

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**

**Curso de Biomedicina**

**Miriam Hiromi Borges**

**PANORAMA SOBRE A MALÁRIA: ASPECTOS IMPORTANTES DA  
EPIDEMIOLOGIA, IMUNOLOGIA E NOVA FORMA DE CONTROLE DA  
DOENÇA POR MEIO DE VACINA DE DNA RECOMBINANTE**

**São Paulo**

**2017**

**Miriam Hiromi Borges**

**PANORAMA SOBRE A MALÁRIA: ASPECTOS IMPORTANTES DA  
EPIDEMIOLOGIA, IMUNOLOGIA E NOVA FORMA DE CONTROLE DA  
DOENÇA POR MEIO DE VACINA DE DNA RECOMBINANTE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Fabio Mitsuo Lima, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

**São Paulo**

**2017**

**Miriam Hiromi Borges**

**PANORAMA SOBRE A MALÁRIA: ASPECTOS IMPORTANTES DA  
EPIDEMIOLOGIA, IMUNOLOGIA E NOVA FORMA DE CONTROLE DA  
DOENÇA POR MEIO DE VACINA DE DNA RECOMBINANTE**

São Paulo, 23 de Maio de 2017

---

Professor orientador – Prof. Dr. Fabio Mitsuo Lima

---

Professor Examinador - Prof<sup>a</sup> Dra. Luciana Pugliese da Silva

Dedico este trabalho aos meus pais e também à minha irmã por sempre me apoiarem em minhas decisões e contribuírem para que essa formação fosse possível.

Dedico também ao meu amor Gustavo pela paciência, carinho, incentivo e apoio sempre.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador Fábio Mitsuo Lima por dedicar seu tempo e colaborar com seus conhecimentos para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

Também gostaria de agradecer o incentivo do pessoal do Laboratório de Genética Molecular do ICB. Agradeço ao Daniel por ter aceitado que eu fizesse parte da equipe e por ter me indicado caminhos para a elaboração deste trabalho. Também queria agradecer às minhas colegas e amigas Irina e Juliana por sempre me ajudarem com os experimentos no laboratório e pelas conversas divertidas de sempre, tornando o ambiente muito agradável de trabalhar.

Ao Centro Universitário São Camilo, a todos os professores que contribuíram de alguma maneira com minha formação e às amigas (em especial Bruna Marangoni) que tornaram essa jornada mais divertida, muito obrigada.

BORGES, Miriam Hiromi. **Panorama sobre a malária:** aspectos importantes da epidemiologia, imunologia e nova forma de controle da doença por meio de vacina de DNA Recombinante. 2017. 59 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina) - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

A malária é uma das doenças parasitárias mais importantes do mundo, já que provoca inúmeros casos de morbidade e mortalidade, sobretudo em países em desenvolvimento. Essa doença é causada pelo *Plasmodium spp*, sendo o *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium falciparum* as principais espécies. No Brasil, a Região Amazônica ainda é endêmica para malária e o *Plasmodium vivax* é responsável por causar a maioria das infecções. Além disso, normalmente elas são crônicas, pois essa espécie é capaz de formar os hipnozoítas, formas dormentes do parasita que podem se tornar ativas após meses da primeira infecção e então retomar o ciclo. Medidas de proteção individual e coletiva são necessárias para combater o mosquito *Anopheles*, transmissor da malária. No entanto, muitas vezes essas estratégias não são suficientes e o tratamento com antimaláricos é indispensável. Contudo, algumas espécies estão se tornando resistentes aos medicamentos, fazendo com que novas estratégias de controle sejam necessárias. A vacinação com DNA é uma das mais recentes quando se trata de combate à malária. Apesar de o parasita ter um ciclo de vida muito complexo, diversos candidatos vacinais já foram identificados, possibilitando que novas vacinas sejam testadas. A vacinação com DNA envolve a inoculação de um plasmídeo recombinante que expresse a proteína antigênica (um ou mais dos candidatos vacinais) de forma natural no hospedeiro imunizado, induzindo respostas imunes celular e humoral, sendo essa uma das vantagens dessas vacinas em relação a outras já testadas.

**Palavras-chave:** DNA recombinante. Malária. Plasmodium. Vacinas. Vacinas de DNA.

BORGES, Miriam Hiromi. **Panorama on malaria:** important aspects of epidemiology, immunology and new way of control of disease by Recombinant DNA vaccine. 2017. 59 f. Final Report (Bachelor's degree in Biomedicine) - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

Malaria is one of the most important parasitic diseases in the world, causing numerous cases of morbidity and mortality, especially in developing countries. This disease is caused by *Plasmodium spp* (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* being the main species). In Brazil, the Amazon Region is still endemic for malaria and *Plasmodium vivax* is responsible for causing most infections. In addition, they are usually chronic because this species is able to form the hypnozoites, dormant forms of the parasite that can become active after months of the first infection and then resume the cycle. Individual and collective protection measures are needed to combat the mosquito *Anopheles*, a malaria transmitter. However, often these strategies are not enough and treatment with antimalarials is indispensable. However, some species are becoming resistant to drugs, making new control strategies necessary. DNA vaccination is one of the most recent when it comes to fighting malaria. Although the parasite has a very complex life cycle, several vaccine candidates have already been identified, allowing new vaccines to be tested. DNA vaccination involves the inoculation of a recombinant plasmid that expresses the antigenic protein (one or more of the vaccine candidates) naturally in the immunized host, inducing cellular and humoral immune responses, which is one of the advantages of these vaccines in relation to others already tested.

**Keywords:** Recombinant DNA. Malaria. Plasmodium. Vaccines. DNA vaccines.

## Lista de Figuras

Figura 1 – Países endêmicos para malária em 2000 e 2016 .....	15
Figura 2 – Desenho esquemático de esporozoíta e merozoíta, destacando as principais estruturas .....	16
Figura 3 – Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> .....	18
Figura 4 – Imagem mostrando a presença de <i>Plasmodium falciparum</i> após o uso do método de gota espessa .....	20
Figura 5 – Representação esquemática da CSP .....	29
Figura 6 – Representação esquemática da AMA-1 .....	34
Figura 7 – Representação esquemática da DBP .....	35
Figura 8 – Representação esquemática da MSP1 .....	36
Figura 9 – Representação de um nucleotídeo de desoxirribose .....	41
Figura 10 – Estrutura detalhada do polímero polinucleotídico .....	41
Figura 11 – Ciclo do Ribossomo .....	43
Figura 12 – Amplificação de uma molécula de DNA por PCR.....	45
Figura 13 – Representação de endonucleases .....	46

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	09
2 OBJETIVOS .....	11
3 METODOLOGIA .....	12
4 DESENVOLVIMENTO .....	13
4.1 Importância da malária no Brasil e no mundo .....	13
4.2 O parasita.....	16
4.3 Ciclo de vida.....	17
4.4 Diagnóstico e tratamento.....	19
4.5 Resistência natural à malária .....	22
4.6 Resposta imunitária inata .....	23
4.7 Resposta imunitária adaptativa .....	24
4.8 Desenvolvimento de vacina contra a malária .....	26
4.9 Candidatos vacinais .....	30
4.9.1 Candidatos vacinais: estágio no mosquito .....	31
4.9.2 Candidatos vacinais: antígenos da fase hepática (pré-eritrocítica) .....	32
4.9.3 Candidatos vacinais: antígenos sanguíneos (fase eritrocítica).....	34
4.10 Vacina de DNA.....	37
4.11 Estrutura do DNA e processo de síntese proteica.....	41
4.12 Tecnologia do DNA Recombinante .....	44
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	49
REFERÊNCIAS.....	50

## 1 INTRODUÇÃO

A malária humana é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, principalmente pelas espécies *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, e transmitida pelo mosquito *Anopheles*. No Brasil, a doença ainda é endêmica na região Amazônica e a espécie prevalente é o *P. vivax* (MONTEIRO et al., 2015). O complexo ciclo de vida do plasmódio envolve hospedeiros vertebrado (homem) e invertebrado (mosquito), e as principais fases são: a que ocorre no mosquito, a hepática (pré-eritrocítica) e a sanguínea (eritrocítica), sendo que ambas ocorrem no hospedeiro vertebrado (NOGUEIRA; ROSÁRIO, 2010).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 3 bilhões de pessoas em 95 países correm o risco de contraírem a malária, sendo que em 2015 aproximadamente 212 milhões de casos foram reportados em todo o mundo e obteve-se o registro de 429 mil mortes em decorrência da doença. Ainda que esses dados sejam preocupantes, a porcentagem de casos e de óbitos decorrentes da malária diminuiu com relação aos dados do ano 2000 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016c).

Algumas espécies do parasita, a exemplo do *P. falciparum*, responsável pela forma mais grave da malária, estão desenvolvendo resistência aos fármacos mais utilizados no tratamento (BEESON et al., 2016; PINA-COSTA et al., 2014). Sendo assim, novas formas de controle da doença são necessárias. O desenvolvimento de uma vacina seria ideal, ainda que a complexidade dos parasitas e a dificuldade de eleger um antígeno capaz de induzir imunidade protetora tornem esse processo desafiador (LONG; ZAVALA, 2016; OBALDIA et al., 2017). Inclusive, até hoje não se tem vacinas contra qualquer espécie de parasita disponível no mercado (HOFFMAN et al., 2015).

