringe (NALT) e, em menor grau, o tecido linfóide associado ao brônquio (BALT) (CZERKINSKY; HOLMGREN, 2012; MIQUEL-CLOPÉS et al., 2019). Vale ressaltar que a administração direta por via oral ou intranasal é mais eficaz na estimulação do sistema imune mucosal em comparação com vacinas injetáveis, que geralmente apresentam baixa eficácia na indução da resposta imune nas mucosas (NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006).

Estudo utilizando um antígeno do estágio sexual de *P. falciparum* (Pfs25), uma proteína promissora para o desenvolvimento de vacinas bloqueadoras de transmissão da malária expressa nas superfícies das formas de zigoto e oocineto do parasita foi capaz de

induzir resposta Th1 e Th2 de forma mista por via intranasal quando recombinada com um potente adjuvante de mucosa (ARAKAWA et al., 2005; BARR et al., 1991). Outro estudo de imunização intranasal utilizando como antígeno a CSP modificada com agonistas de TLR5, induziu a resposta humoral específica para malária dos animais imunizados, com capacidade de neutralização e inibição de invasão de esporozoítos *in vitro* e *in vivo* (CARAPAU et al., 2013). Estudos demonstram capacidade de induzir TCD8+ da imunidade mediada por células antígenos-específicas em imunizações orais de formulações vacinais recombinantes (AGGARWAL et al., 1990; SADOFF et al., 1988).

A maioria das formulações vacinais testadas e aprovadas utilizam microrganismos vivos ou atenuados para efetuar a entrega dos antígenos de interesse, as vacinas de subunidades consistem em outras estratégias adotadas para estas imunizações (HILL, 2011; TLAXCA; ELLIS; REMMELE, 2015). Os esforços adotados para entrega e potencialização dos antígenos imunogênicos são necessários devido as particularidades e desafios encontrados em virtude da degradação que antígenos vacinais sofrem no trato gastrointestinal (SARKAR; GARG; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2019). Com isso, diversos estudos têm utilizado técnicas biotecnológicas ou utilizando potentes adjuvantes vacinais para apresentar de forma mais eficaz e segura ao sistema imunológico por via oral e intranasal (GARCÍA; DE SANCTIS, 2014; SCHWENDENER, 2014). No entanto, a avaliação do atual trabalho consiste em avaliar a resposta imune humoral gerada pelos antígenos alvos por via intranasal sem a utilização de adjuvantes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de resposta imune induzido pela administração via intranasal das proteínas MSP-3 e CSP recombinantes de *P. falciparum* em modelo murino.

3.2 Objetivos específicos

- Expressar e purificar as proteínas CSP e MSP3 recombinantes de *P. falciparum*;
- Avaliar a capacidade dos anticorpos gerados em reconhecer as proteínas nativas do *P. falciparum*;
- Avaliar o perfil de citocinas induzido pela estratégia de imunizações.

4. CAPÍTULO 1

Neste capítulo, os resultados obtidos a partir dos objetivos deste estudo são apresentados detalhadamente. O principal foco de investigação consistiu na avaliação das respostas humoral e celular induzidas pelas proteínas rPfCSP e rPfMSP-3, ambas selecionadas como antígenos promissores para formulações vacinais contra a malária. Essas proteínas foram obtidas de estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, a rPfCSP utilizada pode ser vista em DE ALMEIDA et al., (2022). Os dados referentes a proteína recombinante rPfMSP-3 ainda não foram publicados.

Informações sobre o artigo

Título do artigo: Análise da resposta imune contra antígenos candidatos vacinais de *Plasmodium falciparum* por meio de imunização via intranasal em modelo murino.

Situação: Em revisão para submissão.

Revista a ser submetido: Anais da Academia Brasileira de Ciências (Qualis A2).

ARTIGO ORIGINAL

Análise da resposta imune contra antígenos candidatos vacinais de *Plasmodium falciparum* por meio de imunização via intranasal em modelo murino

Emmily Myrella V Mourão^{1,2}; Késsia Caroline Souza Alves²; Maria Edilene Martins Almeida²; Gemilson Soares Pontes³; Luís André Morais Mariúba^{1,2,3,4,5}.

¹ Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane: Laboratório de diagnóstico e controle de doenças infecciosas na Amazônia, Manaus, AM, Brasil;

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – UFAM, Manaus, AM, Brasil;

³ Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, Manaus, AM, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – UFAM, Manaus, AM, Brasil;

⁵ Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro – ILMD, Fiocruz, AM, Brasil.

Autor correspondente: Luís André Morais Mariúba (andre.mariuba@fiocruz.br)

RESUMO

A malária, causada principalmente pelo *Plasmodium falciparum*, é uma doença altamente letal em todo o mundo, havendo, portanto, a necessidade urgente do desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a doença. Neste estudo, avaliamos a resposta imunológica em camundongos após a administração intranasal de formas recombinantes da Proteína 3 de superfície de merozoíto de *P. falciparum* (rPfMSP-3) e proteína de superfície de circunsporozoíto de *P. falciparum* (rPfCSP). Ambas as proteínas demonstraram ser altamente imunogênicas, sendo a rPfCSP mais eficaz na indução da resposta imune. A rPfMSP-3 também apresentou uma resposta significativa, e os anticorpos gerados foram capazes de inibir a invasão do merozoíto nas hemácias. Esses resultados abrem perspectivas promissoras para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária por via de mucosa, sem a necessidade de adjuvantes.

INTRODUÇÃO

A malária, causada pelos protozoários *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* é transmitida pelo mosquito fêmea *Anopheles* e representa uma ameaça global, colocando aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas em risco de contrair a doença (FOLEGATTI et al., 2017). A Organização Mundial da Saúde (OMS) dedicou anos à erradicação da malária, contudo, existem alguns desafios encontrados nesse processo, sendo a diversidade antigênica do parasita e a curta memória imunológica gerada pela maioria dos imunizantes os principais obstáculos (GREENWOOD; TARGETT, 2009). Recentemente foi recomendada a vacina RTS, S/AS01 para crianças que residem em regiões de alto risco para a infecção (Relatório Mundial da Malária, 2021). Essa vacina, demonstrou eficácia limitada (39% contra novos casos e 29% contra formas graves de malária causadas pelo *P. falciparum* (TINTO et al., 2019). Além disso, essa vacina visa a proteína circunsporozoíta (CSP) de *P. falciparum*, sendo uma das principais candidatas vacinais devido à sua capacidade imunogênica notável (DE ALMEIDA et al., 2021).

A CSP é fundamental na invasão e desenvolvimento da infecção malárica. Essa proteína desempenha um papel crucial na invasão e inoculação dos esporozoítos nos hepatócitos (TEWARI et al., 2002; THATHY et al., 2002). Além da CSP, outras estratégias e antígenos promissores são utilizadas para o desenvolvimento de formulações vacinais que visem outros ciclos biológicos do parasita (CECH et al., 2011; PRATT-RICCIO et al., 2017). Entre as proteínas do estágio eritrocitário, as proteínas de superfície do merozoíto (MSPs), especialmente MSP-1, MSP-2 e MSP-3 são candidatas promissoras para possíveis formulações vacinais devido à exposição direta aos anticorpos circulantes (BEESON et al., 2016b; COWMAN et al., 2022; LIN et al., 2016; RICHARDS et al., 2013; WOEHLBIER et al., 2006).

Apesar dos avanços nas pesquisas e da aprovação da vacina RTS, S/AS01 para uso em áreas endêmicas de malária, a necessidade de desenvolver uma segunda vacina eficaz contra a infecção por *P. falciparum* persiste, dada a sua periculosidade para a população. Compreender a imunogenicidade e antigenicidade de antígenos presentes em diferentes ciclos de vida do parasita é crucial para o desenvolvimento de novas formulações vacinais contra a malária. Dessa forma, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a resposta imune desencadeada pelas proteínas *rPfCSP* e *rPfMSP-3* em diferentes regimes de imunização pela via intranasal em murinos.

METODOLOGIA

Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) (Anexo 1), do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Nº 109/2022.

Proteínas recombinantes

O desenho dos genes sintéticos das proteínas recombinantes foi elaborado utilizando sequências de aminoácidos previamente conhecidas na literatura utilizadas em estudos anteriores para testes vacinais. Para a sequência de *rPfMSP-3*, foi utilizada a sequência descrita por THEISEN et al., (2004), enquanto para *rPfCSP*, utilizou-se a sequência descrita por STOUTE et al., (1997). As expressões das proteínas recombinante ocorreu em vetores de expressão em *E. coli* cepa BL21. Posteriormente, as bactérias foram transformadas com o plasmídeo pRSET-CSP e pRSET-MSP-3 por eletroporação, e as colônias resultantes foram plaqueadas em meio LB ágar com antibióticos. Após o crescimento, as colônias foram inoculadas em pré-inóculo e transferidas para 1 litro de meio LB líquido. A cultura foi monitorada por D.O. até atingir a absorbância desejada, momento em que IPTG foi adicionado. Após a incubação, a cultura foi centrifugada, e o pellet ressuspensionado em tampão de lise foi submetido à lise celular. O produto da sonicação foi centrifugado para separar pellet e sobrenadante, que foram analisados por SDS-PAGE.

Purificações das proteínas

As purificações das proteínas *rPfCSP* e *rPfMSP-3* foram desenvolvidas seguindo metodologia definida por nosso grupo de pesquisa. As proteínas foram purificadas pela técnica de Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado (CAMI) em AktaPurifier General Elector desenvolvida por Porath em 1975. Neste estudo, utilizamos a coluna de purificação contendo íons Ni^{2+} (Qiagen®) em afinidade a cauda de histidina inserida na proteína. Foi adicionado o sobrenadante lisado à coluna contendo a proteína *rPfCSP* e *rPfMSP-3* seguida de lavagens para verificar a retenção das proteínas na coluna com diferentes concentrações de Imidazol. A eluição foi realizada com tampão contendo Imidazol em diferentes concentrações. Após esse processo, as alíquotas foram armazenadas a -20°C. Para a avaliação da pureza do processo, foi realizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (WOOD, 1983). As proteínas

foram quantificadas utilizando o método de Bradford (Bio-Rad®) (1976) e por densidade óptica por espectrofotômetro.

Produção de anticorpos anti- rPfCSP e anti-rPfMSP-3 em modelo murino

Os testes para imunizações seguiram o protocolo definido por nosso grupo de pesquisa para via intranasal (DE ALMEIDA et al., 2022). Foram utilizados camundongos fêmeos (*Mus musculus*, *Balb/c*) com idade entre 6 a 8 semanas.

No estudo, foram separados sete animais por grupos para avaliar a resposta imunológica em relação às proteínas rPfCSP e rPfMSP-3, com diferentes concentrações. Para as imunizações com as proteínas rPfCSP e rPfMSP-3, os animais foram imunizados com as seguintes concentrações: 0,02 µg/mL, 0,2 µg/mL, 2 µg/mL e 10 µg/mL. Além disso, foram utilizados dois grupos controles de animais imunizados com PBS 1x e um grupo de animais que não receberam nenhum tipo de imunização.

A administração intranasal foi realizada após a anestesia dos camundongos. Foi utilizado uma pipeta para administrar 10 µL em cada narina, totalizando 20 µL por animal nas concentrações especificadas. Os camundongos receberam duas doses, uma no dia 0 (D0) e outra no dia 14 (D14). Para os testes imunológicos subsequentes, realizamos coletas de sangue por meio do plexo orbital antes das imunizações (D0), no dia 14 (D14) e no dia 28 (D28). A reatividade do soro dos animais foi avaliada por ensaios ELISA indiretos.

Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA)

As placas foram sensibilizadas com as proteínas rPfCSP e rPfMSP-3, diluídas em tampão carbonato (pH 9,6) e incubado overnight a 4°C. No dia seguinte, os poços foram lavados com PBS1X/Tween 0,05% e bloqueados com BSA 3% + PBS 1X e incubados a 37°C por 2 horas. Os soros dos camundongos diluídos em BSA 3% + PBS1X foram adicionados aos poços e incubados em estufa a 37°C por 1 h e em seguida lavados com PBS/Tween 0,05%. O anticorpo secundário anti-IgG mouse total foi adicionado nos poços e incubado a 37°C por 1 h e em seguida lavados novamente conforme descrito. Em seguida, a revelação foi realizada com substrato cromogênico adicionando em cada poço por 10 minutos, e interrompida com H₂SO₄ (2M). A D.O foi determinada por leitor de ELISA (Thermo®) utilizando filtro de 450nm.

Inibição de invasão do merozoíto

O *P. falciparum* (W2) foi cultivado em eritrócitos humanos conforme os métodos adaptados de TRAGER; JENSEN (1976). A cultura, predominantemente composta por trofozoítos jovens, foi sincronizada usando D-sorbitol 5% (Sigma-Aldrich), e o hematócrito foi mantido a 5%, seguindo os protocolos de LAMBROS; VANDERBERG (1979). Os anticorpos anti-rPfMSP-3 em estudo foram avaliados em concentrações seriadas que variaram de 0,0030µg/mL a 2,3E-05 µg/mL. Para avaliar a eficácia antiparasitária, foram utilizadas concentrações seriadas de artemisinina (100 a 0,781 ng/mL). Glóbulos vermelhos infectados serviram como controle positivo, enquanto glóbulos vermelhos não infectados foram usados como controle negativo. As culturas foram incubadas a 37°C por 48 horas, em uma atmosfera contendo 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂, e posteriormente coradas com Sybr Green I (Invitrogen). Toda a experimentação foi realizada em colaboração com a Fiocruz de Rondônia.

Dosagem de citocinas por CBA

Um novo protocolo de imunização foi empregado para a dosagem de citocinas dos animais imunizados. Os animais foram submetidos à imunização intranasal, recebendo as proteínas rPfCSP e rPfMSP-3 em uma concentração de 10 µg/mL, em duas doses com intervalo de duas semanas. Amostras de soro foram coletadas nos tempos de 24 e 72 horas após cada dose.

A dosagem de citocinas dos animais imunizados com as proteínas, foi realizada pela técnica de Citometria de Fluxo CBA (Cytometric Bead Array), kit BD Cytometric Bead Array (CBA), seguindo as orientações padronizadas pelo fabricante. Foram utilizadas *beads* de tamanho conhecidos e com intensidade de fluorescência distinta para detectar através de uma superfície de captura várias citocinas. As citocinas quantificadas no presente trabalho foram: IL-2, IL-10, IL-17, IL-4, IL-6, TNF- α IFN- γ .