Mesmo com todas as dificuldades, diversas pesquisas estão sendo feitas para que se consiga desenvolver uma vacina capaz de gerar memória imunológica contra o plasmódio (AGUIRRE et al., 2005). Contudo, a maior parte delas é direcionada para o *P. falciparum*, apesar de o *P. vivax* também ser de grande importância. Isso ocorre, pois há uma dificuldade em manter o *P. vivax* em cultura (CUTTS et al., 2014; HOWES et al., 2016).

Existem diversos candidatos vacinais de importância para o desenvolvimento de vacinas contra o *P. vivax*, sendo alguns deles: Pvs25 e Pvs28 que são proteínas presentes no estágio no mosquito; Proteína Anônima Relacionada à Trombospondina (TRAP) e Proteína Circunsporozoíta (CSP), que são antígenos da fase pré-eritrocítica; Proteína de Ligação ao Duffy (DBP), Proteína de Superfície do Merozoíta 1 (MSP1) e Antígeno Apical de Membrana 1 (AMA1), que são antígenos sanguíneos (VALENCIA et al., 2011).

Apesar das dificuldades em se eleger formulações vacinais, uma vacina já completou a fase 3 de testes, a RTS,S/AS01 (RTS,S). Ela possui uma eficácia ainda parcial contra a malária grave que afeta as crianças e é direcionada contra o *Plasmodium falciparum*, tendo como alvo a Proteína Circunsporozoíta (CSP), essencial para função e invasão dos esporozoítas no hepatócito (NEAFSEY et al., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016b).

Como o *P. vivax* não pode ser mantido *in vitro*, uma alternativa para esse parasita seria o desenvolvimento de uma vacina de DNA recombinante, que consiste, basicamente, na inoculação de um plasmídeo contendo o DNA complementar (cDNA) capaz de codificar um antígeno proteico (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O DNA internalizado faz com que ocorra a expressão da proteína antigênica de forma natural no hospedeiro, permitindo a indução da resposta imune humoral e também da resposta imune celular (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008). Após sofrerem ativação pelos antígenos do plasmódio, os linfócitos T secretam citocinas em grandes quantidades, e os linfócitos B diferenciam-se em plasmócitos, produzindo anticorpos. Essa ativação do sistema imune tem como objetivo controlar a infecção causada pelo plasmódio, tentando reduzir sua capacidade de multiplicação e também as manifestações clínicas que ele causa no indivíduo infectado (FILHO, 2012).

Vacinas de DNA contra malária já foram testadas em modelos animais, mostrando-se promissoras quanto à indução de resposta imune humoral e celular. Além disso, possuem diversas vantagens com relação a outros métodos de imunização, como por exemplo, o fato de serem mais baratas, mais fáceis de serem produzidas e estocadas (TUTEJA, 2002).

## 2 OBJETIVOS

Destacar a importância da malária no mundo, assim como aspectos imunológicos da doença e a necessidade de se buscar novas formas de controle do parasita, como o desenvolvimento de vacina de DNA, a fim de reduzir ou acabar com os casos de morbidade e mortalidade provocados pela doença. Além disso, também mostrar a relevância de alguns candidatos vacinais do *Plasmodium vivax*.

### 3 METODOLOGIA

Foi feita uma revisão bibliográfica sobre o tema, através da busca, leitura e análise de diversos artigos científicos redigidos nos idiomas inglês, português e espanhol, obtidos na base de dados PubMed e na revista eletrônica Scielo, utilizando palavras-chaves como malária, *Plasmodium vivax*, vacina de DNA, candidatos vacinais. Além disso, informações importantes foram obtidas através de sites como os da Organização Mundial da Saúde e Portal da Saúde. Alguns livros disponíveis na biblioteca Padre Inocente Radrizzani também foram utilizados.

## 4 DESENVOLVIMENTO

### 4.1 Importância da malária no Brasil e no mundo

A malária humana é uma doença infecciosa febril aguda causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, principalmente pelas espécies *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* e transmitida por aproximadamente 400 espécies de mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo onze de grande importância na transmissão da doença no Brasil (BRASIL, 2014). O principal vetor presente no país é o *Anopheles darlingi*, encontrado em cerca de 80% de todo o território nacional (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). O anofelino infectado pode apresentar quantidades variadas do parasita (de centenas a dezenas de milhares) em sua glândula salivar. Sendo assim, sempre que a fêmea desse mosquito picar uma pessoa, grande quantidade desses parasitas será inoculada na pele e, posteriormente, nos vasos sanguíneos (REY, 2015).

Em todo o mundo, cinco espécies de *Plasmodium* são capazes de causar a malária humana, sendo elas: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. Contudo, no Brasil, apenas as três primeiras espécies são encontradas, sendo o *Plasmodium vivax* a principal espécie, responsável por cerca de 80% dos casos (MONTEIRO et al., 2015). A intensidade da transmissão depende de diversos fatores, como a espécie do parasita, o meio em que ele se encontra, o vetor disponível e o hospedeiro humano (BIRKETT, 2016).

A malária ainda é uma das doenças parasitárias mais importantes em todo o mundo, mas principalmente em países tropicais, já que temperaturas muito baixas (abaixo de 16°C) ou muito altas (acima de 33°C) prejudicam o desenvolvimento do plasmódio no mosquito (MACIEL; MACIEL, 2013). Além da temperatura, a precipitação e o nível da água são capazes de alterar a sazonalidade da malária, já que são fatores que podem influenciar na capacidade de proliferação do mosquito. De maneira geral, o pico sazonal na região Amazônica ocorre entre as estações úmidas e secas (BRASIL, 2014).

Em geral, a malária manifesta-se de nove a quinze dias após a picada do mosquito infectado, sendo a febre alta, calafrios, fraqueza, sudorese, dores de

cabeça e vômitos as primeiras manifestações clínicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016c). A hemólise e consequente liberação dos parasitos e toxinas, como os fosfolipídios que podem ativar células do sistema imune, responsáveis por produzir citocinas inflamatórias, provocam toxicidade no hospedeiro, causando as alterações já citadas e também a anemia (NEVES, 2011; LIMA-JUNIOR; PRATT-RICCIO, 2016).

A malária é responsável por provocar diversos casos de morbidade e mortalidade, especialmente em países em desenvolvimento (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). É reconhecido o fato de que é uma doença que está muito relacionada com a pobreza, uma vez que a estimativa da mortalidade é maior em países com menor PIB *per capita*. No Brasil, a grande maioria dos casos encontra-se em áreas rurais ou indígenas, sendo o índice de letalidade baixo, ao contrário do que ocorre em regiões não endêmicas. Normalmente, os altos índices de letalidade que ocorrem fora da Região Amazônica se devem ao fato de que pessoas que se infectaram em áreas de alto contágio acabaram se deslocando para onde a doença não é comum, o que dificulta a suspeita da malária por parte dos médicos e, conseqüentemente, o diagnóstico e tratamento rápidos e corretos (BRASIL, 2014).

A grande maioria das infecções causadas pelo plasmódio é crônica, pois a imunidade inata normalmente é insuficiente para combatê-las e, além disso, o parasita também possui mecanismos de escape às respostas imunológicas adaptativas, como por exemplo, a alteração de seus antígenos de superfície durante o ciclo de vida, uma vez que antígenos expressos em estágios teciduais são diferentes daqueles expressos nas fases infecciosas. A grande consequência disso é que quando o sistema imunológico está pronto para responder à infecção causada, por exemplo, pelo esporozoíta, o parasita já se diferencia em merozoíta, expressando outros antígenos e com isso, impossibilita uma resposta eficaz (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A fim de evitar casos da doença, medidas de proteção individual e coletivas são necessárias. O uso de repelentes em áreas expostas do corpo e telas nas janelas das casas são medidas indispensáveis para moradores de áreas endêmicas. Além dos repelentes, outras estratégias de proteção são importantes para os viajantes, como mantê-los informados sobre os horários de maior atividade do

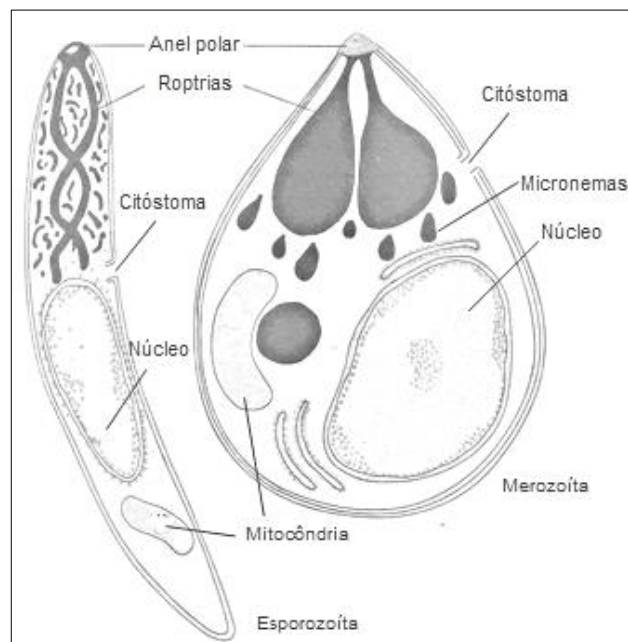


Os países da África Subsaariana são os mais afetados pela malária, já que mais de 90% dos casos da doença resultam em morte (BIRKETT, 2015). Fora desse continente, países como Tailândia, China, Afeganistão e Brasil possuem elevada prevalência. Nas Américas, mais da metade dos casos concentra-se em nosso país e a grande maioria deles é proveniente da região Amazônica (composta pelos estados do Amazonas, Pará, Roraima, Rondônia, Acre, Amapá e também parte do Maranhão e do Tocantins), sendo que no ano de 2016 foram notificados 104.810 casos nessa região (BRASIL, 2017; FILHO, 2012).

#### 4.2 O parasita

O *Plasmodium* pertence ao filo apicomplexa, composto por protozoários eucariotos de vida intracelular obrigatória, capazes de invadir e multiplicar-se dentro dos eritrócitos e hepatócitos. Os estágios de desenvolvimento assim como particularidades exclusivas fazem com que os plasmódios tenham diversas formas e tamanhos. Contudo, apenas os esporozoítas, merozoítas e oocinetos, que são as formas capazes de invadir diferentes células do hospedeiro, têm um complexo apical formado por roptrias e micronemas, que são organelas envolvidas com o processo de invasão celular (NEVES, 2011).

**Figura 2 – Desenho esquemático de esporozoíta e merozoíta, destacando as principais estruturas**



Fonte: Modificado de (NEVES, 2011)

As principais espécies responsáveis por provocar a malária humana são *Plasmodium falciparum*, causadora da forma mais grave da doença e predominante no continente Africano, e *Plasmodium vivax*, espécie mais comum na Ásia e América do Sul. O *Plasmodium malariae* e o *Plasmodium ovale* são os mais incomuns, já que são responsáveis por poucos casos quando comparados com *P. falciparum* e *P. vivax*, sendo que o *Plasmodium ovale* ocorre apenas em regiões restritas do continente africano. Por fim, o *Plasmodium knowlesi* é o causador da malária em macacos e pode ser transmitido através da picada do mosquito infectado para o ser humano, como já foi visto em alguns países do Sudeste Asiático (BEESON et al., 2016; NEVES, 2011).

As manifestações clínicas da malária ocorrem durante o ciclo sanguíneo da doença, quando o parasita está se replicando no sangue. Os tempos de replicação variam de acordo com a espécie, sendo que para o *Plasmodium vivax* e para o *Plasmodium falciparum* esses ciclos de replicação duram em média 48 horas, enquanto que para o *Plasmodium knowlesi* esse tempo é de apenas 24 horas (BEESON et al., 2016). Os picos esporádicos de febre, característica marcante da malária, ocorrem devido à ruptura sincronizada das hemácias, liberando, além dos merozoítas, alguns resíduos celulares. Essa febre está relacionada com maiores concentrações plasmáticas do fator de necrose tumoral- $\alpha$ , que é uma citocina pirogênica (RANG et al., 2007).

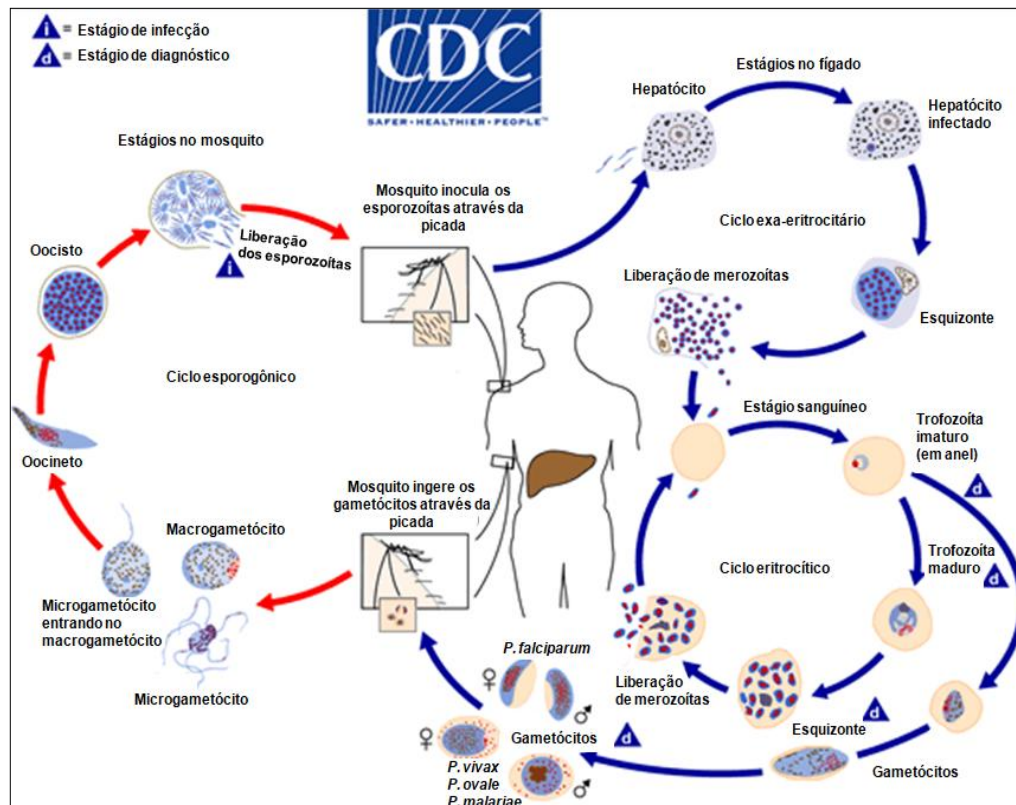
As formas sexuais do *Plasmodium falciparum* normalmente são detectáveis tardiamente durante a infecção, ou seja, após o paciente apresentar sintomas, ser diagnosticado e começar o tratamento. Dessa forma, existe uma maior chance de reduzir a transmissão desse parasita. Por outro lado, o mesmo não se pode dizer sobre o *Plasmodium vivax*, já que seus gametócitos estão presentes nos primeiros dias de infecção, antes mesmo de um tratamento eficaz ser iniciado (LACERDA et al., 2012).

### **4.3 Ciclo de vida**

O complexo ciclo de vida do plasmódio envolve hospedeiros vertebrado (homem) e invertebrado (fêmea do mosquito *Anopheles*), sendo que as principais fases são: hepática, sanguínea (ambas no hospedeiro vertebrado) e a que ocorre no hospedeiro invertebrado (NOGUEIRA; ROSÁRIO, 2010). A fase hepática ou pré-

eritrocítica é assintomática e muito curta (oito dias no caso da infecção causada pelo *Plasmodium vivax*) e a fase sanguínea ou eritrocítica é sintomática (CASARES; BRUMEANU; RICHIE, 2010; REY, 2008).

**Figura 3 – Ciclo de vida do *Plasmodium***



Fonte: Modificado de (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016)

No hospedeiro humano, o ciclo inicia-se quando a fêmea do mosquito inocula no homem os esporozoítas, forma de vida do plasmódio que infecta os hepatócitos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016). Apesar de não possuírem cílios ou flagelos a locomoção dessa forma de vida é possível devido à existência de proteínas de superfície como a CSP (Proteína circunsporozoíta) e a TRAP (Proteína Anônima Relacionada à Trombospondina) (NEVES, 2011). Nos hepatócitos os esporozoítas sofrem maturação dando origem aos esquizontes, que por sua vez diferenciam-se em centenas de merozoítas, os quais são liberados para a corrente sanguínea após romperem os hepatócitos. Esse ciclo que ocorre nas células do fígado recebe o nome de ciclo exa-eritrocitário (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016).

Após a replicação nos hepatócitos, os merozoítas invadem os eritrócitos dando início à esquizogonia, ou seja, à multiplicação assexuada. No interior dessas células, ocorre a diferenciação para trofozoítas imaturos (fase em anel), os quais sofrem maturação em esquizontes que rompem as hemácias liberando os merozoítas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016). Esse ciclo que ocorre dentro das células vermelhas é chamado de ciclo eritrocítico, que consiste em sucessivos ciclos de invasão e multiplicação dos parasitas dentro das células, resultando nas manifestações clínicas da malária (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016; NOGUEIRA; ROSÁRIO, 2010).

Os trofozoítas também podem originar os gametócitos machos (microgametócitos) e fêmeas (macrogametócitos). Essas formas sexuais do parasito são ingeridas pelo mosquito juntamente com o sangue de um indivíduo infectado. No estômago do mosquito ocorre a fertilização, dando origem ao zigoto. Os zigotos diferenciam-se em oocinetos, formas alongadas e móveis que invadem a parede do intestino desenvolvendo-se em oocistos. Esses oocistos crescem, multiplicam-se e dão origem ao esporozoíta, forma que invade as glândulas salivares do mosquito, e assim, torna possível a continuidade do ciclo, caso a fêmea pique um novo hospedeiro. Esse ciclo que ocorre dentro do mosquito é chamado de esporogônico (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016).

No caso da malária causada pelo *Plasmodium vivax*, recaídas da infecção podem acontecer quando esporozoítas invadem os hepatócitos e formam os hipnozoítas, que são formas dormentes do parasito, ou seja, podem ficar ativos novamente após meses da infecção e, dessa forma, são capazes de dar continuidade ao ciclo exa-eritrocitário, ou seja, à multiplicação e à infecção (RANG et al., 2007; REY, 2008).