Primeiramente, foi realizada uma curva de diluição seriada com amostra padrão das citocinas de interesse. Cada amostra foi incubada com a mistura de *beads* específica para cada analito, seguido da incubação com anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra foi realizada através de anticorpos conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE). Em seguida, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por tempo determinado pelo fabricante e preparadas posteriormente o complexo formado pela ligação das *beads* de captura. As citocinas

presentes nas amostras analisadas e anticorpo de detecção foram quantificadas por meio de Citometria de Fluxo, utilizando o citômetro de fluxo *FACSCanto II*.

Análise estatística

Os dados foram analisados por *software GraphPad Prism* (v.8.0). Todas as variáveis numéricas estão expressas por média $\pm$ desvio padrão. Variáveis categóricas foram expressas por valor absoluto (n) e frequência relativa (%). Os testes de Two-Way ANOVA e One-ANOVA foram utilizados para avaliar a resposta humoral e dosagem de citocinas respectivamente. A IC50 dos anticorpos foi calculada por meio do teste de regressão não linear. Os dados que obtiveram valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção das proteínas recombinantes *rPfCSP* e *rPfMSP-3*

As proteínas *rPfCSP* e *rPfMSP-3* foram purificadas com sucesso pela técnica de cromatografia por afinidade em coluna de níquel, como descrito anteriormente. Na figura 1a, é possível observar a eluição da proteína *rPfCSP* (linha B) entre as frações 21 e 27. Na figura 1b, observa-se a eluição da proteína *rPfMSP-3* (linha B) entre as frações entre 11 com término na fração 16.

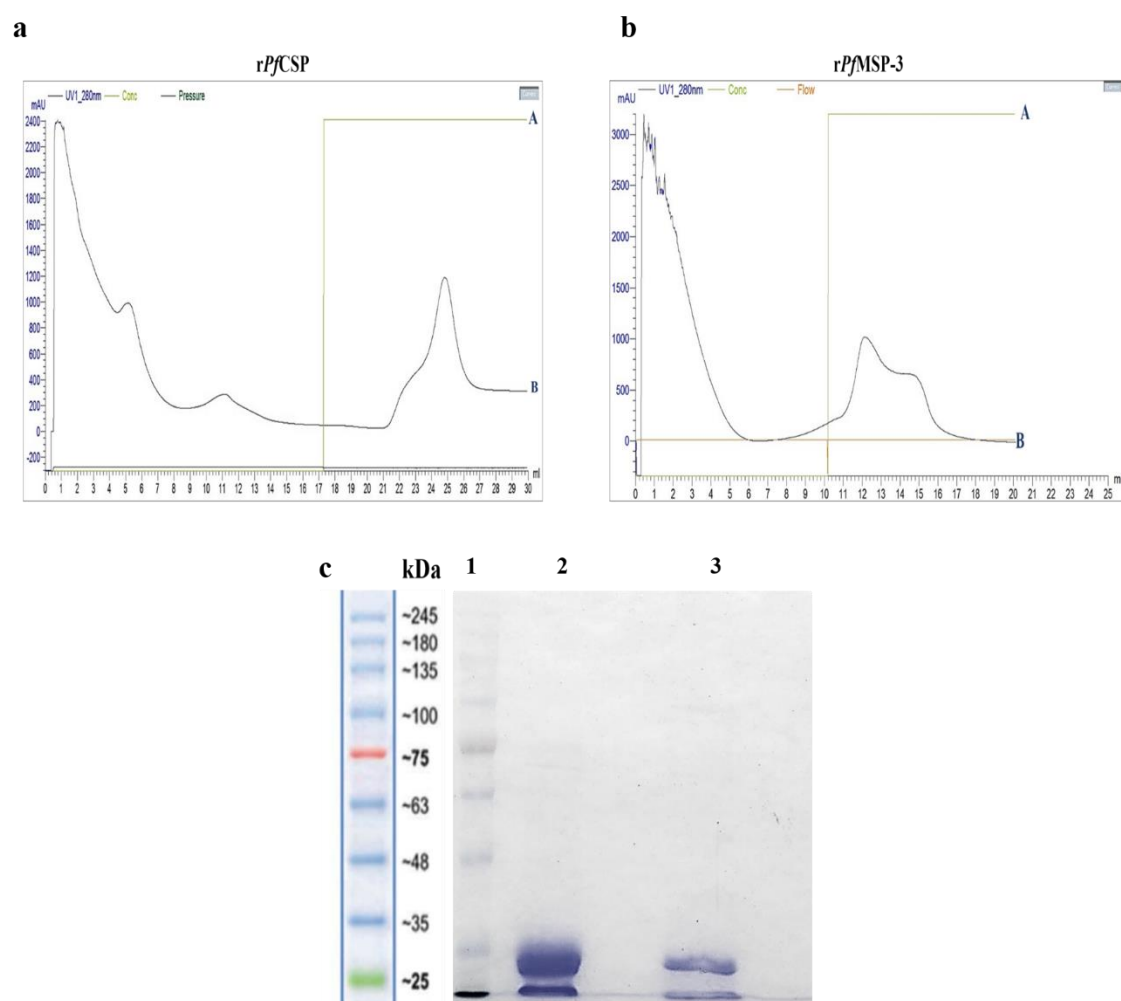


Figura 1: Análise de pureza das proteínas *rPfCSP* e *rPfMSP-3*.

Gráfico de cromatografia por afinidade da proteína *rPfCSP* por HPLC em coluna de níquel (a). Gráfico de cromatografia por afinidade da proteína *rPfMSP* por HPLC em coluna de níquel (b). Linha (A) correspondente ao tampão de eluição com Imidazol; Linha (B) correspondente a detecção UV em 280 nm. Gel de SDS-PAGE à 12% referente à concentração das proteínas *rPfMSP-3* e *rPfCSP* purificadas em coluna de níquel (c). (1) PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; (2) Proteína *rPfCSP*; (3) Proteína *rPfMSP-3*.

Pela análise em SDS-PAGE, foi possível observar que as proteínas recombinantes apresentaram alto grau de isolamento. Na figura 1c, canaletas 2 e 3, observa-se as bandas correspondentes as proteínas *rPfCSP* e *rPfMSP-3*, respectivamente, apresentando massa molecular de aproximadamente 33 kDa. As proteínas recombinantes utilizadas neste estudo, foram obtidas em trabalhos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa (ALVES, 2022; DE ALMEIDA et al., 2022). A região da proteína utilizada para a recombinação foi a região C terminal de ambas as proteínas. Essa região é constantemente utilizada para o desenvolvimento de antígenos recombinantes. Além disso, é relevante mencionar que a principal vacina, RTS,S, que foi aprovada para uso em crianças, foi desenvolvida em partes nessa região específica da proteína (DEMANGA et al., 2010; LAURENS, 2020).

Análise da resposta humoral

Nas imunizações intranasais, foi observada uma resposta humoral semelhante entre as proteínas nas maiores concentrações (2 µg/mL e 10 µg/mL). No entanto, ambas as proteínas não demonstraram reatividade sérica em concentrações menores (0,02 µg/mL e 0,2 µg/mL). A reatividade dos soros provenientes dos animais imunizados pode ser vista na figura 2.

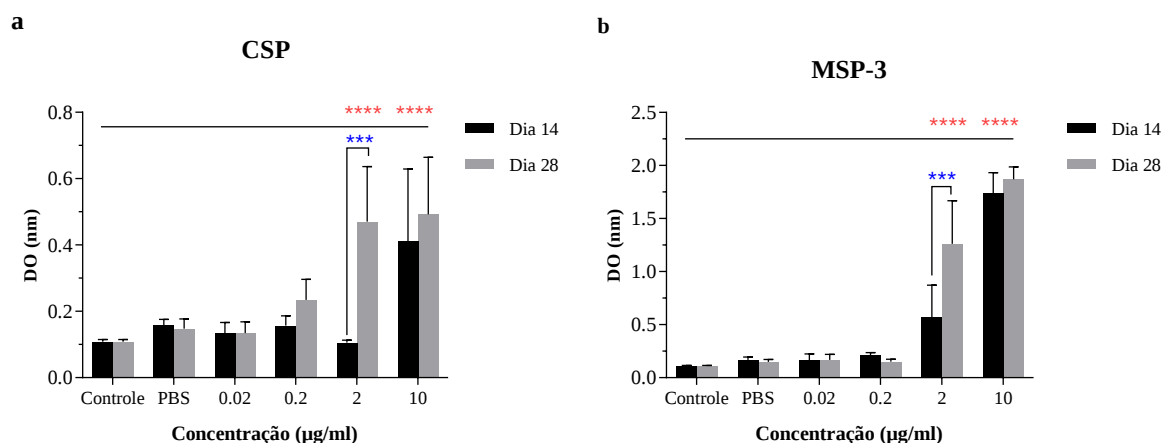


Figura 2: Análise da resposta humoral após imunização com as proteínas *rPfCSP* e *rPfMSP-3*.

No eixo horizontal, estão representados os grupos de controle (animais não imunizados) e animais imunizados com PBS 1x, animais imunizados com as proteínas em concentrações definidas (0,02, 0,2, 2, 10 µg/mL). A densidade óptica (DO) é representada no eixo vertical. A significância estatística foi representada por asteriscos; ***p<0,001, ****p<0,0001.

Em relação à resposta anti-rPfCSP, diferenças estatisticamente significativas (**** $p < 0,0001$) foram observadas nos grupos de animais imunizados com concentrações de 2 µg/mL e 10 µg/mL, quando comparados aos demais grupos do estudo, incluindo os grupos controle (animais não imunizados e imunizados com PBS 1x) (figura 2a). Uma análise específica dos dias de imunização revelou significância estatística (*** $p < 0,001$) apenas no grupo de animais imunizados com 2 µg/mL, com o dia 28 (correspondente à segunda imunização) demonstrando maior reatividade na resposta humoral dos animais imunizados com essas concentrações (figura 2a). No grupo imunizado com 10 µg/mL, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre os diferentes dias. Para as concentrações de 0,02 µg/mL e 0,2 µg/mL, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas em comparação com os grupos controle ($p > 0,05$), sugerindo a ausência de reatividade na resposta humoral dos animais imunizados com essas concentrações (figura 2a). Diversas formulações vacinais têm sido investigadas visando a proteína CSP de *P. falciparum* como alvo. Esta proteína exibe uma notável capacidade de induzir uma resposta humoral eficaz, como demonstrado por COLLINS et al. (2017) e OLOTU et al. (2016), que avaliaram a eficácia de vacinas de destaque direcionadas à CSP de *P. falciparum*. COLLINS et al. (2017) realizou um estudo sobre a eficácia da vacina R21, administrando-a em uma dose considerada baixa, 0,5 µg. Mesmo com a utilização de diferentes adjuvantes, a vacina mostrou-se capaz de induzir eficazmente a expressão de IgG anti-CSP e alcançar níveis satisfatórios de células T em camundongos BALB/c. Por sua vez, OLOTU et al. (2016) avaliou a eficácia protetora da vacina antimalárica de destaque, a RTS,S e observou que as vacinas analisadas demonstraram níveis satisfatórios de proteção. Esses resultados evidenciam o elevado potencial imunogênico associado à proteína CSP de *P. falciparum*.

TEIXEIRA et al. (2022) por meio da via intraperitoneal, utilizou diferentes tipos de adjuvantes (poli (A:U), poli (I:C) HMW e um agonista de RIG-I) com o intuito de melhorar a administração da proteína CSP de *P. yoelii* (PyCSP) em concentrações de 2 µg/mL ou 5 µg/mL. Como resultado, todas as formulações adjuvadas resultaram na indução de níveis significativamente elevados de IgG anti-CSP, seguindo o delineamento experimental semelhante ao utilizado em nosso estudo. JELÍNKOVÁ et al. (2021) também avaliaram a imunogenicidade da proteína CSP, agora utilizando uma plataforma de vacina baseada em partículas semelhantes a vírus para avaliar a imunogenicidade dessa proteína, e demonstraram a capacidade de induzir a produção de IgG séricos de longa

duração. Nossos resultados, em conjunto com as descobertas anteriores, corroboram com a premissa da imunogenicidade associada à CSP.

No que se refere à resposta humoral induzida pela proteína rPfMSP-3, novamente foram observadas respostas estatisticamente significantes nas concentrações de 2 µg/mL e 10 µg/mL em comparação com os grupos de animais imunizados com 0,02 µg/mL e 0,2 µg/mL (**** $p < 0,001$), assim como com os grupos de controle negativo (figura 2b). No grupo imunizado com 2 µg/mL, a análise específica dos diferentes dias de imunização revelou uma significância estatística(*** $p < 0,001$), com a resposta sendo mais robusta após a segunda dose. As concentrações de 0,02 µg/mL e 0,2 µg/mL não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) em relação aos grupos controle (figura 2b). Esses resultados, ressaltam a via intranasal como uma alternativa eficaz para a entrega de antígenos sistêmicos, especialmente em contextos de infecção por malária.

A alta estimulação da resposta humoral produzida por meio de imunizações intranasais e intramuscular também foi observada em imunizações com antígenos de outro parasita do gênero *Plasmodium*, o *Plasmodium vivax*. Nesse estudo realizado por BHAT et al. (2009), foi avaliado os efeitos imunomoduladores de antígenos maláricos adjuvados com oligodesoxinucleotídeo CpG. Os antígenos utilizados são referentes a diferentes estágios de vida do *Plasmodium*, incluindo a proteína CSP e antígenos encontrados no ciclo eritrocitário, AMA-1 e MSP-1. No mesmo estudo, a comparação entre as duas vias de imunização mostrou que a via intranasal foi capaz de induzir uma imunidade protetora mais eficaz contra a malária vivax quando comparada a via intramuscular. Outro estudo também demonstrou alta indução da resposta humoral em camundongos C57BL/6 quando imunizados pela via intranasal tendo como alvo a proteína MSP1-19 (BARGIERI et al., 2007).