#### **4.4 Diagnóstico e tratamento**

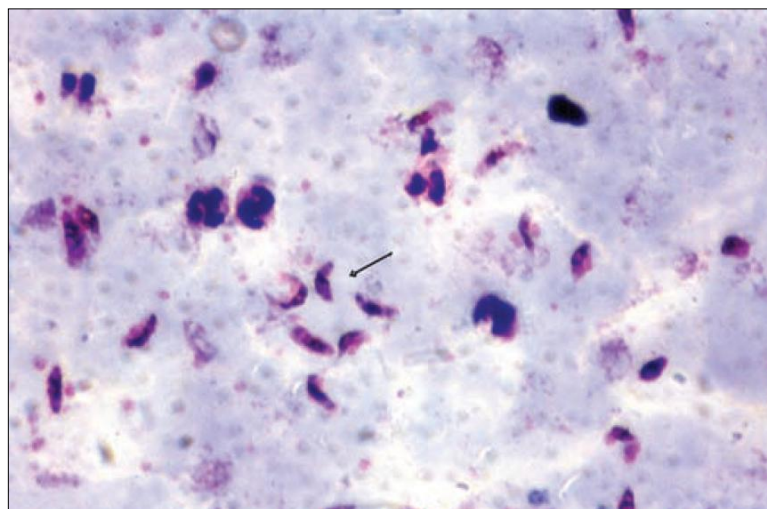
A demonstração do parasito ou de antígenos do plasmódio no sangue periférico é a única forma de realizar um diagnóstico certo de infecção malárica. O diagnóstico clínico, juntamente com a correta identificação da espécie do parasita, também é importante para que se possa fazer um tratamento correto da doença (NEVES, 2011).

O diagnóstico laboratorial deve ser feito o quanto antes em moradores de áreas endêmicas que tenham febre e em turistas que apresentem algum sintoma típico da malária, já que quanto mais cedo a doença for detectada, menores são as chances de se desenvolver a forma mais grave da doença (MACIEL; MACIEL, 2013; NEVES, 2011). Ele é feito através de análise microscópica do sangue periférico infectado. Podem ser utilizadas duas técnicas para isso: esfregaço delgado (distendido) ou espesso (gota espessa), sendo que ambas possibilitam observar a presença do parasita, além de determinar a espécie e a parasitemia na amostra de sangue (BRASIL, 2005).

O método de gota espessa é o mais utilizado devido a sua simplicidade, baixo custo e eficiência diagnóstica, além de que o fato de possibilitar uma maior concentração de sangue por campo do microscópio torna o encontro do parasito mais fácil (BRASIL, 2005; NEVES, 2011). A gota espessa é colhida por punção digital e o método é considerado padrão-ouro, pois permite diferenciar as espécies do parasita e também seu estágio de evolução (BRASIL, 2010).

A coloração da gota espessa é feita através da técnica de Walker, onde se utiliza azul de metileno para fazer a desmoglobinização (para visualizar os elementos figurados do sangue e os parasitos) e o Giemsa para coloração propriamente dita (BRASIL, 2005).

**Figura 4 – Imagem mostrando a presença de *Plasmodium falciparum* após o uso do método de gota espessa**



Fonte: (BRASIL, 2005)

Ainda que o exame da gota espessa seja o mais indicado para o diagnóstico da malária, em muitos lugares o seu uso é prejudicado pela falta de estrutura adequada ou acesso ao serviço de saúde por parte da população. Sendo assim, nos últimos anos, novos métodos rápidos de diagnóstico foram desenvolvidos, como o método imunocromatográfico baseado na captura da proteína Pf-HRP2, encontrada no soro de pacientes infectados pelo *Plasmodium falciparum*. Contudo, esse método acaba resultando em falsos positivos, pois a proteína permanece circulante em pacientes já tratados. Dessa forma, outros métodos foram desenvolvidos utilizando anticorpos contra essa mesma proteína e também contra a enzima desidrogenase láctica (pDHL), que é uma enzima produzida pelas quatro principais espécies do plasmódio (BRASIL, 2005).

Outro método de diagnóstico possível é o da detecção do DNA do parasito através da amplificação utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). Porém, por ter elevado custo e requerer profissionais capacitados para realizar essa técnica devido à alta complexidade, o diagnóstico por PCR ainda é restrito a grandes laboratórios (BRASIL, 2005).

O tratamento da malária é feito com antimaláricos com o objetivo de impedir o desenvolvimento do parasita. Para isso, algumas drogas atuam impedindo a esquizogonia sanguínea evitando as manifestações clínicas, outras destroem os hipnozoítas para impossibilitar as recidivas provocadas pelo *Plasmodium vivax* e também pelo *Plasmodium ovale* e, por fim, drogas que atuam inibindo a formação dos gametócitos e, assim, interrompem a transmissão do parasita (BRASIL, 2010).

O medicamento a ser utilizado depende de diversos fatores, sendo eles a espécie do plasmódio infectante, a idade do paciente (alguns antimaláricos são contraindicados dependendo da faixa etária), história de exposição prévia à malária (pessoas que nunca tiveram a infecção antes, tendem a apresentar a doença de forma mais grave), condições associadas (outras doenças ou gravidez) e gravidade da doença (BRASIL, 2010).

Após o diagnóstico e tratamento corretos da doença é necessário ainda fazer o controle de cura. Esse procedimento consiste em verificar, através de lâmina contendo sangue do paciente, a redução progressiva da quantidade de parasitas na

amostra e eficácia do tratamento, assim como a identificação de possíveis recaídas (BRASIL, 2014).

#### 4.5 Resistência natural à malária

A resistência natural a alguma doença é algo que não depende de nenhuma ação do indivíduo, ou seja, não é necessário que ocorra um contato prévio com o agente causador para ser adquirida. Essa resistência pode ser absoluta ou relativa: no primeiro caso, protege totalmente o indivíduo de uma doença, mas no segundo caso o processo de infecção ocorre de maneira mais branda do que em um indivíduo que não possui essa resistência natural (NEVES, 2011).

Para penetrar na célula do hospedeiro o plasmódio utiliza receptores presentes na membrana da célula. Sendo assim, a ausência de certos receptores constitui um fator de resistência (FILHO, 2012). Fatores do hospedeiro relacionados com sistemas de grupos sanguíneos, como por exemplo, a ausência do antígeno do grupo sanguíneo Duffy, e a presença de hemoglobinas anormais, como no caso da anemia falciforme, podem influenciar sua susceptibilidade à malária causada pelo *Plasmodium vivax*, tornando esse hospedeiro resistente à infecção por essa espécie (NEVES, 2011).

O antígeno Fy do grupo sanguíneo Duffy é um receptor presente na superfície dos reticulócitos. O merozoíta do *Plasmodium vivax* utiliza esse antígeno para interagir com as células vermelhas (MACHADO et al., 2010). Sendo assim, algumas populações são consideradas resistentes à infecção por essa espécie do parasita, pois não apresentam em seus eritrócitos o antígeno necessário para que o merozoíta possa interagir, penetrar nas células e, conseqüentemente, dar início ao ciclo eritrocítico (NEVES, 2011).

Nos indivíduos que apresentam HbAS (traço falciforme) ou HbSS (anemia falciforme) as hemácias apresentam um formato irregular, o que faz com que o nível de potássio dentro das células esteja diminuído devido à baixa afinidade da hemoglobina S pelo oxigênio, o que acaba causando a morte do parasita. Dessa forma, o indivíduo que possui traço ou anemia falciforme acaba tendo uma vantagem seletiva em relação a indivíduos homocigotos (HbAA), pois é naturalmente protegido de uma infecção e da doença (NEVES, 2011).

Em áreas endêmicas, a prevalência de infecções e de pessoas residentes com a malária sintomática causada pelo *Plasmodium vivax* diminui à medida que aumenta a faixa etária. Isso acontece devido às exposições prolongadas (aproximadamente sete anos de exposição) que causam uma imunidade natural a essa doença, tendo como consequência a diminuição da parasitemia e também das manifestações clínicas. Apesar disso, essa imunidade natural não é capaz de proteger o indivíduo contra novas infecções (CUTTS et al., 2014; FILHO, 2012).

#### 4.6 Resposta Imunitária Inata

A resposta imunitária inata é aquela que ocorre assim que o organismo entra em contato com o agente infeccioso. Ela possui um número limitado de receptores e proteínas capazes de reconhecer o antígeno, sendo que esse reconhecimento é limitado a determinados patógenos com características em comum (MURPHY, 2014).

Patógenos como o *Plasmodium* são micro-organismos que foram capazes de criar maneiras de escapar dos mecanismos de defesa inata do organismo de maneira eficaz, obrigando o sistema imune adaptativo a acelerar sua ação para tentar eliminá-los do organismo (MURPHY, 2014).

Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na resposta imunitária inata à malária, porém sabe-se que ela é de extrema importância para o controle da parasitemia, uma vez que os antígenos do plasmódio causam uma ativação intensa do sistema imunitário que tenta limitar ou impedir a multiplicação do plasmódio (FILHO, 2012; NEVES, 2011).

A principal resposta imune inata aos protozoários é a fagocitose por macrófagos, que pode acontecer no local da picada ou quando as duas formas extracelulares desse parasita (esporozoíta e merozoíta) estiverem atravessando baço e fígado, antes de chegarem às células-alvo, hepatócitos e eritrócitos, respectivamente (FILHO, 2012). Receptores Toll-like (TLRs), expressos na membrana dos macrófagos são importantes, já que alguns são capazes de reconhecer metabólitos do parasita, promovendo liberação de citocinas importantes no controle da infecção (NEVES, 2011).