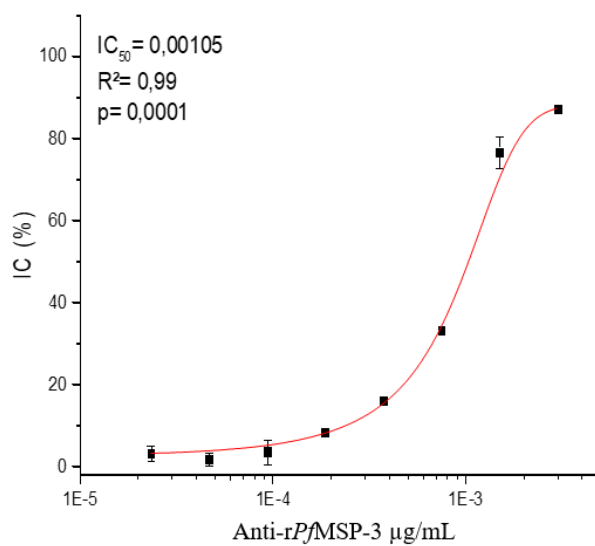
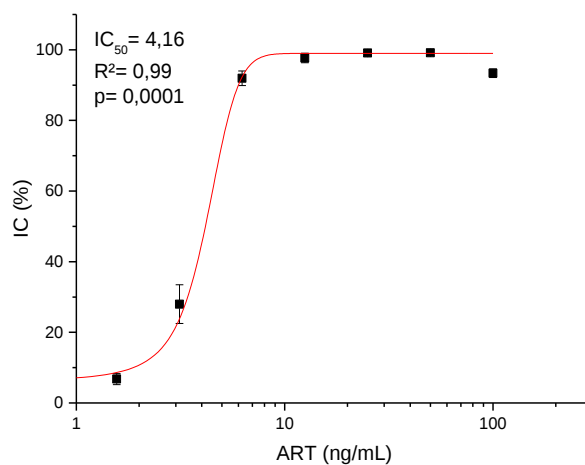
Em estudos anteriores conduzidos por nosso grupo de pesquisa, foram realizadas análises das subclasses de IgG nos soros dos animais imunizados com as proteínas rPfCSP e rPfMSP-3 (conforme mostrado na Figura 1 do material complementar). Os resultados revelaram que a concentração de 10 µg/mL de ambas as proteínas é capaz de estimular uma resposta sorológica das subclasses de IgG1 e IgG2a/b. Especificamente, a proteína rPfCSP demonstrou induzir uma resposta imune balanceada do tipo Th1/Th2, evidenciada pelos níveis significativos de IgG1 e IgG2a/b (DE ALMEIDA et al., 2022). Em contrapartida, a reatividade das subclasses de IgG em resposta à proteína rPfMSP-3 indicou uma resposta do tipo Th1 (dados não publicados), resultados semelhantes foram

encontrados em um estudo utilizando como alvo a proteína MSP1-19 pela via intranasal (BARGIERI et al., 2007).

Tanto a proteína rPfCSP quanto rPfMSP-3 demonstraram a capacidade de induzir a produção de anticorpos IgG séricos em duas concentrações distintas, além de induzir subclasses de IgG do tipo Th1/Th2. Nossos resultados, em relação à resposta imune humoral, corroboram com os achados anteriores. No entanto, destaca-se a distinção fundamental em nossa abordagem, uma vez que optamos por investigar a capacidade imunogênica das proteínas rPfCSP e rPfMSP-3 sem recorrer à administração sistêmica junto com o uso de adjuvantes. Em vez disso, conduzimos as imunizações por meio da via intranasal contendo apenas a proteína isolada como método alternativo. Vale destacar a importância de explorar vias de imunizações mais convenientes, acessíveis e menos invasivas, visto que a infecção malárica é endêmica em regiões que muitas vezes carecem de recursos financeiros e podem ser de difícil acesso.

Teste de inibição *in vitro* utilizando os anticorpos anti-rPfMSP3 produzidos

Os anticorpos anti-rPfMSP3 isolados por imunocromatografia obtidos neste estudo por imunizações intranasais foram capazes de reconhecer a proteína MSP3 nativa e inibir a invasão dos merozoítos a hemácias em cultivo *in vitro* de *P. falciparum* (figura 3a).

A**B**

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvpad
Anti-rPfMSP-3	0,00105	0,0019	0,0019	0,001617	0,000491
	0,99	0,98	0,96	0,98	
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média	Desvpad
ART (ng/mL)	4,16	13,19	12,2	9,85	4,95
	0,99	0,99	0,99	0,99	

Figura 3: Gráfico de inibição de invasão do merozoíto em hemácias infectadas pelo *P. falciparum*.

Valor de IC_{50} para anticorpo anti-rPfMSP-3 purificado e controle ART (Artemisinina), foi estimado por meio de regressão não linear (a). Foram utilizadas Hemácia Parasitada (0,5%) e Hemácias Normais (2%). Tabela de dados comparativos entre três experimentos distintos frente a tratamentos com anticorpos Anti-rPfMSP-3 e antibiótico ART (b).

Os anticorpos purificados demonstraram uma notável taxa de inibição de invasão, superando os 80%. Em contraste, MAZUMDAR e colaboradores (2010), inicialmente, avaliaram a taxa de inibição de invasão do merozoíto na proteína quimérica de MSP-19-MSP-3 onde essa proteína apresentou uma taxa de 75% de inibição. No mesmo estudo, após a deleção de anticorpos gerados referente a proteína quimérica, houve uma reversão na inibição do crescimento de apenas 23% para a proteína *Pf*MSP-3. Outro estudo, utilizando a proteína quimérica GLURP-MSP-3, desenvolvida por THEISEN et al. (2004), demonstrou ser capaz de induzir uma resposta imunológica específica contra esse antígeno híbrido, também foi capaz de reconhecer proteínas nativas do parasita *in vitro*. Contudo, os autores concluíram que a utilização de uma proteína híbrida como antígeno foi mais benéfica e eficaz em comparação com a imunização com as proteínas individuais separadas. Com isso, a *rPf*MSP-3 utilizada em nosso estudo, sugere uma eficácia elevada em relação ao teste de inibição *in vitro* dessa proteína.

Análise da resposta celular por meio da dosagem de citocinas séricas

A resposta imune celular dos animais imunizados foi realizada pela dosagem de citocinas utilizando o método de CBA, conforme detalhado na metodologia. Para essa análise, foi selecionado o grupo que demonstrou a maior reatividade na resposta humoral, ou seja, os animais imunizados com 10 µg/mL das proteínas *rPf*CSP e *rPf*MSP-3 (figura 4). Nas duas doses utilizadas, observou-se a produção de citocinas apenas em resposta à proteína *rPf*CSP. Durante todo o experimento, a proteína *rPf*MSP-3 não demonstrou significância estatística ($p > 0,05$) em comparação com o grupo controle negativo.

Na primeira imunização, apenas a citocina inflamatória TNF- α apresentou significância estatística (** $p < 0,01$) em relação ao grupo de controle negativo, composto por animais imunizados com PBS 1x, durante o período de 72 horas após a imunização com a *rPf*CSP. Por outro lado, as citocinas IFN- γ , IL-6, IL-17, IL-4, IL-10 e IL-2 não mostraram significância estatística ($p > 0,05$) em nenhum momento após a imunização (figura 4).

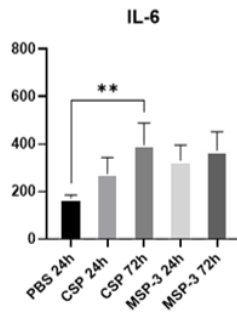
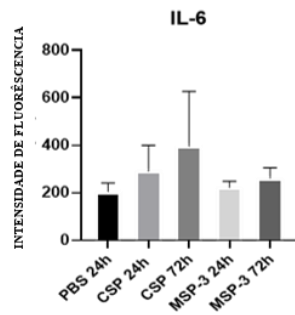
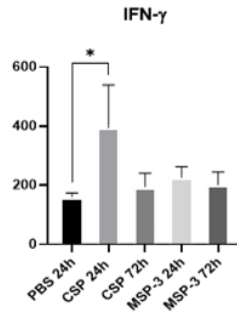
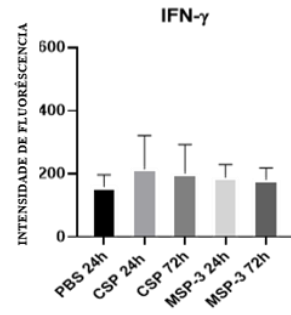
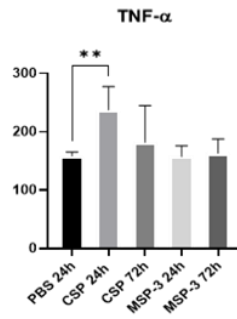
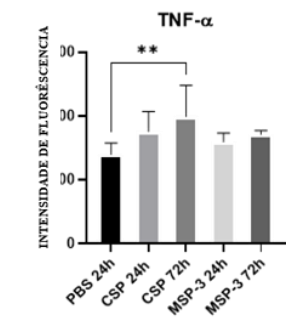
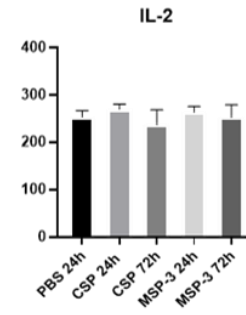
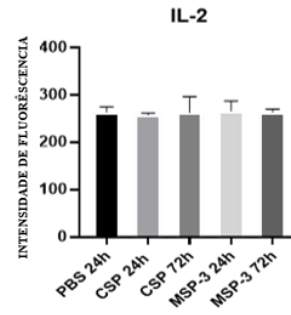
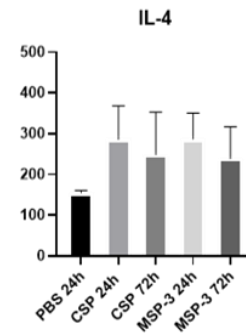
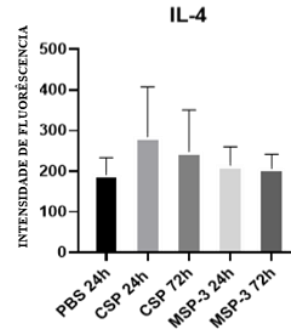
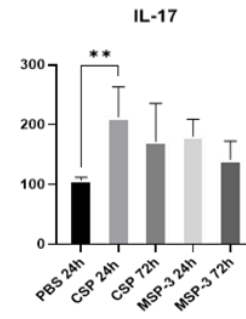
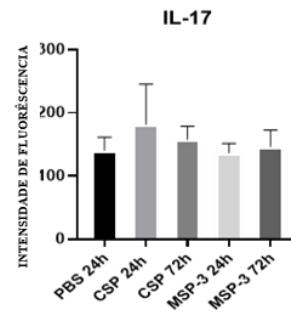
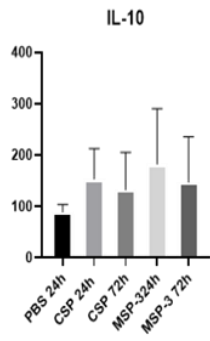
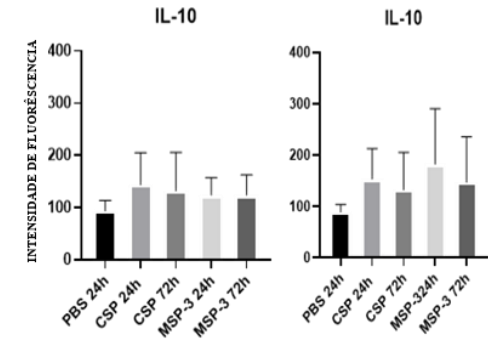
1^a Imunização2^a Imunização1^a Imunização2^a Imunização1^a Imunização2^a Imunização

Figura 4: Dosagem de citocinas séricas avaliadas por citometria de fluxo.

Níveis de citocinas de perfil Th1, Th2 e Th17 em amostras de animais imunizados com as proteínas recombinantes *rPfCSP* e *rPfMSP-3*. No eixo horizontal, estão representados os grupos imunizados controle: PBS 1x, e proteínas *rPfCSP* e *rPfMSP-3*. A intensidade de fluorescência é representada no eixo vertical. A significância estatística foi representada por asteriscos; * $p < 0,1$ ** $p < 0,01$.

As citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-17 demonstraram significância estatística 24 horas após a segunda imunização com a proteína *rPfCSP* (* $p < 0,1$ e ** $p < 0,01$). Em contrapartida com a resposta de TNF- α observada na primeira imunização, caracterizada por um aumento significativo na dosagem 72 horas após a administração inicial, na segunda imunização, o aumento na produção de TNF- α ocorreu 24 horas após a administração da dose de reforço do imunizante. Além disso, apenas a citocina IL-6 apresentou significância estatística (** $p < 0,01$) em comparação com o grupo controle, 72 horas após a segunda imunização. Esses achados corroboram com o estudo realizado por DEPINAY et al. (2011), que demonstrou que o TNF- α possui capacidade de inibir o desenvolvimento do parasita nos hepatócitos. Esse efeito inibitório parece estar relacionado principalmente à IL-6, que é secretada em resposta à estimulação pelo TNF- α (DEPINAY et al., 2011).

A dinâmica temporal da resposta imunológica observada neste estudo sugere uma regulação cuidadosa dos mediadores inflamatórios em resposta à imunização com *rPfCSP*. A rápida elevação do TNF- α após a segunda imunização pode ser um indicativo de uma ativação eficaz das células imunes envolvidas na resposta antiparasitária. Além disso, a presença de IL-6 em níveis significativos pode contribuir para a inibição do desenvolvimento do parasita, reforçando a importância da interação entre essas citocinas na proteção malária.

Além disso, os resultados obtidos em nosso estudo revelaram uma resposta predominantemente inflamatória, caracterizada principalmente pelo aumento sérico dos níveis de TNF- α e IFN- γ contra a *rPfCSP*. Esses resultados corroboram com as descobertas de OYEGUE-LIABAGUI et al. (2017), que investigaram o perfil de citocinas induzido em crianças infectadas com malária. De acordo com esse estudo, a presença de IFN- γ , em combinação com TNF- α , e IL-12 (citocina não dosada no presente estudo), inibe o crescimento do parasita, facilitando a atividade fagocítica do sistema imune (OYEGUE-LIABAGUI et al., 2017). Esse achado, sugere que a proteína *rPfCSP* utilizada nesse estudo, possui a capacidade de estimular sistema imunológico celular, induzindo uma resposta imune caracterizada pela produção de citocinas inflamatórias, TNF- α , IL-6 e IFN- γ .

Os nossos resultados indicam que a imunização com o antígeno *rPfCSP* estimula uma proteção inicial ao induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, observamos que ambas as proteínas avaliadas desencadearam uma resposta imune humoral, sendo que a *rPfCSP* se destacou ao apresentar um perfil de resposta humoral e celular significativo. Além disso, estudos futuros poderão realizar o acompanhamento dos animais imunizados com as proteínas recombinantes, com mais doses de reforços, a fim de obter um entendimento mais aprofundado do perfil de citocinas expressas nesse estudo. Essas descobertas, somadas aos dados já existentes na literatura, reforçam a possibilidade de induzir uma resposta imune sistêmica por meio das mucosas. Isso justifica investigações futuras sobre vacinas promissoras contra a malária administradas por via oral ou intranasal.

Contudo, é crucial aprofundar nosso entendimento sobre a imunogenicidade da proteína *rPfMSP-3* em relação à resposta humoral. Além disso, estudos subsequentes são essenciais para uma análise mais detalhada da imunogenicidade e antigenicidade dos antígenos examinados neste estudo, quando administrados via intranasal em camundongos.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, P. et al. Host-parasite interactions in human malaria: Clinical implications of basic research. **Frontiers in Microbiology**, 2017.
- AGGARWAL, A. et al. Oral Salmonella: malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8⁺ cytotoxic T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 4, p. 1083, 10 out. 1990.
- ALVES, K. C. S. et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 as a vaccine candidate: a brief review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 64, 2022.
- AMINO, R. et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine** 2006 **12:2**, v. 12, n. 2, p. 220–224, 22 jan. 2006.
- AMORIM, K. N. S. et al. Dendritic cells and their multiple roles during malaria infection. **Journal of Immunology Research Hindawi Publishing Corporation**, 2016.
- ARAKAWA, T. et al. Nasal immunization with a malaria transmission-blocking vaccine candidate, Pfs25, induces complete protective immunity in mice against field isolates of *Plasmodium falciparum*. **Infection and immunity**, v. 73, n. 11, p. 7375–7380, nov. 2005.
- ARORA, N.; C ANBALAGAN, L.; PANNU, A. K. Towards Eradication of Malaria: Is the WHO's RTS,S/AS01 Vaccination Effective Enough? **Risk management and healthcare policy**, v. 14, p. 1033–1039, 2021.
- BALLOU, W. R. The development of the RTS,S malaria vaccine candidate: challenges and lessons. **Parasite immunology**, v. 31, n. 9, p. 492–500, set. 2009.
- BANSAL, G. P.; KUMAR, N. Immune Responses in Malaria Transmission. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 38–44, 1 mar. 2018.
- BARGIERI, D. Y. et al. Adjuvant requirement for successful immunization with recombinant derivatives of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 delivered via the intranasal route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 313–318, 2007.
- BARR, P. J. et al. Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 5, p. 1203–1208, 1 nov. 1991.

BASU, S.; SAHI, P. K. Malária: An Update. **Indian journal of pediatrics**, v. 84, n. 7, p. 521–528, jul. 2017.

BEESON, J. G. et al. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. **FEMS Microbiology Reviews**, 2016a.

BEESON, J. G. et al. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 3, p. 343–372, 1 maio 2016b.

BELACHEW, E. B. Immune Response and Evasion Mechanisms of *Plasmodium falciparum* Parasites. **Journal of Immunology Research** Hindawi Limited, , 2018.

BÉLARD, S. et al. A Randomized Controlled Phase Ib Trial of the Malaria Vaccine Candidate GMZ2 in African Children. **PLOS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22525, 2011.

BELETE, T. M. Recent progress in the development of new antimalarial drugs with novel targets. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 3875–3889, 2020.

BERGMANN-LEITNER, E. S. et al. Computational and Experimental Validation of B and T-Cell Epitopes of the *In vivo* Immune Response to a Novel Malarial Antigen. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 16 ago. 2013.

BEZERRA, J. M. T. et al. Changes in malaria patterns in Brazil over 28 years (1990-2017): Results from the Global Burden of Disease Study 2017. **Population Health Metrics**, v. 18, 30 set. 2020.

BHANDARI, S. et al. Transcriptome and proteome profiling reveal complementary scavenger and immune features of rat liver sinusoidal endothelial cells and liver macrophages. **BMC Molecular and Cell Biology**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2020.

BHAT, A. A. et al. Induction of mucosal and systemic humoral immune responses in murine system by intranasal immunization with peptide antigens of *P. vivax* and CpG oligodeoxynucleotide (ODN) in microparticle delivery. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 10, p. 1197–1208, 1 set. 2009.

BONANNI, V. et al. Bone marrow NK cells: Origin, distinctive features, and requirements for tissue localization. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JULY, p. 470592, 10 jul. 2019.

BOYLE, M. J. et al. Human Antibodies Fix Complement to Inhibit *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes and Are Associated with Protection against Malaria. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 580, 3 mar. 2015.

BOYLE, M. J.; WILSON, D. W.; BEESON, J. G. New approaches to studying *Plasmodium falciparum* merozoite invasion and insights into invasion biology. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 1, p. 1–10, 1 jan. 2013.

BUCŞAN, A. N.; WILLIAMSON, K. C. Setting the stage: The initial immune response to blood-stage parasites. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 88, 1 jan. 2020.

BURGESS, B. R.; SCHUCK, P.; GARBOCZI, D. N. Dissection of merozoite surface protein 3, a representative of a family of *Plasmodium falciparum* surface proteins, reveals an oligomeric and highly elongated molecule. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 44, p. 37236–37245, 4 nov. 2005.

BUTLER, N. S.; SCHMIDT, N. W.; HARTY, J. T. Differential Effector Pathways Regulate Memory CD8 T Cell Immunity against *Plasmodium berghei* versus *P. yoelii* Sporozoites . **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 5, p. 2528–2538, 1 mar. 2010.

CAI, J. et al. Whole-Killed Blood-Stage Vaccine: Is It Worthwhile to Further Develop It to Control Malaria? **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 670775, 2021.

CARAPAU, D. et al. Protective humoral immunity elicited by a needle-free malaria vaccine comprised of a chimeric *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein and a Toll-like receptor 5 agonist, flagellin. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 12, p. 4350–4362, 2013.

CECH, P. G. et al. Virosome-formulated plasmodium falciparum AMA-1 & CSP derived peptides as malaria vaccine: Randomized phase 1b trial in semi-immune adults & children. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

CHAKRAVARTY, S. et al. CD8 + T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. 2007.

CHAUHAN, V. S.; YAZDANI, S. S.; GAUR, D. Malaria vaccine development based on merozoite surface proteins of *Plasmodium falciparum*. **Human Vaccines Landes Bioscience**, 2010.

CIRIMOTICH, C. M. et al. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. **Developmental and comparative immunology**, v. 34, n. 4, p. 387, abr. 2010.

CLARK, I. A. et al. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. **Malaria Journal**, v. 5, p. 85, 10 out. 2006.

CLYDE, D. F. et al. Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria. **The American journal of the medical sciences**, v. 266, n. 3, p. 169–177, set. 1973.

COHEN, J. et al. From the circumsporozoite protein to the RTS, S/AS candidate vaccine. **Human vaccines**, v. 6, n. 1, p. 90–96, jan. 2010.

COLLINS, K. A. et al. Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine. **Scientific reports**, v. 7, p. 46621, abr. 2017.

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, fev. 2011.

COWMAN, A. F. et al. Malaria: Biology and Disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610–624, 20 out. 2016.

COWMAN, A. F. et al. Antigens as Targets of Protective Human Identification and Prioritization of Merozoite. 2022.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, 2006.

COX, F. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasites and Vectors. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 5, 2010.

CZERKINSKY, C.; HOLMGREN, J. Mucosal delivery routes for optimal immunization: Targeting immunity to the right tissues. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 2012.

DATOO, M. S. et al. Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. **Lancet (London, England)**, v. 397, n. 10287, p. 1809–1818, maio 2021.

DATOO, M. S. et al. Efficacy and immunogenicity of R21/Matrix-M vaccine against clinical malaria after 2 years' follow-up in children in Burkina Faso: a phase 1/2b randomised controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, 7 set. 2022.

DE ALMEIDA, M. E. M. et al. Circumsporozoite surface protein-based malaria vaccines: A review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2021.

DE ALMEIDA, M. E. M. et al. Bacillus subtilis spores as delivery system for nasal *Plasmodium falciparum* circumsporozoite surface protein immunization in a murine model. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

DEMANGA, C. G. et al. Toward the Rational Design of a Malaria Vaccine Construct Using the MSP3 Family as an Example: Contribution of Antigenicity Studies in Humans. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 486, jan. 2010.

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, p. e17464, 2011.

DEROOST, K. et al. The immunological balance between host and parasite in malaria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 2, p. 208–257, 1 mar. 2016.

DESHMUKH, A. et al. *Plasmodium falciparum* MSP3 Exists in a Complex on the Merozoite Surface and Generates Antibody Response during Natural Infection. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 8, 1 ago. 2018.

DOBBS, K. R.; CRABTREE, J. N.; DENT, A. E. Innate immunity to malaria—The role of monocytes. **Immunological Reviews** Blackwell Publishing Ltd, 1 jan. 2020.

DOOLAN, D. L. *Plasmodium* Immunomics. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 1, p. 3, jan. 2011.

DOOLAN, D. L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J. K. Acquired Immunity to Malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 13, jan. 2009.

DRUILHE, P. et al. A Malaria Vaccine That Elicits in Humans Antibodies Able to Kill *Plasmodium falciparum*. **PLoS Medicine**, v. 2, n. 11, p. 1135–1144, nov. 2005.

DUPS, J. N.; PEPPER, M.; COCKBURN, I. A. Antibody and B cell responses to *Plasmodium* sporozoites. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. NOV, p. 117132, 18 nov. 2014.

EDILENE, M.; ALMEIDA, M. DE. Circumsporozoite Surface Protein-based malaria vaccines: a review. n. May 2020, p. 1–9, 2021.

Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: Final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. **The Lancet**, v. 386, n. 9988, p. 31–45, 4 jul. 2015.

EGAN, T. J. Haemozoin formation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 157, n. 2, p. 127–136, 1 fev. 2008.

EJIGIRI, I.; SINNIS, P. *Plasmodium* sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. **Current Opinion in Microbiology**, 2009.

ELLIS, R. D. et al. Blood stage vaccines for *Plasmodium falciparum*: Current status and the way forward. **Human Vaccines**, v. 6, n. 8, p. 627, 2010.

ESCALANTE, A. A.; LAL, A. A.; AYALA, F. J. Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Genetics**, v. 149, n. 1, p. 189–202, maio 1998.

ESEN, M. et al. Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. **Vaccine**, v. 27, n. 49, p. 6862–6868, 16 nov. 2009.

FERREIRA, M. U.; DA SILVA NUNES, M.; WUNDERLICH, G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 11, n. 6, p. 987–995, nov. 2004.

FLORENS, L. et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 520–526, 3 out. 2002.

FLORES-GARCIA, Y. et al. The *P. falciparum* CSP repeat region contains three distinct epitopes required for protection by antibodies in vivo. **PLoS pathogens**, v. 17, n. 11, p. e1010042, nov. 2021.

FOLEGATTI, P. M. et al. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: Insights into immunological markers for exposure and protection. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–15, 7 mar. 2017.

FONG, K. Y.; WRIGHT, D. W. Hemozoin and antimalarial drug discovery. **Future medicinal chemistry**, v. 5, n. 12, p. 1437, ago. 2013.

GARCÍA, A.; DE SANCTIS, J. B. An overview of adjuvant formulations and delivery systems. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 122, n. 4, p. 257–267, 2014.

GARCIA, J. E.; PUENTES, A.; PATARROYO, M. E. Developmental Biology of Sporozoite-Host Interactions in *Plasmodium falciparum* Malaria: Implications for Vaccine Design. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 4, p. 686, out. 2006.

GARÇON, N.; VAN MECHELEN, M. Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing adjuvant systems. **Expert review of vaccines**, v. 10, n. 4, p. 471–486, abr. 2011.

GARDNER, M. J. et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 498–511, 2002.

GAUR, D.; MAYER, D. C. G.; MILLER, L. H. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 13–14, p. 1413–1429, dez. 2004.

GAZZINELLI, R. T. et al. Innate sensing of malaria parasites. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 11, p. 744–757, 1 jan. 2014.

GOMES, P. S. et al. Immune Escape Strategies of Malaria Parasites. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 1617, 17 out. 2016.

GORDON, D. M. et al. Safety, Immunogenicity, and Efficacy of a Recombinantly Produced *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein-Hepatitis B Surface Antigen Subunit Vaccine. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 6, p. 1576–1585, 1 jun. 1995.

GOSLING, R.; VON SEIDLEIN, L. The Future of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine: An Alternative Development Plan. **PLoS medicine**, v. 13, n. 4, p. e1001994, abr. 2016.

GOWDA, D. C.; WU, X. Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. **Frontiers in immunology**, v. 9, 19 dez. 2018.

GRAEWE, S. et al. Chronicle of a death foretold: *Plasmodium* liver stage parasites decide on the fate of the host cell. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 1, p. 111–130, 1 jan. 2012.

GRAUMANS, W. et al. When is a *Plasmodium*-infected mosquito an infectious mosquito? **Trends in parasitology**, v. 36, n. 8, p. 705, 1 ago. 2020.

GREENWOOD, B.; TARGETT, G. Do we still need a malaria vaccine? **Parasite Immunology**, v. 31, n. 9, p. 582–586, 2009.

HERMES, S. C. N. M. et al. Aspectos Epidemiológicos Da Malária Humana No Município De Aripuanã, Estado De Mato Grosso, Brasil, 2005 a 2010. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 9, n. 17, p. 42–51, 2013.

HERRERA, R. et al. Reversible conformational change in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein masks Its adhesion domains. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 10, p. 3771–3780, 2015.

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

HILL, A. V. S. Vaccines against malaria. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 366, n. 1579, p. 2806–2814, 2011.

HISAEDA, H.; YASUTOMO, K.; HIMENO, K. Malaria: immune evasion by parasites. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 4, p. 700–706, 1 abr. 2005.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature Medicine**, v. 11, n. 4S, p. S45, 2005.

HOPP, C. S.; SINNIS, P. The innate and adaptive response to mosquito saliva and *Plasmodium* sporozoites in the skin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1342, n. 1, p. 37–43, 1 abr. 2015.