#### 4.7 Resposta Imunitária Adaptativa

A resposta imunitária adaptativa é ativada quando uma infecção consegue escapar da resposta inata, ou seja, o patógeno continua presente no organismo acumulando antígenos. Apesar de ser mais lenta do que a inata, ela tem como característica a capacidade de acabar com as infecções de maneira mais eficiente, já que algumas de suas principais células (linfócitos) são capazes de interagir com o antígeno através de receptores presentes em sua superfície (MURPHY, 2014).

Uma das propriedades do sistema imune adaptativo é a capacidade de gerar no organismo uma imunidade protetora, ou seja, a pessoa será capaz de produzir uma resposta rápida e forte ao entrar em contato com um patógeno desde que não tenha sido pela primeira vez, por isso, essa imunidade também pode ser chamada de memória imune. Contudo não são todos os patógenos que possibilitam que ocorra essa memória imune. Por isso, a capacidade de produzir imunidade de longa duração contra esses patógenos ainda é um desafio (MURPHY, 2014).

A resposta imunológica adaptativa da malária envolve mecanismos humorais, ou seja, participação de anticorpos e mecanismos celulares mediados por células T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; MURPHY, 2014). Dependendo do estágio evolutivo do parasita a resposta imune será diferente, já que ela é espécie-específica e estágio-específica (NEVES, 2011).

A imunidade celular é mediada por células T, as quais entram na corrente sanguínea após sofrer maturação no timo, passam por órgãos linfoides periféricos e retornam ao sangue para encontrar seu antígeno específico. Para que se dê início à imunidade adaptativa, as células T virgens devem ser apresentadas ao antígeno via Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) na superfície da célula apresentadora de antígeno (APC, do inglês *Antigen Presenting Cell*), e então sofrer diferenciação em células T efetoras. Dessa forma, essas células são capazes de atuar de maneira mais rápida contra o antígeno específico em uma célula alvo. Sendo assim, a resposta imune primária mediada por células é aquela em que uma célula T virgem sofre ativação após responder a um antígeno, prolifera-se e então se diferencia em célula T efetora (MURPHY, 2014).

As células T virgens dividem-se em classes diferentes de células efetoras durante a etapa de reconhecimento do antígeno. As células T CD8 reconhecem os peptídeos apresentados pelo MHC de classe I, e dessa forma, sofrem diferenciação para células T efetoras citotóxicas, tendo como função reconhecer e destruir as células infectadas. Por outro lado, as células T CD4 reconhecem o peptídeo apresentado pelo MHC de classe II, e então podem se diferenciar em células Th1 (ativa macrófagos infectados e auxilia células B na produção de anticorpos), Th2 (auxilia células B na produção de anticorpos, principalmente IgE), Th17 (aumenta a resposta dos neutrófilos), Tfh (auxilia células B na produção de anticorpos e realiza troca de isotipo) (MURPHY, 2014).

Na resposta imune contra a malária, as células Th1 desempenham um papel importante, pois secretam Interleucina 2 (IL-2), Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), sendo que altos níveis de IFN- $\gamma$  podem promover a inibição do desenvolvimento do plasmódio, prevenção da infecção e proteção contra malária clínica (SHEIKH et al., 2016).

A resposta imune humoral é caracterizada pela produção de anticorpos pelos linfócitos B. Normalmente a ativação dessas células necessita, além da presença do antígeno, de células T auxiliares (T CD4 que pode ativar células B). Então, após serem ativados, os linfócitos B diferenciam-se em plasmócitos, que são as células responsáveis por secretar os anticorpos, e em células B de memória (MURPHY, 2014).

O plasmódio é capaz de replicar dentro das células vermelhas, provocando lise das mesmas, fazendo com que haja um estímulo a anticorpos específicos e a respostas por células T citotóxicas (CTLs) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Após sofrerem ativação pelos antígenos do plasmódio, os linfócitos T produzem citocinas diversas em grande quantidade, e os linfócitos B diferenciam-se em plasmócitos, produzindo grande quantidade de anticorpos. Essa ativação do sistema imune tem como objetivo controlar a infecção causada pelo plasmódio, tentando reduzir sua capacidade de multiplicação e também as manifestações clínicas que ele causa no indivíduo infectado (FILHO, 2012).

A proteína CSP presente na superfície do esporozoíta é um alvo da ação de anticorpos produzidos pelo sistema imune. Acredita-se que eles ajam impedindo que

ocorra uma mobilidade normal do parasita, impossibilitando a invasão na célula hospedeira. A citotoxicidade de linfócitos e as citocinas (interferon gama, algumas interleucinas e fator de necrose tumoral alfa) parecem ser importantes durante a fase de desenvolvimento no interior das células do fígado (NEVES, 2011).

Os mecanismos da imunidade adaptativa ainda não estão totalmente esclarecidos no caso da malária. Acredita-se que os anticorpos são responsáveis por reduzir a parasitemia ao impedir a replicação do parasita no sangue, já que algumas citocinas pró-inflamatórias são responsáveis por ativar os macrófagos e esses, por sua vez, fagocitam as células infectadas e merozoítas livres na circulação sanguínea (BOYLE et al., 2016; NEVES, 2011). Apesar disso, esses anticorpos mostram-se insuficientes para eliminar o parasita e impedir que ocorra reinfecção, e a imunidade celular não é suficiente para fornecer uma imunidade total, ainda que pareça ser importante para a limitação do patógeno (MURPHY, 2014).

#### **4.8 Desenvolvimento de vacina contra a malária**

O desenvolvimento de vacinas se deu a partir do século XX através de duas estratégias diferentes. A primeira delas era encontrar um organismo atenuado com patogenicidade reduzida, ou seja, capaz de estimular o sistema imune sem causar doença na pessoa imunizada. Hoje em dia essa estratégia ainda é utilizada para a criação de patógenos modificados geneticamente, de forma que mutações desejadas são introduzidas no organismo através da tecnologia do DNA Recombinante. A outra estratégia seria o desenvolvimento de vacinas utilizando organismos mortos (MURPHY, 2014).

Estimular a resposta imune através da vacinação mostrou-se uma boa estratégia para conseguir a erradicação de doenças associadas com elevados índices de morbidade e mortalidade (MURPHY, 2014). No Brasil, a imunização em massa contribuiu para a eliminação da varíola em 1971, poliomielite em 1994, rubéola em 2015 e sarampo em 2016 (MENDES, 2016).

O número de casos de malária e o de mortes provocadas por essa doença em todo o mundo diminuiu nas últimas décadas, em grande parte, devido aos antimaláricos (AGUIRRE et al., 2005; MURPHY, 2014). Apesar disso, tem sido demonstrado que o plasmódio desenvolve resistência a essas drogas,

principalmente à terapia combinada à base de artemisinina ou ACTs (do inglês *Artemisinin-based Combination Therapy*), que é a mais indicada para tratar infecções pelo *Plasmodium falciparum* (BEESON et al., 2016; BIRKETT, 2016). Portanto, ainda são necessárias novas ferramentas para controlar a malária, como por exemplo, novas drogas ou uma vacina eficaz, capaz de gerar uma imunidade protetora e de longa duração (AGUIRRE et al., 2005; MURPHY, 2014).

Países da África Subsaariana necessitam urgentemente de vacinas capazes de diminuir os casos de morbidade e mortalidade causados pela malária, tendo em vista que grande parte das pessoas acometidas pela doença acaba morrendo em decorrência dela, incluindo crianças menores de cinco anos, que correspondem a aproximadamente 80% do total de mortos pela parasitose nesses países (BIRKETT, 2015).

Um dos focos para o desenvolvimento de vacina contra a malária é impedir que ocorra a invasão do merozoíta à célula vermelha, sendo capaz de evitar o aparecimento de manifestações clínicas da doença. Esse tipo de vacinação seria eficiente para viajantes e também para pessoas que vivem em áreas não endêmicas de países que possuem casos conhecidos da malária. Outro foco importante seria prevenir a mortalidade e morbidade de moradores de áreas endêmicas, principalmente crianças, tendo como foco impedir a replicação do parasita no sangue e evitar os efeitos causados pela liberação de suas toxinas (DOOLAN; HOFFMAN, 2001).

O desenvolvimento de uma vacina contra qualquer uma das cinco espécies de *Plasmodium* é muito desafiador, já que o ciclo de vida desse protozoário é complexo, envolvendo hospedeiros vertebrado (homem), onde ocorre o ciclo assexuado e invertebrado (mosquito), onde ocorre o ciclo sexuado (LONG; ZAVALA, 2016). Outras dificuldades envolvem eleger um antígeno que seja capaz de induzir uma imunidade protetora, encontrar um sistema adequado para o *delivery* da vacina e conseguir formular a vacina com adjuvante mais apropriado (OBALDIA et al., 2017). Apesar disso, novas pesquisas estão sendo feitas a fim de criar vacinas tendo como foco a interrupção do ciclo de vida desse parasita, com o objetivo de diminuir o número de transmissão da doença e futura eliminação da malária (BIRKETT, 2015).