HUBER, W. et al. Limited sequence polymorphism in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 87, n. 2, p. 231–234, 1 ago. 1997.

HULDEN, L.; HULDEN, L. Activation of the hypnozoite: A part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. **Malaria Journal**, 2011.

IMAM, M. et al. *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 3: OLIGOMERIZATION, SELF-ASSEMBLY, AND HEME COMPLEX FORMATION*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 7, p. 3856, 2 fev. 2014.

JELÍNKOVÁ, L. et al. An epitope-based malaria vaccine targeting the junctional region of circumsporozoite protein. **npj Vaccines**, v. 6, n. 1, 1 dez. 2021.

JEPSEN, M. P. G. et al. The malaria vaccine candidate GMZ2 elicits functional antibodies in individuals from malaria endemic and non-endemic areas. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 3, p. 479–488, 1 ago. 2013.

KAR, N. P. et al. A review of malaria transmission dynamics in forest ecosystems. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, 9 jun. 2014.

KASLOW, D. C.; BIERNAUX, S. RTS,S: Toward a first landmark on the Malaria Vaccine Technology Roadmap. **Vaccine**, v. 33, n. 52, p. 7425–7432, 22 dez. 2015.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology** 2010 11:5, v. 11, n. 5, p. 373–384, 20 abr. 2010.

KOCH, M.; BAUM, J. The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte – towards a reassessment of the host cell contribution. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 319, 1 mar. 2016.

KOJIN, B. B. et al. Endogenously-expressed NH2-terminus of circumsporozoite protein interferes with sporozoite invasion of mosquito salivary glands. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, 10 mar. 2016.

KRISHNEGOWDA, G. et al. Induction of Proinflammatory Responses in Macrophages by the Glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8606–8616, mar. 2005.

KURUP, S. P.; BUTLER, N. S.; HARTY, J. T. T cell-mediated immunity to malaria. **Nature reviews. Immunology**, v. 19, n. 7, p. 457, 1 jul. 2019.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **The Journal of Parasitology**, v. 65, n. 3, p. 418–420, 1 jun. 1979.

LANGHORNE, J. et al. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nature immunology**, v. 9, n. 7, p. 725–732, jul. 2008.

LAURENS, M. B. RTS,S/AS01 vaccine (MosquirixTM): an overview. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 16, n. 3, p. 480, 2020.

LAVELLE, E. C.; WARD, R. W. Mucosal vaccines — fortifying the frontiers. **Nature Reviews Immunology** 2021 22:4, v. 22, n. 4, p. 236–250, 26 jul. 2021.

LIEHL, P.; MOTA, M. M. Innate recognition of malarial parasites by mammalian hosts. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 6, p. 557–566, 15 maio 2012.

LIMA-JUNIOR, J. DA C.; PRATT-RICCIO, L. R. Major Histocompatibility Complex and Malaria: Focus on *Plasmodium vivax* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. JAN, p. 1, 2016.

LIN, C. S. et al. Multiple *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 Complexes Mediate Merozoite Binding to Human Erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 14, p. 7703–7715, 1 abr. 2016.

LORENZ, V.; KARANIS, G.; KARANIS, P. Malaria vaccine development and how external forces shape it: an overview. **International journal of environmental research and public health**, v. 11, n. 7, p. 6791–6807, jun. 2014.

LOZANO, J. M. et al. The Search of a Malaria Vaccine: The Time for Modified Immuno-Potentiating Probes. **Vaccines**, v. 9, n. 2, fev. 2021.

LUMSDEN, J. M. et al. Evaluation of immune responses to a *Plasmodium vivax* CSP-based recombinant protein vaccine candidate in combination with second-generation adjuvants in mice. **Vaccine**, v. 30, n. 22, p. 3311–3319, 9 maio 2012.

LUZOLO, A. L.; NGOYI, D. M. Cerebral malaria. **Brain research bulletin**, v. 145, p. 53–58, 1 fev. 2019.

LYCKE, N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. **Nature reviews. Immunology**, v. 12, n. 8, p. 592–605, ago. 2012.

MAC-DANIEL, L. et al. Local Immune Response to Injection of *Plasmodium* Sporozoites into the Skin. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 3, p. 1246–1257, 1 ago. 2014.

MAHMOUDI, S.; KESHAVARZ, H. Efficacy of phase 3 trial of RTS, S/AS01 malaria vaccine: The need for an alternative development plan. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 13, n. 9, p. 2098–2101, set. 2017.

MANDALA, W. L. et al. The role of different components of the immune system against *Plasmodium falciparum* malaria: Possible contribution towards malaria vaccine development. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 246, 2021.

MARSHALL, J. S. et al. An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v. 14, n. 2, p. 1–10, 12 set. 2018.

MARTINEZ-ESPINOSA, I.; SERRATO, J. A.; ORTIZ-QUINTERO, B. Role of IL-10-Producing Natural Killer Cells in the Regulatory Mechanisms of Inflammation during Systemic Infection. **Biomolecules**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2022.

MATUSCHEWSKI, K. Vaccines against malaria-still a long way to go. **The FEBS journal**, v. 284, n. 16, p. 2560–2568, ago. 2017.

MAUDUIT, M. et al. Dendritic cells and the malaria pre-erythrocytic stage. **Immunologic Research**, v. 53, n. 1–3, p. 115–126, set. 2012.

MAZUMDAR, S. et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1)-MSP-3 chimeric protein: Immunogenicity determined with human-compatible adjuvants and induction of protective immune response. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 2, p. 872–883, fev. 2010.

MCCOLL, D. J. et al. Molecular variation in a novel polymorphic antigen associated with *Plasmodium falciparum* merozoites. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 68, n. 1, p. 53–67, 1994.

MCCOLL, D. J.; ANDERS, R. F. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). **Molecular and biochemical parasitology**, v. 90, n. 1, p. 21–31, 1 dez. 1997.

MILLER, L. H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature medicine**, v. 19, n. 2, p. 156–167, fev. 2013.

MILNER, D. A. Malaria Pathogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 1, p. a025569, 2018.

MIQUEL-CLOPÉS, A. et al. Mucosal vaccines and technology. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 196, p. 205–214, 2019.

MIRZOHREH, S. T. et al. Malaria prevalence in HIV-positive children, pregnant women, and adults: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & vectors**, v. 15, n. 1, p. 324, 1 dez. 2022.

MOHANDAS, N.; AN, X. Malaria and Human Red Blood Cells. **Medical microbiology and immunology**, v. 201, n. 4, p. 593, 2012.

MOORE, L. R. et al. Hemoglobin degradation in malaria-infected erythrocytes determined from live cell magnetophoresis. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 6, p. 747, abr. 2006.

MORIS, P.; JONGERT, E.; VAN DER MOST, R. G. Characterization of T-cell immune responses in clinical trials of the candidate RTS,S malaria vaccine. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1381809>, v. 14, n. 1, p. 17–27, 2 jan. 2017.

NADEEM, A. Y. et al. Mosquirix™ RTS, S/AS01 Vaccine Development, Immunogenicity, and Efficacy. **Vaccines**, v. 10, n. 5, 1 maio 2022.

NEUTRA, M. R.; KOZLOWSKI, P. A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 2, p. 148–158, fev. 2006.

NGANOU-MAKAMDOP, K. et al. Long term protection after immunization with *P. berghei* sporozoites correlates with sustained IFN γ responses of hepatic CD8⁺ memory t cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 1 maio 2012.

OEUVRAY, C. et al. A novel merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP-3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89 Suppl 2, p. 77–80, 1994.

OLOTU, A. et al. Seven-Year Efficacy of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine among Young African Children. **The New England journal of medicine**, v. 374, n. 26, p. 2519, 6 jun. 2016.

OUATTARA, A.; LAURENS, M. B. Vaccines against malaria. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 60, n. 6, p. 930–936, 15 mar. 2015.

OYEGUE-LIABAGUI, S. L. et al. Pro-and anti-inflammatory cytokines in children with malaria in Franceville, Gabon. **American Journal of Clinical and Experimental Immunology**, v. 6, n. 2, p. 9, 2017.

PATTARADILOKRAT, S. et al. Genetic diversity of the merozoite surface protein-3 gene in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 21 out. 2016.

PENNY, M. A. et al. The public health impact of malaria vaccine RTS,S in malaria endemic Africa: country-specific predictions using 18 month follow-up Phase III data and simulation models. **BMC medicine**, v. 13, p. 170, jul. 2015.

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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 29, p. 26784–26791, 20 jul. 2001.

PLASSMEYER, M. L. et al. Structure of the *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein, a Leading Malaria Vaccine Candidate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 39, p. 26951–26963, 25 set. 2009.

PRAET, N. et al. Assessing the safety, impact and effectiveness of RTS,S/AS01 E malaria vaccine following its introduction in three sub-Saharan African countries: methodological approaches and study set-up. **Malaria Journal**, v. 2022, n. 1, p. 132, 2022.

PRATT-RICCIO, L. R. et al. Synthetic Antigens Derived from *Plasmodium falciparum* Sporozoite, Liver, and Blood Stages: Naturally Acquired Immune Response and Human Leukocyte Antigen Associations in Individuals Living in a Brazilian Endemic Area. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 97, n. 5, p. 1581–1592, 2017.

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, nov. 2006.

QUINTERO, J. P. et al. Malaria-related anaemia: a Latin American perspective. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 91–104, ago. 2011.

RADTKE, A. J. et al. Lymph-Node Resident CD8 α ⁺ Dendritic Cells Capture Antigens from Migratory Malaria Sporozoites and Induce CD8⁺ T Cell Responses. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 2, 2015.

RANDOLPH, G. J.; ANGELI, V.; SWARTZ, M. A. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 8, p. 617–628, ago. 2005.

REEDER, S. M. et al. Strategic Variants of CSP Delivered as SynDNA Vaccines Demonstrate Heterogeneity of Immunogenicity and Protection from *Plasmodium* Infection in a Murine Model. **Infection and immunity**, v. 89, n. 10, 1 out. 2021.

RICHARDS, J. S. et al. Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria for vaccine and biomarker development. **Journal of immunology**, v. 191, n. 2, p. 795–809, jul. 2013.

RICHARDS, J. S.; BEESON, J. G. The future for blood-stage vaccines against malaria. **Immunology and cell biology**, v. 87, n. 5, p. 377–390, jul. 2009.

RILEY, E. M.; STEWART, V. A. **Immune mechanisms in malaria: New insights in vaccine development. Nature Medicine**, fev. 2013.

RONO, M. K. et al. Adaptation of *Plasmodium falciparum* to its transmission environment. **Nature ecology & evolution**, v. 2, n. 2, p. 377, 2 fev. 2018.

SADOFF, J. C. et al. Oral *Salmonella typhimurium* Vaccine Expressing Circumsporozoite Protein Protects Against Malaria. **Science**, v. 240, n. 4850, p. 336–338, 1988.

SARKAR, I.; GARG, R.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Selection of adjuvants for vaccines targeting specific pathogens. **Expert Review of Vaccines**, v. 18, n. 5, p. 505, 4 maio 2019.

SATO, S. Correction to: *Plasmodium*—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology (Journal of Physiological Anthropology, (2021), 40, 1, (1), 10.1186/s40101-020-00251-9). **Journal of Physiological Anthropology**, v. 40, n. 1, p. 1–13, 2021.

SAUERWEIN, R. W. Clinical malaria vaccine development. **Immunology letters**, v. 122, n. 2, p. 115–117, fev. 2009.

SCALLY, S. W. et al. Rare PfCSP C-terminal antibodies induced by live sporozoite vaccination are ineffective against malaria infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 1, p. 63–75, 1 jan. 2018.

SCHWENDENER, R. A. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. **Therapeutic Advances in Vaccines**, v. 2, n. 6, p. 159, 1 jan. 2014.

SINGH, M. et al. Proteome Analysis of *Plasmodium falciparum* Extracellular Secretory Antigens at Asexual Blood Stages Reveals a Cohort of Proteins with Possible Roles in Immune Modulation and Signaling . **Molecular & Cellular Proteomics**, 2009.

SINGH, S. et al. A Conserved Multi-Gene Family Induces Cross-Reactive Antibodies Effective in Defense against *Plasmodium falciparum*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, 30 abr. 2009.

SINNIS, P.; NARDIN, E. Sporozoite antigens: biology and immunology of the circumsporozoite protein and thrombospondin-related anonymous protein. **Chemical immunology**, v. 80, p. 70–96, 2002.

SINNIS, P.; ZAVALA, F. The skin: where malaria infection and the host immune response begin. **Seminars in immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 787–792, nov. 2012.

SIRIMA, S. B. et al. A phase 2b randomized, controlled trial of the efficacy of the GMZ2 malaria vaccine in African children. **Vaccine**, v. 34, n. 38, p. 4536–4542, 31 ago. 2016.

SKWARCZYNSKI, M. et al. Progress in the Development of Subunit Vaccines against Malaria. **Vaccines**, v. 8, n. 3, jul. 2020.

SNOW, R. W. et al. Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa. **Lancet**, v. 349, n. 9066, p. 1650–1654, 7 jun. 1997.

SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 3, p. 317–332, 1998.

SONKO, S. T. et al. Does socio-economic status explain the differentials in malaria parasite prevalence? Evidence from The Gambia. **Malaria journal**, v. 13, p. 449, nov. 2014.

STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology** 2004 4:3, v. 4, n. 3, p. 169–180, 2004.

STOUTE, J. A. et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. **The New England journal of medicine**, v. 336, n. 2, p. 86–91, 9 jan. 1997.

SYED, Y. Y. RTS,S/AS01 malaria vaccine (Mosquirix®): a profile of its use. **Drugs and Therapy Perspectives**, v. 38, n. 9, p. 373–381, 1 set. 2022.

TAKALA, S. L.; PLOWE, C. V. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing, and efficacy: Preventing and overcoming “vaccine resistant malaria”. **Parasite immunology**, v. 31, n. 9, p. 560, set. 2009.

TAMURA, S.-I.; KURATA, T. Defense Mechanisms against Influenza Virus Infection in the Respiratory Tract Mucosa. **Jpn. J. Infect. Dis**, v. 57, p. 236–247, 2004.

TAVARES, J. et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 5, p. 905–915, maio 2013.

TEIXEIRA, A. R. et al. Immunization with CSP and a RIG-I Agonist is Effective in Inducing a Functional and Protective Humoral Response Against *Plasmodium*. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 20 maio 2022.

TEWARI, R. et al. Function of region I and II adhesive motifs of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in sporozoite motility and infectivity. **Journal of Biological Chemistry**, 2002.

THATHY, V. et al. Levels of circumsporozoite protein in the *Plasmodium* oocyst determine sporozoite morphology. **EMBO Journal**, 2002.

THEISEN, M. et al. The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro. **Infection and immunity**, v. 66, n. 1, p. 11–17, 1998.

THEISEN, M. et al. A *Plasmodium falciparum* GLURP–MSP3 chimeric protein; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies. **Vaccine**, v. 22, n. 9–10, p. 1188–1198, 12 mar. 2004.

TINTO, H. et al. Long-term incidence of severe malaria following RTS,S/AS01 vaccination in children and infants in Africa: an open-label 3-year extension study of a phase 3 randomised controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 8, p. 821–832, 1 ago. 2019.

TLAXCA, J. L.; ELLIS, S.; REMMELE, R. L. Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: Potential and challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 93, p. 56–78, 1 out. 2015.

TORRE, D.; SPERANZA, F.; MARTEGANI, R. Role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 12, p. 719–720, 1 dez. 2002.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673–675, 1976.

TSAI, C. W. et al. Characterization of a protective *Escherichia coli*-expressed *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 indicates a non-linear, multi-domain structure. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 164, n. 1, p. 45, mar. 2009.

TUJU, J. et al. Vaccine candidate discovery for the next generation of malaria vaccines. **Immunology**, v. 152, n. 2, p. 195–206, out. 2017.

TUTEJA, R. Malaria - An overview. **FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4670–4679, 2007.

TUTEJA, R. Introduction to the Special Issue on Malaria. **The FEBS Journal**, v. 284, n. 16, p. 2550–2552, 2017.

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, 1 ago. 2004.

VENUGOPAL, K. et al. Plasmodium asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. **Nature Reviews Microbiology** 2020 **18:3**, v. 18, n. 3, p. 177–189, 9 jan. 2020.

WANG, S. et al. Intranasal and oral vaccination with protein-based antigens: advantages, challenges and formulation strategies. **Protein & Cell**, v. 6, n. 7, p. 480, 1 jul. 2015.

WHITE, M. T. et al. Immunogenicity of the RTS,S/AS01 malaria vaccine and implications for duration of vaccine efficacy: Secondary analysis of data from a phase 3 randomised controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 12, p. 1450–1458, 1 dez. 2015.

WHITE, N. J. Severe malaria. **Malaria Journal** 2022 **21:1**, v. 21, n. 1, p. 1–17, 6 out. 2022.

WOEHLBIER, U. et al. Analysis of antibodies directed against merozoite surface protein 1 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1313–1322, fev. 2006.

WOLF, A. S.; SHERRATT, S.; RILEY, E. M. NK Cells: Uncertain Allies against Malaria. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAR, p. 1, 9 mar. 2017.

WOOD, E. J. Molecular cloning. A laboratory manual by T Maniatis, E F Fritsch and J Sambrook. pp 545. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1982. \$48 ISBN 0-87969-136-0. **Biochemical Education**, v. 11, n. 2, p. 82–82, 1 abr. 1983.

XUAN, K. M. et al. The role of monocytes in malaria infection. **Central European Journal of Immunology**, v. 48, n. 1, p. 54–62, 2023.

YAMAUCHI, L. M. et al. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1215–22, maio 2007.

YAMAUCHI LUCY M., L. M. et al. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1215–1222, maio 2007.

YOSHIDA, N. et al. Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. **Science**, 1980.

YOUNG, J. F. et al. Expression of *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Proteins in *Escherichia coli* for Potential Use in a Human Malaria Vaccine. **Science**, v. 228, n. 1–5, 1985.

ZAVALA, F. et al. Circumsporozoite proteins of malaria parasites contain a single immunodominant region with two or more identical epitopes. **The Journal of experimental medicine**, v. 157, n. 6, p. 1947–1957, 1 jun. 1983.

ZAVALA, F. et al. Rationale for development of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. **Science**, v. 228, n. 4706, p. 1436–1440, jun. 1985.

ZHANG, L.; WANG, W.; WANG, S. Effect of Vaccine Administration Modality on Immunogenicity and Efficacy. **Expert review of vaccines**, v. 14, n. 11, p. 1509, 2 nov. 2015.

ZHAO, J. et al. A comprehensive analysis of *Plasmodium* circumsporozoite protein binding to hepatocytes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2016.

ZHU, J. et al. Proinflammatory responses by glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of *Plasmodium falciparum* are mainly mediated through the recognition of TLR2/TLR1. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 3, p. 205–211, jul. 2011.

ZHU, J.; KRISHNEGOWDA, G.; GOWDA, D. C. Induction of Proinflammatory Responses in Macrophages by the Glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8617–8627, mar. 2005.

MATERIAL COMPLEMENTAR

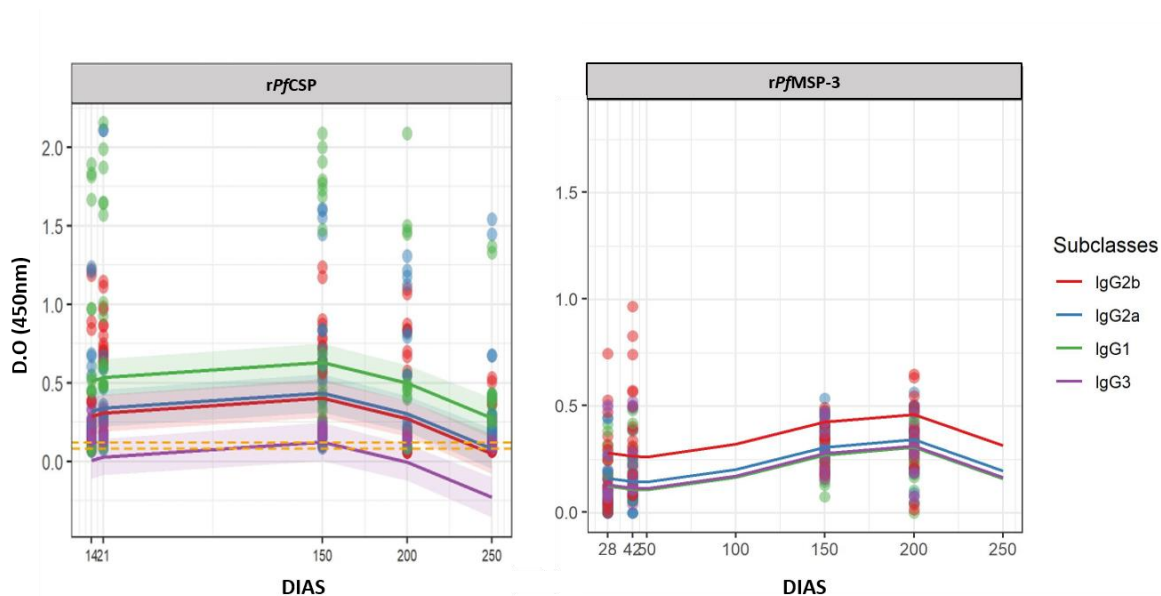


Figura 1: Análise das subclasses de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) quantificadas em animais imunizados com 10 µg/mL das proteínas rPfCSP e rPfMSP-3. Cada ponto corresponde a DO média de cada animal. Eixo X = densidade óptica (450 nm), eixo Y = dias de coleta sanguínea dos animais estudados

5. CONCLUSÃO GERAL

- A expressão e purificação das proteínas *rPfCSP* e *rPfMSP-3* foram realizadas com sucesso. Essas proteínas apresentaram um tamanho aproximado de 33 kDa;
- As proteínas *rPfCSP* e *rPfMSP-3* foram capazes de gerar uma resposta imune humoral significativa. Essa resposta foi observada quando os animais foram imunizados com as concentrações de 2 µg/mL e 10µg/mL das proteínas, indicando que ambas as concentrações foram igualmente eficazes em estimular uma resposta humoral. No entanto, concentrações mais baixas (0,2 µg/mL e 0,02 µg/mL) não apresentaram resposta significativa. Isso sugere que, para futuras estratégias vacinais, as concentrações de 2 µg/mL e 10 µg/mL dessas proteínas são as mais promissoras;
- Os anticorpos gerados anti-*rPfMSP-3* neste estudo, apresentaram a capacidade de reconhecer a proteína nativa de *P. falciparum*. A capacidade desses anticorpos de reconhecer e inibir a invasão do merozoíto em hemácias é um achado significativo e promissor, indicando um alto poder imunogênico e antigênico da proteína *rPfMSP-3* utilizada neste estudo.
- A análise da resposta celular indica um perfil pró-inflamatório, caracterizado por uma significativa produção de citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-17 contra a proteína *rPfCSP*. Essas citocinas desempenham funções cruciais na defesa contra a infecção pelo *Plasmodium*, promovendo o recrutamento de células de defesa e ativando o perfil de resposta imune do tipo Th1 e Th17. Essa resposta imune pró-inflamatória desempenha um papel fundamental na eliminação eficaz do parasita e na proteção contra a malária.
- Os resultados deste estudo indicam que ambas as proteínas avaliadas foram capazes de desencadear uma resposta imune humoral. A proteína *rPfCSP* demonstrou ser a mais imunogênica neste estudo, provocando respostas significativas tanto a nível humoral quanto celular. Além disso, os dados apresentados neste estudo, aliados às descobertas encontradas na literatura, fortalecem a perspectiva de induzir uma resposta imune sérica por via de mucosa, mesmo quando se trata de antígenos sistêmicos. Esse cenário justifica e ressalta a importância de continuar estudos que visem vias de mucosas intranasal ou oral frente a patógenos sistêmicos.

6. REFERÊNCIAS

- ACHARYA, P. et al. Host-parasite interactions in human malaria: Clinical implications of basic research. **Frontiers in Microbiology**, 2017.
- AGGARWAL, A. et al. Oral Salmonella: malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8⁺ cytotoxic T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 4, p. 1083, 10 out. 1990.
- ALVES, K. C. S. et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 as a vaccine candidate: a brief review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 64, 2022.
- AMINO, R. et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine** 2006 **12:2**, v. 12, n. 2, p. 220–224, 22 jan. 2006.
- AMORIM, K. N. S. et al. Dendritic Cells and Their Multiple Roles during Malaria Infection. **Journal of immunology research**, v. 2016, 2016.
- ARAKAWA, T. et al. Nasal immunization with a malaria transmission-blocking vaccine candidate, Pfs25, induces complete protective immunity in mice against field isolates of *Plasmodium falciparum*. **Infection and immunity**, v. 73, n. 11, p. 7375–7380, nov. 2005.
- ARORA, N.; C ANBALAGAN, L.; PANNU, A. K. Towards Eradication of Malaria: Is the WHO's RTS,S/AS01 Vaccination Effective Enough? **Risk management and healthcare policy**, v. 14, p. 1033–1039, 2021.
- BALLOU, W. R. The development of the RTS,S malaria vaccine candidate: challenges and lessons. **Parasite immunology**, v. 31, n. 9, p. 492–500, set. 2009.
- BANSAL, G. P.; KUMAR, N. Immune Responses in Malaria Transmission. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 38–44, 1 mar. 2018.
- BARGIERI, D. Y. et al. Adjuvant requirement for successful immunization with recombinant derivatives of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 delivered via the intranasal route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 313–318, 2007.
- BARR, P. J. et al. Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 5, p. 1203–1208, 1 nov. 1991.

BASU, S.; SAHI, P. K. Malaria: An Update. **Indian journal of pediatrics**, v. 84, n. 7, p. 521–528, jul. 2017.

BEESON, J. G. et al. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 3, p. 343–372, 1 maio 2016.

BELACHEW, E. B. Immune Response and Evasion Mechanisms of *Plasmodium falciparum* Parasites. **Journal of immunology research**, v. 2018.

BÉLARD, S. et al. A Randomized Controlled Phase Ib Trial of the Malaria Vaccine Candidate GMZ2 in African Children. **PLOS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22525, 2011.

BELETE, T. M. Recent progress in the development of new antimalarial drugs with novel targets. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 3875–3889, 2020.

BERGMANN-LEITNER, E. S. et al. Computational and Experimental Validation of B and T-Cell Epitopes of the *in vivo* Immune Response to a Novel Malarial Antigen. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 16 ago. 2013.

BEZERRA, J. M. T. et al. Changes in malaria patterns in Brazil over 28 years (1990-2017): Results from the Global Burden of Disease Study 2017. **Population Health Metrics**, v. 18, 30 set. 2020.

BHANDARI, S. et al. Transcriptome and proteome profiling reveal complementary scavenger and immune features of rat liver sinusoidal endothelial cells and liver macrophages. **BMC Molecular and Cell Biology**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2020.

BHAT, A. A. et al. Induction of mucosal and systemic humoral immune responses in murine system by intranasal immunization with peptide antigens of *P. vivax* and CpG oligodeoxynucleotide (ODN) in microparticle delivery. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 10, p. 1197–1208, 1 set. 2009.

BONANNI, V. et al. Bone marrow NK cells: Origin, distinctive features, and requirements for tissue localization. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JULY, p. 470592, 10 jul. 2019.

BOYLE, M. J. et al. Human Antibodies Fix Complement to Inhibit *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes and Are Associated with Protection against Malaria. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 580, 3 mar. 2015.

BOYLE, M. J.; WILSON, D. W.; BEESON, J. G. New approaches to studying *Plasmodium falciparum* merozoite invasion and insights into invasion biology. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 1, p. 1–10, 1 jan. 2013.

BUCŞAN, A. N.; WILLIAMSON, K. C. Setting the stage: The initial immune response to blood-stage parasites. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 88, 1 jan. 2020.

BURGESS, B. R.; SCHUCK, P.; GARBOCZI, D. N. Dissection of merozoite surface protein 3, a representative of a family of *Plasmodium falciparum* surface proteins, reveals an oligomeric and highly elongated molecule. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 44, p. 37236–37245, 4 nov. 2005.

BUTLER, N. S.; SCHMIDT, N. W.; HARTY, J. T. Differential Effector Pathways Regulate Memory CD8 T Cell Immunity against *Plasmodium berghei* versus *P. yoelii* Sporozoites . **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 5, p. 2528–2538, 1 mar. 2010.