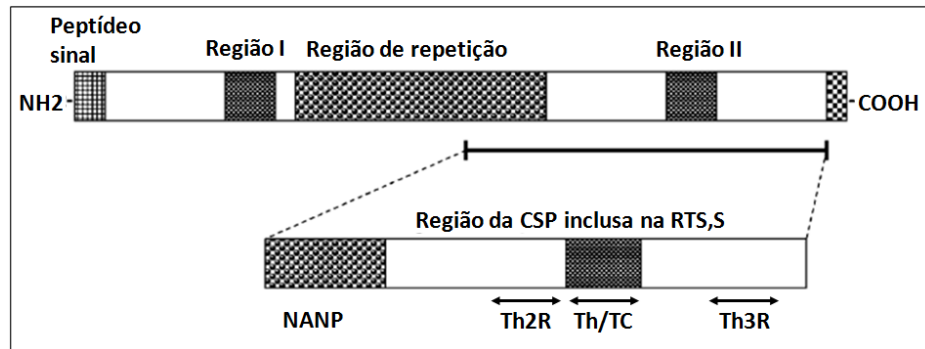
A vacinação com o esporozoíta irradiado foi o primeiro passo para novas descobertas de vacinação contra a malária. O método de irradiação faz com que o parasita consiga infectar o ser humano, mas não consegue multiplicar-se. Em humanos, foi possível estabelecer uma proteção adequada tanto contra o *Plasmodium falciparum* quanto contra o *Plasmodium vivax* em pessoas que foram picadas pelo mosquito infectado com os parasitas irradiados. Porém, esse tipo de vacinação apresentava certos riscos, como a possibilidade de reverter a patogênese do parasita, difícil estocagem e diferença do potencial imunogênico da vacina dependendo do lote (OGISE et al., 2016).

Apesar das dificuldades em se eleger formulações vacinais, atualmente existe uma vacina que completou a fase 3 de testes, a RTS,S/AS01 (RTS,S), uma partícula de proteína híbrida formulada em um adjuvante multicomponente denominado AS01 (HILL, 2011).

Os ensaios clínicos foram feitos com mais de 15 mil crianças de sete países da África Subsaariana e tiveram início em 2009. Elas foram divididas em dois grupos: o primeiro era composto por crianças de cinco a sete meses de idade que receberam a primeira dose da vacina RTS,S ou uma vacina controle; o segundo grupo continha crianças de seis a catorze semanas de idade e receberam a primeira dose da vacina RTS,S ou uma vacina controle juntamente com a vacina pentavalente do calendário de imunização. Todas as 15.460 crianças receberam três doses da vacina testada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016b). Essa vacina mostrou uma proteção de 30-50% nesses voluntários e após realizar um ensaio de campo, provou-se que os casos de malária clínica entre as crianças que haviam sido vacinadas diminuiram (NEVES, 2011).

A RTS,S possui uma eficácia ainda parcial contra a malária grave que afeta as crianças e é direcionada contra o *Plasmodium falciparum*, tendo como alvo a Proteína Circunsporozoíta (CSP), essencial para função e invasão dos esporozoítas no hepatócito (NEAFSEY et al., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Assim, essa vacina é capaz de impedir que a infecção chegue ao estágio sanguíneo e, conseqüentemente, ocorra o desenvolvimento das manifestações clínicas e, conseqüentemente, a transmissão do parasita para outras pessoas (CHAUDHURY et al., 2016).

**Figura 5 – Representação esquemática da CSP**



Fonte: Modificado de (CASARES; BRUMEANU; RICHIE, 2010)

A RTS,S contém as regiões de repetição central conservada e C-terminal da CSP do *Plasmodium falciparum*, expressas em esporozoítas e em esquizontes da fase hepática (LONG; ZAVALA, 2016). Os anticorpos anti-CSP presentes na região central estão relacionados com a proteção contra malária, ainda que não se saiba os mecanismos pelos quais os anticorpos específicos contra os esporozoítas conseguem mediar essa proteção (CHAUDHURY et al., 2016).

A imunidade humoral tem papel essencial na proteção do hospedeiro contra o plasmódio. São formados, por exemplo, anticorpos contra moléculas de superfície dos merozoítas, interferindo na invasão de hemácias; anticorpos contra moléculas expressas em gametócitos, impedindo que o ciclo do parasita continue e anticorpos contra os esporozoítas, inibindo a invasão das células do fígado. Apesar disso, atualmente não existe uma vacina que confira proteção totalmente satisfatória contra a malária, principalmente devido ao fato de que o parasita possui diversos mecanismos genéticos de escape, como o polimorfismo antigênico e a variação clonal de antígenos vacinais (FACULDADE DE MEDICINA DA USP, 2013).

A malária causada pelo *Plasmodium vivax* era considerada benigna, pois a prevalência e a parasitemia são relativamente baixas e os casos assintomáticos são diversos, porém já se sabe que esse parasita pode causar formas tão severas da doença quanto o *Plasmodium falciparum* e, ademais, a morbidade provocada pelo *Plasmodium vivax* provoca grandes impactos econômicos na sociedade (CUTTIS et al., 2014; HOSTETLER et al., 2015). Apesar disso, ainda não existe nenhuma vacina que seja capaz de prevenir uma infecção causada por esse parasita, reduzir a prevalência ou diminuir os casos severos da malária (HOSTETLER et al., 2015).

Por esse motivo, pesquisas estão sendo realizadas para que seja possível o desenvolvimento de novas vacinas contra o *Plasmodium vivax*, visto que até o ano de 2014, 23 candidatos vacinais do *Plasmodium falciparum* estavam sendo testados, enquanto que para o *Plasmodium vivax* apenas dois estavam nessa mesma situação. Isso se deve ao fato de que existem poucos modelos animais disponíveis e também há uma dificuldade em manter em cultura essa espécie do protozoário (CUTTS et al., 2014; HOWES et al., 2016).

#### 4.9 Candidatos vacinais

Sabendo-se a relevância de uma possível vacina para malária, pesquisadores têm buscado identificar diferentes antígenos do parasito capazes de induzir uma imunidade protetora (VALENCIA et al., 2011). A criação de vacina tendo como base a utilização desses antígenos tem como objetivo fazer com que ocorra a diminuição e até mesmo o bloqueio dos efeitos negativos que o parasita provoca no homem (NEVES, 2011).

A descoberta desses candidatos vacinais se deu a partir dos anos de 1980, quando a tecnologia do DNA Recombinante e a síntese de peptídeos começaram a ser utilizadas juntamente com o desenvolvimento de métodos de cultura do *Plasmodium falciparum*. Esse fato contribuiu para que ocorresse a seleção de antígenos de interesse, assim como sua expressão e purificação (VALENCIA et al., 2011).

Sendo assim, é necessário destacar alguns dos diversos candidatos vacinais de importância, como por exemplo: Pvs25 e Pvs28 que são proteínas presentes no estágio no mosquito; Proteína Anônima Relacionada à Trombospondina (TRAP) e Proteína Circunsporozoíta (CSP), que são antígenos da fase pré-eritrocítica; Proteína de Ligação ao Duffy (DBP), Proteína 1 de Superfície do Merozoíta (MSP1) e Antígeno Apical de Membrana 1 (AMA1), que são antígenos sanguíneos (VALENCIA et al., 2011).

Como o *Plasmodium vivax* é capaz de formar os hipnozoítas, controlar a doença torna-se ainda mais difícil. Contribui para isso o fato de que os sintomas clínicos começam a aparecer somente após a transmissão do parasita, já que os gametócitos são formados com muita rapidez, antes mesmo que o indivíduo

infectado seja diagnosticado. Sendo assim, a criação de vacinas que sejam capazes de interromper o ciclo de vida do parasita em qualquer estágio tem sua importância, especialmente em casos de infecção pelo *Plasmodium vivax* (REYES-SANDOVAL; BACHMANN, 2013).

#### **4.9.1 Candidatos vacinais: estágio no mosquito**

Na região luminal do intestino do mosquito, os gametócitos fertilizados originam o zigoto, que após 15-25h diferencia-se no oocineto, a forma presente no hospedeiro invertebrado e que possui motilidade. O oocineto atravessa o epitélio do intestino e então dá origem ao oocisto, que se diferencia em esporozoíta, forma que invade a glândula salivar do mosquito e é transmitida para o hospedeiro vertebrado (LI et al., 2004).

Pessoas que vivem em áreas endêmicas acabam desenvolvendo respostas imunes humorais e celulares contra antígenos do plasmódio após diversas exposições ao parasita. Dessa forma, quando o mosquito pica a pessoa infectada, anticorpos contra antígenos da fase sexual e algumas citocinas são ingeridos juntamente com o sangue. Todas essas substâncias interferem no ciclo esporogônico que ocorre no intestino do mosquito (ARÉVALO-HERRERA et al., 2011).

A finalidade de se desenvolver vacinas contra o estágio no mosquito é induzir imunidade contra gametócitos, zigotos e oocinetos de maneira que a exflagelação e a fertilização não possam ocorrer no hospedeiro invertebrado. Dessa forma, anticorpos seriam produzidos contra os antígenos do estágio sexual do mosquito, impossibilitando a continuação do ciclo e, conseqüentemente, os indivíduos imunizados, mesmo que infectados não conseguiriam transmitir a doença, ou seja, esse tipo de vacina seria um bloqueador da transmissão da malária (RICHARDS; MACDONALD; EISEN, 2006; WEBSTER; HILL, 2003).

Sendo assim, o controle da doença poderia ser estabelecido em regiões endêmicas (NEVES, 2011). Contudo, apesar de reduzir ou até mesmo impedir a transmissão da doença, essa vacina não seria capaz de proteger o indivíduo imunizado contra a infecção (WEBSTER; HILL, 2003).

Os candidatos P25 e P28 são proteínas de superfície do oocineto altamente conservadas, estando presentes nas espécies de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* (HOFFMAN et al., 2015; JIRILLO; BRANDONISIO, 2010). Ambos estão presentes durante a transição do oocineto para o oocisto, ainda que não se tenha conhecimento de como as interações moleculares entre esses antígenos e o intestino do mosquito ocorrem. Também são importantes para que ocorra invasão do oocineto ao epitélio intestinal do inseto e posteriormente medeia o desenvolvimento do oocisto, forma que se multiplica e origina o esporozoíta que é transmitido ao ser humano através da picada do *Anopheles* (REYES-SANDOVAL; BACHMANN, 2013; RODRÍGUEZ et al., 2007).

#### **4.9.2 Candidatos vacinais: antígenos da fase hepática (pré-eritrocítica)**

Após ser inoculado através da picada do mosquito infectado, o esporozoíta migra através da corrente sanguínea, onde fica pouco tempo (de alguns segundos a minutos), ao hepatócito e esse fato contribui para que o sistema imune seja incapaz de reagir com eficácia à infecção pelo plasmódio (REYES-SANDOVAL; BACHMANN, 2013). Dentro da célula do fígado, ocorre a maturação do esporozoíta e consequente desenvolvimento para esquizonte. Grande quantidade de esquizontes dentro do hepatócito acaba liberando centenas de merozoítas na corrente sanguínea, dando início à fase eritrocítica da doença (HOLZ; FERNANDEZ-RUIZ; HEATH, 2016).

O desenvolvimento de uma vacina para a fase pré-eritrocítica tem como objetivo fazer com que anticorpos impeçam que os esporozoítas consigam invadir os hepatócitos ou até mesmo induzir a produção de células T CD8+ com o objetivo de destruir as células hepáticas infectadas e que expressam o antígeno do parasita via MHC de classe I (REYES-SANDOVAL; BACHMANN, 2013; WEBSTER; HILL, 2003). Durante a fase pré-eritrocítica a parasitemia é baixa, portanto a pré-existência de células T de memória provenientes de uma vacina seria uma boa estratégia para eliminar as células hepáticas infectadas, o que evitaria a liberação dos merozoítas e, consequentemente, o início da fase eritrocítica, que é quando começam os sintomas da malária (HOLZ; FERNANDEZ-RUIZ; HEATH, 2016).

A Proteína Anônima Relacionada à Trombospondina (TRAP) é uma proteína de superfície do esporozoíta conservada entre as espécies de plasmódio. Ela é

armazenada nos micronemas e quando sua porção localizada próxima à região N-terminal fica exposta na superfície, ocorre a ligação entre moléculas presentes na região basolateral do hepatócito e o esporozoíta durante o primeiro contato do parasita com a célula a ser invadida (AKHOURI et al., 2008; CASTELLANOS et al., 2007). Além disso, auxilia na movimentação do esporozoíta e reconhecimento dos receptores presentes na glândula salivar do mosquito e também no hepatócito do hospedeiro vertebrado (AKHOURI et al., 2008).

No começo dos anos 2000 o potencial vacinal da TRAP foi testado em animais e notou-se que houve indução de altos níveis de anticorpos específicos contra essa proteína (HERRERA; ARÉVALO-HERRERA, 2010). Assim, Castellanos et al. (2007) mostraram, em camundongos BALB/c, a imunogenicidade da TRAP a partir da utilização de um peptídeo sintético derivado da porção conservada da proteína. Apesar de não terem resultados muito satisfatórios, esse estudo foi importante para mostrar a relevância da TRAP como candidato vacinal, que foi utilizado, por exemplo, por Ferraro et al. (2013) em uma vacina de DNA, demonstrando grande imunogenicidade em modelos animais, sendo capaz de estimular tanto a imunidade celular quanto a imunidade humoral.

Outro candidato vacinal de importância é a Proteína Circunsporozoíta (CSP) que é a maior proteína de superfície do esporozoíta e está envolvida com a invasão do plasmódio ao hepatócito e também à glândula salivar do mosquito e, portanto, tem um papel muito importante, já que é responsável pela motilidade do parasita (CHAUDHURY et al., 2016; VALENCIA et al., 2011). Por esse motivo, a Proteína Circunsporozoíta é o principal alvo para a ação de anticorpos anti-esporozoítas (CHAUDHURY et al., 2016).

A proteína Circunsporozoíta possui um tamanho de 58 kDa e tem uma região de repetição central flanqueada por regiões de não repetição. Ainda não se sabe a real função da região central da CSP, mas é provável que confira alguma vantagem adaptativa ao parasita, afinal é uma região conservada em diversas cepas do *Plasmodium falciparum*. A região N-terminal é importante para a invasão do esporozoíta nas glândulas salivares do mosquito e também para a ligação ao hepatócito, antes de invadi-lo. Já a região C-terminal tem como função, além da invasão nas glândulas salivares do mosquito, dar motilidade ao esporozoíta e

possibilitar a invasão aos hepatócitos. A parte da proteína reconhecida pelo sistema imune humano possui epítomos para células TCD4+, TCD8+ e B (CASARES; BRUMEANU; RICHIE, 2010).

#### **4.9.3 Candidatos vacinais: antígenos sanguíneos (fase eritrocítica)**

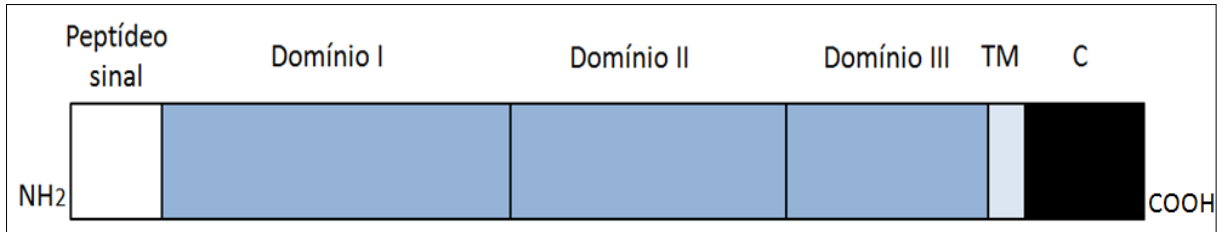
Os sintomas da malária, como anemia e complicações associadas, acontecem durante a fase eritrocítica, e são causadas devido à invasão, multiplicação e rompimento das hemácias pelos merozoítas. O desenvolvimento de uma vacina eficaz para essa fase que consiga interromper esse ciclo através de anticorpos capazes de barrar a entrada do merozoíta na célula sanguínea, por exemplo, poderia reduzir a doença clínica (ORD; RODRIGUEZ; LOBOS, 2015; VALENCIA et al., 2011). A grande dificuldade de se desenvolver uma vacina visando esse objetivo é encontrar um antígeno capaz de proporcionar uma resposta imune forte e que consiga neutralizar a infecção por diversas espécies do plasmódio (ORD; RODRIGUEZ; LOBOS, 2015).

As proteínas mais importantes para invasão do merozoíta às células sanguíneas estão presentes na superfície dessa forma celular, ou nas roptrias e micronemas presentes na região apical do parasita. Elas podem ser do tipo integral de membrana, ancorada por Glicosilfosfatidilinositol (GPI) ou periférica (BEESON et al., 2016).

Um dos possíveis candidatos vacinais relacionados à fase eritrocítica é o Antígeno Apical de Membrana 1 (AMA-1), que é uma proteína de 66 kDa presente no micronema (MUELLER; SHAKRI; CHITNIS, 2015). Esse antígeno é expresso nos merozoítas e também nos esporozoítas (na fase pré-eritrocítica), uma vez que é essencial para a invasão do esporozoíta no hepatócito e do merozoíta à célula sanguínea (SALAVATIFAR et al., 2015).

O AMA-1 é considerado antígeno imunogênico, ou seja, possibilita a produção de anticorpos, como já foi comprovado com indivíduos de áreas endêmicas, uma vez que esses anticorpos foram relacionados com imunidade naturalmente adquirida (ORD; RODRIGUEZ; LOBO, 2015).

#### **Figura 6 – Representação esquemática da AMA-1**

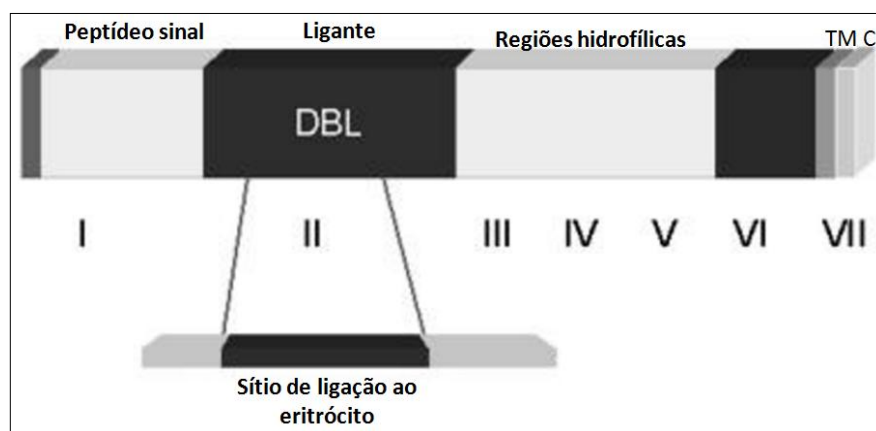


Fonte: Modificado de (BUENO et al., 2011)

O AMA-1 é uma proteína constituída pela região que contém o peptídeo sinal, o domínio transmembrana (TM), um segmento citoplasmático (C) e o ectodomínio (parte da proteína exposta ao exterior da célula) o qual possui três domínios distintos: domínio I (206 aa), domínio II (137 aa) e o domínio III (102 aa). O domínio II possui um alto grau de conservação de seus aminoácidos e é a região de maior imunogenicidade (BUENO et al., 2011).