CAI, J. et al. Whole-Killed Blood-Stage Vaccine: Is It Worthwhile to Further Develop It to Control Malaria? **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 670775, 2021.

CARAPAU, D. et al. Protective humoral immunity elicited by a needle-free malaria vaccine comprised of a chimeric *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein and a Toll-like receptor 5 agonist, flagellin. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 12, p. 4350–4362, 2013.

CECH, P. G. et al. Virosome-formulated plasmodium falciparum AMA-1 & CSP derived peptides as malaria vaccine: Randomized phase 1b trial in semi-immune adults & children. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

CHAKRAVARTY, S. et al. CD8⁺ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. **Nature medicine**, v. 13, n. 9, p. 1035–1041, set. 2007.

CHAUHAN, V. S.; YAZDANI, S. S.; GAUR, D. Malaria vaccine development based on merozoite surface proteins of *Plasmodium falciparum*. **Hum Vaccin**, 2010.

CIRIMOTICH, C. M. et al. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. **Developmental and comparative immunology**, v. 34, n. 4, p. 387, abr. 2010.

CLARK, I. A. et al. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. **Malaria Journal**, v. 5, p. 85, 10 out. 2006.

CLYDE, D. F. et al. Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria. **The American journal of the medical sciences**, v. 266, n. 3, p. 169–177, set. 1973.

COHEN, J. et al. From the circumsporozoite protein to the RTS, S/AS candidate vaccine. **Human vaccines**, v. 6, n. 1, p. 90–96, jan. 2010.

COLLINS, K. A. et al. Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine. **Scientific reports**, v. 7, p. 46621, abr. 2017.

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, fev. 2011.

COWMAN, A. F. et al. Malaria: Biology and Disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610–624, 20 out. 2016.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755–766, 24 fev. 2006.

COX, F. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasites and Vectors. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 5, 2010.

CZERKINSKY, C.; HOLMGREN, J. Mucosal delivery routes for optimal immunization: targeting immunity to the right tissues. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 354, n. 1, p. 1–18, 2012.

DATOO, M. S. et al. Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 397, n. 10287, p. 1809–1818, maio 2021.

DATOO, M. S. et al. Efficacy and immunogenicity of R21/Matrix-M vaccine against clinical malaria after 2 years' follow-up in children in Burkina Faso: a phase 1/2b randomised controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, 7 set. 2022.

DE ALMEIDA, M. E. M. et al. Circumsporozoite Surface Protein-based malaria vaccines: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 63, p. 1–9, 2021.

DE ALMEIDA, M. E. M. et al. Bacillus subtilis spores as delivery system for nasal *Plasmodium falciparum* circumsporozoite surface protein immunization in a murine model. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

DEMANGA, C. G. et al. Toward the Rational Design of a Malaria Vaccine Construct Using the MSP3 Family as an Example: Contribution of Antigenicity Studies in Humans. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 486, jan. 2010.

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, p. e17464, 2011.

DEROOST, K. et al. The immunological balance between host and parasite in malaria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 2, p. 208–257, 1 mar. 2016.

DESHMUKH, A. et al. *Plasmodium falciparum* MSP3 Exists in a Complex on the Merozoite Surface and Generates Antibody Response during Natural Infection. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 8, 1 ago. 2018.

DOBBS, K. R.; CRABTREE, J. N.; DENT, A. E. Innate immunity to malaria-The role of monocytes. **Immunological reviews**, v. 293, n. 1, p. 8–24, 1 jan. 2020.

DOOLAN, D. L. *Plasmodium* Immunomics. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 1, p. 3, jan. 2011.

DOOLAN, D. L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J. K. Acquired Immunity to Malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 13, jan. 2009.

DRUILHE, P. et al. A Malaria Vaccine That Elicits in Humans Antibodies Able to Kill *Plasmodium falciparum*. **PLoS Medicine**, v. 2, n. 11, p. 1135–1144, nov. 2005.

DUPS, J. N.; PEPPER, M.; COCKBURN, I. A. Antibody and B cell responses to *Plasmodium* sporozoites. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. NOV, p. 117132, 18 nov. 2014.

Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: Final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. **The Lancet**, v. 386, n. 9988, p. 31–45, 4 jul. 2015.

EGAN, T. J. Haemozoin formation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 157, n. 2, p. 127–136, 1 fev. 2008.

EJIGIRI, I.; SINNIS, P. *Plasmodium* sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. **Current Opinion in Microbiology**, 2009.

ELLIS, R. D. et al. Blood stage vaccines for *Plasmodium falciparum*: Current status and the way forward. **Human Vaccines**, v. 6, n. 8, p. 627, 2010.

ESCALANTE, A. A.; LAL, A. A.; AYALA, F. J. Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Genetics**, v. 149, n. 1, p. 189–202, maio 1998.

ESEN, M. et al. Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. **Vaccine**, v. 27, n. 49, p. 6862–6868, 16 nov. 2009.

FERREIRA, M. U.; DA SILVA NUNES, M.; WUNDERLICH, G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 11, n. 6, p. 987–995, nov. 2004.

FLORENS, L. et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 520–526, 3 out. 2002.

FLORES-GARCIA, Y. et al. The *P. falciparum* CSP repeat region contains three distinct epitopes required for protection by antibodies in vivo. **PLoS pathogens**, v. 17, n. 11, p. e1010042, nov. 2021.

FOLEGATTI, P. M. et al. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: Insights into immunological markers for exposure and protection. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–15, 7 mar. 2017.

FONG, K. Y.; WRIGHT, D. W. Hemozoin and antimalarial drug discovery. **Future medicinal chemistry**, v. 5, n. 12, p. 1437, ago. 2013.

GARCÍA, A.; DE SANCTIS, J. B. An overview of adjuvant formulations and delivery systems. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 122, n. 4, p. 257–267, 2014.

GARCIA, J. E.; PUENTES, A.; PATARROYO, M. E. Developmental Biology of Sporozoite-Host Interactions in *Plasmodium falciparum* Malaria: Implications for Vaccine Design. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 4, p. 686, out. 2006.

GARÇON, N.; VAN MECHELEN, M. Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing adjuvant systems. **Expert review of vaccines**, v. 10, n. 4, p. 471–486, abr. 2011.

GARDNER, M. J. et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 498–511, 2002.

GAUR, D.; MAYER, D. C. G.; MILLER, L. H. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 13–14, p. 1413–1429, dez. 2004.

GAZZINELLI, R. T. et al. Innate sensing of malaria parasites. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 11, p. 744–757, 1 jan. 2014.

GOMES, P. S. et al. Immune Escape Strategies of Malaria Parasites. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 1617, 17 out. 2016.

GORDON, D. M. et al. Safety, Immunogenicity, and Efficacy of a Recombinantly Produced *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein-Hepatitis B Surface Antigen Subunit Vaccine. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 6, p. 1576–1585, 1 jun. 1995.

GOSLING, R.; VON SEIDLEIN, L. The Future of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine: An Alternative Development Plan. **PLoS medicine**, v. 13, n. 4, p. e1001994, abr. 2016.

GOWDA, D. C.; WU, X. Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. **Frontiers in immunology**, v. 9, 19 dez. 2018.

GRAEWE, S. et al. Chronicle of a death foretold: *Plasmodium* liver stage parasites decide on the fate of the host cell. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 1, p. 111–130, 1 jan. 2012.

GRAUMANS, W. et al. When is a *Plasmodium*-infected mosquito an infectious mosquito? **Trends in parasitology**, v. 36, n. 8, p. 705, 1 ago. 2020.

GREENWOOD, B.; TARGETT, G. Do we still need a malaria vaccine? **Parasite Immunology**, v. 31, n. 9, p. 582–586, 2009.

HERMES, S. C. N. M. et al. Aspectos Epidemiológicos Da Malária Humana No Município De Aripuanã, Estado De Mato Grosso, Brasil, 2005 a 2010. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 9, n. 17, p. 42–51, 2013.

HERRERA, R. et al. Reversible conformational change in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein masks its adhesion domains. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 10, p. 3771–3780, 2015.

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

HILL, A. V. S. Vaccines against malaria. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 366, n. 1579, p. 2806–2814, 2011.

HISAEDA, H.; YASUTOMO, K.; HIMENO, K. Malaria: immune evasion by parasites. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 4, p. 700–706, 1 abr. 2005.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature Medicine**, v. 11, n. 4S, p. S45, 2005.

HOPP, C. S.; SINNIS, P. The innate and adaptive response to mosquito saliva and *Plasmodium* sporozoites in the skin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1342, n. 1, p. 37–43, 1 abr. 2015.

HUBER, W. et al. Limited sequence polymorphism in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 87, n. 2, p. 231–234, 1 ago. 1997.

HULDEN, L.; HULDEN, L. Activation of the hypnozoite: A part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. **Malaria Journal**, 2011.

IMAM, M. et al. *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 3: OLIGOMERIZATION, SELF-ASSEMBLY, AND HEME COMPLEX FORMATION*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 7, p. 3856, 2 fev. 2014.

JELÍNKOVÁ, L. et al. An epitope-based malaria vaccine targeting the junctional region of circumsporozoite protein. **npj Vaccines**, v. 6, n. 1, 1 dez. 2021.

JEPSEN, M. P. G. et al. The malaria vaccine candidate GMZ2 elicits functional antibodies in individuals from malaria endemic and non-endemic areas. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 3, p. 479–488, 1 ago. 2013.

- KAR, N. P. et al. A review of malaria transmission dynamics in forest ecosystems. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, 9 jun. 2014.
- KASLOW, D. C.; BIERNAUX, S. RTS,S: Toward a first landmark on the Malaria Vaccine Technology Roadmap. **Vaccine**, v. 33, n. 52, p. 7425–7432, 22 dez. 2015.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology** 2010 11:5, v. 11, n. 5, p. 373–384, 20 abr. 2010.
- KOCH, M.; BAUM, J. The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte – towards a reassessment of the host cell contribution. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 319, 1 mar. 2016.
- KOJIN, B. B. et al. Endogenously-expressed NH2-terminus of circumsporozoite protein interferes with sporozoite invasion of mosquito salivary glands. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, 10 mar. 2016.
- KRISHNEGOWDA, G. et al. Induction of Proinflammatory Responses in Macrophages by the Glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8606–8616, mar. 2005.
- KURUP, S. P.; BUTLER, N. S.; HARTY, J. T. T cell-mediated immunity to malaria. **Nature reviews. Immunology**, v. 19, n. 7, p. 457, 1 jul. 2019.
- LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **The Journal of Parasitology**, v. 65, n. 3, p. 418–420, 1 jun. 1979.
- LANGHORNE, J. et al. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nature immunology**, v. 9, n. 7, p. 725–732, jul. 2008.
- LAURENS, M. B. RTS,S/AS01 vaccine (MosquirixTM): an overview. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 16, n. 3, p. 480, 2020.
- LAVELLE, E. C.; WARD, R. W. Mucosal vaccines — fortifying the frontiers. **Nature Reviews Immunology** 2021 22:4, v. 22, n. 4, p. 236–250, 26 jul. 2021.
- LIEHL, P.; MOTA, M. M. Innate recognition of malarial parasites by mammalian hosts. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 6, p. 557–566, 15 maio 2012.

LIMA-JUNIOR, J. DA C.; PRATT-RICCIO, L. R. Major Histocompatibility Complex and Malaria: Focus on *Plasmodium vivax* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. JAN, p. 1, 2016.

LIN, C. S. et al. Multiple *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 Complexes Mediate Merozoite Binding to Human Erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 14, p. 7703–7715, 1 abr. 2016.

LORENZ, V.; KARANIS, G.; KARANIS, P. Malaria vaccine development and how external forces shape it: an overview. **International journal of environmental research and public health**, v. 11, n. 7, p. 6791–6807, jun. 2014.

LOZANO, J. M. et al. The Search of a Malaria Vaccine: The Time for Modified Immuno-Potentiating Probes. **Vaccines**, v. 9, n. 2, fev. 2021.

LUMSDEN, J. M. et al. Evaluation of immune responses to a *Plasmodium vivax* CSP-based recombinant protein vaccine candidate in combination with second-generation adjuvants in mice. **Vaccine**, v. 30, n. 22, p. 3311–3319, 9 maio 2012.

LUZOLO, A. L.; NGOYI, D. M. Cerebral malaria. **Brain research bulletin**, v. 145, p. 53–58, 1 fev. 2019.

LYCKE, N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. **Nature reviews. Immunology**, v. 12, n. 8, p. 592–605, ago. 2012.

MAC-DANIEL, L. et al. Local Immune Response to Injection of *Plasmodium* Sporozoites into the Skin. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 3, p. 1246–1257, 1 ago. 2014.

MAHMOUDI, S.; KESHAVARZ, H. Efficacy of phase 3 trial of RTS, S/AS01 malaria vaccine: The need for an alternative development plan. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 13, n. 9, p. 2098–2101, set. 2017.

MANDALA, W. L. et al. The role of different components of the immune system against *Plasmodium falciparum* malaria: Possible contribution towards malaria vaccine development. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 246, 2021.

MARSHALL, J. S. et al. An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v. 14, n. 2, p. 1–10, 12 set. 2018.

MARTINEZ-ESPINOSA, I.; SERRATO, J. A.; ORTIZ-QUINTERO, B. Role of IL-10-Producing Natural Killer Cells in the Regulatory Mechanisms of Inflammation during Systemic Infection. **Biomolecules**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2022.

MATUSCHEWSKI, K. Vaccines against malaria-still a long way to go. **The FEBS journal**, v. 284, n. 16, p. 2560–2568, ago. 2017.

MAUDUIT, M. et al. Dendritic cells and the malaria pre-erythrocytic stage. **Immunologic Research**, v. 53, n. 1–3, p. 115–126, set. 2012.

MAZUMDAR, S. et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1)-MSP-3 chimeric protein: Immunogenicity determined with human-compatible adjuvants and induction of protective immune response. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 2, p. 872–883, fev. 2010.

MCCOLL, D. J. et al. Molecular variation in a novel polymorphic antigen associated with *Plasmodium falciparum* merozoites. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 68, n. 1, p. 53–67, 1994.

MCCOLL, D. J.; ANDERS, R. F. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). **Molecular and biochemical parasitology**, v. 90, n. 1, p. 21–31, 1 dez. 1997.

MILLER, L. H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature medicine**, v. 19, n. 2, p. 156–167, fev. 2013.

MILNER, D. A. Malaria Pathogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 1, p. a025569, 2018.

MIQUEL-CLOPÉS, A. et al. Mucosal vaccines and technology. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 196, p. 205–214, 2019.

MIRZOHREH, S. T. et al. Malaria prevalence in HIV-positive children, pregnant women, and adults: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & vectors**, v. 15, n. 1, p. 324, 1 dez. 2022.

MOHANDAS, N.; AN, X. Malaria and Human Red Blood Cells. **Medical microbiology and immunology**, v. 201, n. 4, p. 593, 2012.

MOORE, L. R. et al. Hemoglobin degradation in malaria-infected erythrocytes determined from live cell magnetophoresis. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 6, p. 747, abr. 2006.

MORIS, P.; JONGERT, E.; VAN DER MOST, R. G. Characterization of T-cell immune responses in clinical trials of the candidate RTS,S malaria vaccine. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1381809>, v. 14, n. 1, p. 17–27, 2 jan. 2017.

NADEEM, A. Y. et al. Mosquirix™ RTS, S/AS01 Vaccine Development, Immunogenicity, and Efficacy. **Vaccines**, v. 10, n. 5, 1 maio 2022.

NEUTRA, M. R.; KOZLOWSKI, P. A. Mucosal vaccines: The promise and the challenge. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 2, p. 148–158, fev. 2006.

NGANOU-MAKAMDOP, K. et al. Long term protection after immunization with *P. berghei* sporozoites correlates with sustained IFN γ responses of hepatic CD8⁺ memory t cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 1 maio 2012.

OEUVRAY, C. et al. A novel merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP-3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89 Suppl 2, p. 77–80, 1994a.

OEUVRAY, C. et al. Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1594–1602, set. 1994b.

LOLOTU, A. et al. Seven-Year Efficacy of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine among Young African Children. **The New England journal of medicine**, v. 374, n. 26, p. 2519, 6 jun. 2016.

OMS – Organização Mundial da Saúde, 2021.

OUATTARA, A.; LAURENS, M. B. Vaccines against malaria. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 60, n. 6, p. 930–936, 15 mar. 2015.

OYEGUE-LIABAGUI, S. L. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines in children with malaria in Franceville, Gabon. **American Journal of Clinical and Experimental Immunology**, v. 6, n. 2, p. 9, 2017.

PATTARADILOKRAT, S. et al. Genetic diversity of the merozoite surface protein-3 gene in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 21 out. 2016.

PENNY, M. A. et al. The public health impact of malaria vaccine RTS,S in malaria endemic Africa: country-specific predictions using 18 month follow-up Phase III data and simulation models. **BMC medicine**, v. 13, p. 170, jul. 2015.

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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 29, p. 26784–26791, 20 jul. 2001.

PLASSMEYER, M. L. et al. Structure of the *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein, a Leading Malaria Vaccine Candidate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 39, p. 26951–26963, 25 set. 2009.

PRAET, N. et al. Assessing the safety, impact and effectiveness of RTS,S/AS01 malaria vaccine following its introduction in three sub-Saharan African countries: methodological approaches and study set-up. **Malaria Journal**, v. 2022, n. 1, p. 132, 2022.

PRATT-RICCIO, L. R. et al. Synthetic Antigens Derived from *Plasmodium falciparum* Sporozoite, Liver, and Blood Stages: Naturally Acquired Immune Response and Human Leukocyte Antigen Associations in Individuals Living in a Brazilian Endemic Area. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, n. 5, p. 1581–1592, 2017.

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, nov. 2006.

QUINTERO, J. P. et al. Malaria-related anaemia: a Latin American perspective. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 91–104, ago. 2011.

RADTKE, A. J. et al. Lymph-Node Resident CD8 α ⁺ Dendritic Cells Capture Antigens from Migratory Malaria Sporozoites and Induce CD8⁺ T Cell Responses. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 2, 2015.

RANDOLPH, G. J.; ANGELI, V.; SWARTZ, M. A. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 8, p. 617–628, ago. 2005.

REEDER, S. M. et al. Strategic Variants of CSP Delivered as SynDNA Vaccines Demonstrate Heterogeneity of Immunogenicity and Protection from *Plasmodium* Infection in a Murine Model. **Infection and immunity**, v. 89, n. 10, 1 out. 2021.

RICHARDS, J. S. et al. Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria for vaccine and biomarker development. **Journal of immunology**, v. 191, n. 2, p. 795–809, jul. 2013.

RICHARDS, J. S.; BEESON, J. G. The future for blood-stage vaccines against malaria. **Immunology and cell biology**, v. 87, n. 5, p. 377–390, jul. 2009.

RILEY, E. M.; STEWART, V. A. Immune mechanisms in malaria: New insights in vaccine development. **Nature Medicine**, fev. 2013.

RONO, M. K. et al. Adaptation of *Plasmodium falciparum* to its transmission environment. **Nature ecology & evolution**, v. 2, n. 2, p. 377, 2 fev. 2018.

SADOFF, J. C. et al. Oral Salmonella typhimurium Vaccine Expressing Circumsporozoite Protein Protects Against Malaria. **Science**, v. 240, n. 4850, p. 336–338, 1988.

SARKAR, I.; GARG, R.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Selection of adjuvants for vaccines targeting specific pathogens. **Expert Review of Vaccines**, v. 18, n. 5, p. 505, 4 maio 2019.

SATO, S. Correction to: *Plasmodium*—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 40, n. 1, p. 1–13, 2021.

SAUERWEIN, R. W. Clinical malaria vaccine development. **Immunology letters**, v. 122, n. 2, p. 115–117, fev. 2009.

SCALLY, S. W. et al. Rare PfCSP C-terminal antibodies induced by live sporozoite vaccination are ineffective against malaria infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 1, p. 63–75, 1 jan. 2018.

SCHWENDENER, R. A. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. **Therapeutic Advances in Vaccines**, v. 2, n. 6, p. 159, 1 jan. 2014.

SINGH, M. et al. Proteome Analysis of *Plasmodium falciparum* Extracellular Secretory Antigens at Asexual Blood Stages Reveals a Cohort of Proteins with Possible Roles in Immune Modulation and Signaling . **Molecular & Cellular Proteomics**, 2009a.

SINGH, S. et al. A Conserved Multi-Gene Family Induces Cross-Reactive Antibodies Effective in Defense against *Plasmodium falciparum*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, 30 abr. 2009b.

SINNIS, P.; NARDIN, E. Sporozoite antigens: biology and immunology of the circumsporozoite protein and thrombospondin-related anonymous protein. **Chemical immunology**, v. 80, p. 70–96, 2002.

SINNIS, P.; ZAVALA, F. The skin: where malaria infection and the host immune response begin. **Seminars in immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 787–792, nov. 2012.

SIRIMA, S. B. et al. A phase 2b randomized, controlled trial of the efficacy of the GMZ2 malaria vaccine in African children. **Vaccine**, v. 34, n. 38, p. 4536–4542, 31 ago. 2016.

SKWARCZYNSKI, M. et al. Progress in the Development of Subunit Vaccines against Malaria. **Vaccines**, v. 8, n. 3, jul. 2020.

SNOW, R. W. et al. Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa. **Lancet**, v. 349, n. 9066, p. 1650–1654, 7 jun. 1997.

SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 3, p. 317–332, 1998.

SONKO, S. T. et al. Does socio-economic status explain the differentials in malaria parasite prevalence? Evidence from The Gambia. **Malaria journal**, v. 13, p. 449, nov. 2014.

STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology** 2004 4:3, v. 4, n. 3, p. 169–180, 2004.

STOUTE, J. A. et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. **The New England journal of medicine**, v. 336, n. 2, p. 86–91, 9 jan. 1997.

SYED, Y. Y. RTS,S/AS01 malaria vaccine (Mosquirix®): a profile of its use. **Drugs and Therapy Perspectives**, v. 38, n. 9, p. 373–381, 1 set. 2022.

TAKALA, S. L.; PLOWE, C. V. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing, and efficacy: Preventing and overcoming “vaccine resistant malaria”. **Parasite immunology**, v. 31, n. 9, p. 560, set. 2009.

TAMURA, S.-I.; KURATA, T. Defense Mechanisms against Influenza Virus Infection in the Respiratory Tract Mucosa. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 57, p. 236–247, 2004.

TAVARES, J. et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 5, p. 905–915, maio 2013.

TEIXEIRA, A. R. et al. Immunization with CSP and a RIG-I Agonist is Effective in Inducing a Functional and Protective Humoral Response Against *Plasmodium*. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 20 maio 2022.

TEWARI, R. et al. Function of region I and II adhesive motifs of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in sporozoite motility and infectivity. **Journal of Biological Chemistry**, 2002.

THATHY, V. et al. Levels of circumsporozoite protein in the *Plasmodium* oocyst determine sporozoite morphology. **EMBO Journal**, 2002.

THEISEN, M. et al. The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro. **Infection and immunity**, v. 66, n. 1, p. 11–17, 1998.

THEISEN, M. et al. A *Plasmodium falciparum* GLURP–MSP3 chimeric protein; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies. **Vaccine**, v. 22, n. 9–10, p. 1188–1198, 12 mar. 2004.

TINTO, H. et al. Long-term incidence of severe malaria following RTS,S/AS01 vaccination in children and infants in Africa: an open-label 3-year extension study of a phase 3 randomised controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 8, p. 821–832, 1 ago. 2019.

TLAXCA, J. L.; ELLIS, S.; REMMELE, R. L. Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: Potential and challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 93, p. 56–78, 1 out. 2015.

TORRE, D.; SPERANZA, F.; MARTEGANI, R. Role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 12, p. 719–720, 1 dez. 2002.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673–675, 1976.

TSAI, C. W. et al. Characterization of a protective Escherichia coli-expressed *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 indicates a non-linear, multi-domain structure. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 164, n. 1, p. 45, mar. 2009.

TUJU, J. et al. Vaccine candidate discovery for the next generation of malaria vaccines. **Immunology**, v. 152, n. 2, p. 195–206, out. 2017.

TUTEJA, R. Malaria - An overview. **FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4670–4679, 2007.

TUTEJA, R. Introduction to the Special Issue on Malaria. **The FEBS Journal**, v. 284, n. 16, p. 2550–2552, 2017.

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, 1 ago. 2004.

VENUGOPAL, K. et al. Plasmodium asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. **Nature Reviews Microbiology** 2020 18:3, v. 18, n. 3, p. 177–189, 9 jan. 2020.

WANG, S. et al. Intranasal and oral vaccination with protein-based antigens: advantages, challenges and formulation strategies. **Protein & Cell**, v. 6, n. 7, p. 480, 1 jul. 2015a.

WHITE, M. T. et al. Immunogenicity of the RTS,S/AS01 malaria vaccine and implications for duration of vaccine efficacy: Secondary analysis of data from a phase 3 randomised controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 12, p. 1450–1458, 1 dez. 2015.

WHITE, N. J. Severe malaria. **Malaria Journal** 2022 21:1, v. 21, n. 1, p. 1–17, 6 out. 2022.

WOEHLBIER, U. et al. Analysis of antibodies directed against merozoite surface protein 1 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1313–1322, fev. 2006.

WOLF, A. S.; SHERRATT, S.; RILEY, E. M. NK Cells: Uncertain Allies against Malaria. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAR, p. 1, 9 mar. 2017.

WOOD, E. J. Molecular cloning. A laboratory manual by T Maniatis, E F Fritsch and J Sambrook. pp 545. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1982. \$48 ISBN 0-87969-136-0. **Biochemical Education**, v. 11, n. 2, p. 82–82, 1 abr. 1983.

XUAN, K. M. et al. The role of monocytes in malaria infection. **Central European Journal of Immunology**, v. 48, n. 1, p. 54–62, 2023.

YAMAUCHI, L. M. et al. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1215–22, maio 2007.

YAMAUCHI LUCY M., L. M. et al. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1215–1222, maio 2007.

YOSHIDA, N. et al. Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. **Science**, 1980.

YOUNG, J. F. et al. Expression of *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Proteins in Escherichia coli for Potential Use in a Human Malaria Vaccine. **Science**, v. 228, n. 1–5, 1985.

ZAVALA, F. et al. Circumsporozoite proteins of malaria parasites contain a single immunodominant region with two or more identical epitopes. **The Journal of experimental medicine**, v. 157, n. 6, p. 1947–1957, 1 jun. 1983.

ZAVALA, F. et al. Rationale for development of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. **Science**, v. 228, n. 4706, p. 1436–1440, jun. 1985.

ZHANG, L.; WANG, W.; WANG, S. Effect of Vaccine Administration Modality on Immunogenicity and Efficacy. **Expert review of vaccines**, v. 14, n. 11, p. 1509, 2 nov. 2015.

ZHAO, J. et al. A comprehensive analysis of *Plasmodium* circumsporozoite protein binding to hepatocytes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2016.

ZHU, J. et al. Proinflammatory responses by glycosylphosphatidylinositols (GPIs) of *Plasmodium falciparum* are mainly mediated through the recognition of TLR2/TLR1. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 3, p. 205–211, jul. 2011.

ZHU, J.; KRISHNEGOWDA, G.; GOWDA, D. C. Induction of Proinflammatory Responses in Macrophages by the Glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8617–8627, mar. 2005.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA).



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÕES



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PARECER TÉCNICO Nº 109/2022/SEI-INPA
PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "**Desenvolvimento de esporos contendo em sua superfície a proteína de circunsporozoíto (csp) de Plasmodium vivax e análise de sua imunogenicidade em modelo murino**", registrada com o processo **SEI 01280.001482/2022-01**, sob a responsabilidade de **Emmily Myrella Vasconcelos Mourão** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA, em reunião de **29/09/2022**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Início: 30/10/2022 a Final: 30/10/2024
Espécie/linhagem/raça:	Mus musculus=camundongos BALB/c
Número de animais:	292
Peso/Idade:	25-40g/6-8 semanas
Sexo:	MACHO/FEMEA
Origem:	Biotério Central do INPA
Jejum:	de 1 hora antes das imunizações
Inoculação:	Imunização via oral e nasal

Raimunda Liege Souza de Abreu - Presidente CEUA-INPA - PO 230/2022



Documento assinado eletronicamente por **Raimunda Liege Souza de Abreu, Pesquisador(a) em Ciência e Tecnologia**, em 04/10/2022, às 11:43 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.mcti.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **10477755** e o código CRC **E76320F0**.