Outro candidato vacinal de importância para desenvolvimento de vacinas contra o estágio sanguíneo é a Proteína de Ligação ao Duffy (DBP). A DBP é constituída por sete regiões: região I contém o peptídeo sinal, as regiões II e VI contêm regiões conservadas de cisteína, as regiões III, IV e V são hidrofílicas e, por fim, a região VII é composta por um domínio transmembrana (TM) e um segmento citoplasmático (C) (VANBUSKIRK; SEVOVA; ADAMS, 2004). A região II do antígeno Duffy possui 330 aminoácidos e a região central é a responsável pela ligação ao receptor do Antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) (SOUSA et al., 2014).

**Figura 7 – Representação esquemática da DBP**



Fonte: Modificado de (VANBUSKIRK; SEVOVA; ADAMS, 2004)

O antígeno (PvDBP) é secretado dos micronemas e se liga ao receptor presente no reticulócito, possibilitando a invasão do merozoíta do *Plasmodium vivax*

nessa célula (MUELLER; SHAKRI; CHITNIS, 2015). Esse processo de invasão é complexo, uma vez que envolve a necessidade de reorientação do parasita (a região apical deve estar voltada para a membrana da célula vermelha) para posterior penetração na célula a ser infectada (SOUSA et al., 2014).

O principal objetivo de se desenvolver uma vacina tendo como base esse antígeno é obter uma resposta imune com anticorpos específicos, os quais sejam responsáveis por evitar que ocorra a ligação entre o DBPII e o DARC presente nos reticulócitos e, conseqüentemente, impedir a invasão do merozoíta nessa célula (SOUSA et al., 2014).

Um dos principais antígenos candidatos para compor uma vacina contra o *P. vivax* é a Proteína 1 de Superfície do Merozoíta (MSP1), presente em grande quantidade e que aparentemente é necessária para que possa acontecer a adesão do merozoíta ao eritrócito, e como está na superfície pode ser alvo de anticorpos. Além disso, está associada à aquisição de respostas imunes humorais e celulares naturais, já que sabe-se que indivíduos de áreas endêmicas com altos títulos contra a MSP1(19) são mais resistentes à infecção causada por essa espécie do parasita (LIN et al., 2016; MUELLER; SHAKRI; CHITNIS, 2015; ZEYREK et al., 2008).

Durante a invasão aos eritrócitos, a MSP1 (de aproximadamente 195 kDa) é processada em 4 partes de 83, 30, 38 e 42 kDa. Ocorre outra clivagem com o último fragmento, resultando em um de 19 kDa e outro de 33kDa (MUELLER; SHAKRI; CHITNIS, 2015). Sua porção C-terminal, MSP1(19), mantém-se ligada à superfície do merozoíta e é carregada para dentro da célula hospedeira juntamente com o parasita (DUTTA et al., 2005). Essa porção tem sua importância, pois é altamente conservada entre as espécies do parasita e também é capaz de induzir a produção de anticorpos que podem bloquear a invasão do merozoíta do *Plasmodium vivax* à célula vermelha (DUTTA et al., 2005; ZEYREK et al., 2008).

**Figura 8 – Representação esquemática da MSP1**



Fonte: (CHEGN et al., 2013)

O candidato vacinal MSP1 é alvo interessante para o desenvolvimento de uma vacina de DNA para o *Plasmodium vivax*, já que impedir a invasão do merozoíta aos eritrócitos e impossibilitar sua replicação nessas células é uma boa estratégia para reduzir a morbidade e mortalidade causadas pela malária (CHERIF et al., 2011; MUELLER; SHAKRI; CHITNIS, 2015).

#### **4.10 Vacina de DNA**

A vacinação baseada em DNA iniciou-se com a tentativa de utilizar plasmídeos bacterianos não replicantes, capazes de codificar proteínas para terapia gênica (MURPHY, 2014). Animais foram inoculados com plasmídeo contendo genes normalmente expressos pelas células que neles foram transfectadas (DINIZ; FERREIRA, 2010). Esses animais mostraram-se capazes de responder aos antígenos produzidos, já que as proteínas expressas estimulavam uma resposta imune *in vivo* (produção de anticorpos, células citotóxicas e células de memória), que era segura e eficaz e não apresentava riscos de causar infecção ativa (DINIZ; FERREIRA, 2010; MURPHY, 2014).

A vacina de DNA é uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacinas contra a malária que precisa ser explorada, já que têm como vantagens em relação a outros métodos de vacinação a possibilidade de estimular tanto células B como células T, possibilidade de serem estocadas como um sedimento seco à temperatura ambiente, o que facilita o transporte das mesmas e também têm produção em grande escala relativamente fácil, além de serem mais baratas do que outros tipos de vacinas, como as baseadas em proteína recombinante (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a). Apesar de todas essas vantagens, esse novo conceito vacinal tem também suas desvantagens, como menor capacidade de imunização em humanos e em primatas não humanos quando comparada com outras formas mais tradicionais de imunização (OGISE et al., 2016).

A vacina de DNA baseia-se na inoculação de um plasmídeo (DNA circular extracromossomal de bactéria capaz de replicar de forma independente) contendo o DNA complementar (cDNA) que consegue codificar um antígeno proteico incapaz de causar doença, mas capaz de fazer com que o sistema imune neutralize esse

antígeno antes do mesmo causar algum dano ao organismo hospedeiro, ou seja, a proteína (antígeno proteico) estimula uma resposta imune (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

O DNA internalizado através de injeção intramuscular ou intradermal possibilita a expressão da proteína antigênica de forma natural no hospedeiro, permitindo a indução da resposta imune humoral e também da resposta imune celular. Dessa forma, as vacinas de DNA causam expressão prolongada do antígeno no hospedeiro e isso gera significativa memória imunológica (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008; TUTEJA, 2002).

Como o *Plasmodium vivax* não pode ser mantido *in vitro*, uma alternativa para esse parasita seria o desenvolvimento de uma vacina de DNA recombinante, já que testes em animais mostraram-se promissores quanto ao fato desse tipo de vacinação induzir uma imunidade protetora e, além disso, é considerada fácil de produzir, já que possui custos não muito altos e é capaz de induzir imunidade celular e humoral (TUTEJA, 2002).

Apesar de mostrarem-se boas indutoras de imunidade humoral e celular em modelos animais, em ensaios clínicos os resultados não são os mesmos. Ao fazer uma única imunização ou em doses repetidas, a indução de células T não se mostra satisfatória. Outra técnica de imunização conhecida como dose inicial-reforço (*Prime-boost Immunization*) parece ser mais eficaz, pois induz o aumento de anticorpos e de resposta imune celular contra malária. Essa técnica consiste em fazer uma sequência de imunizações apresentando o antígeno de diferentes formas para o sistema imune (ex: utilização de plasmídeo e de adenovírus carregando a informação genética capaz de codificar a proteína/antígeno) (SHEIKH, et al., 2016).

Diversos trabalhos mostraram que as vacinas de DNA são boas indutoras de imunidade humoral e celular em diferentes modelos animais. Resultados de alguns desses trabalhos podem ser conferidos no quadro abaixo:

**Quadro 1 – Resultados de vacinas de DNA contra o *Plasmodium***

Referências Detalhes	KONGKASURIYACHAI et al., 2004	CHERIF et al., 2011	RICHE et al., 2012	FERRARO et al., 2013	SHEIKH et al., 2016	OBALDIA et al., 2017
<b>Espécie do plasmódio utilizada</b>	<i>P. vivax</i>	<i>P. yoelii</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>
<b>Principais objetivos</b>	Testar a eficácia de vacina de DNA contra Pvs25 e Pvs28	Testar novo método de <i>delivery</i> para vacina de DNA utilizando candidato vacinal já caracterizado	Determinar o grau de segurança do MuStDO5 e determinar a imunogenicidade e proteção contra esporozoítas	Avaliar a resposta imunológica induzida pela vacina de DNA multiantigênica (MAV4) após introduzi-la por eletroporação <i>in vivo</i>	Avaliar a imunogenicidade e da vacina de DNA codificando PvMSP1(42) utilizando estratégia de <i>Prime-Boost</i>	Induzir anticorpos utilizando imunização heteróloga ( <i>Prime-Boost</i> )
<b>Imunização em</b>	Camundongos BALB/c	Camundongos C57BL/6	Adultos humanos	Camundongos BALB/c e macacos <i>Rhesus</i>	Camundongos BALB/c	Macacos <i>Aotus</i>
<b>Antígenos</b>	Pvs25 e Pvs28	MSP1-19	CSP, LSA-1, LSA-3, EXP1 e TRAP	CSP, LSA-1, TRAP e CeITOS	MSP1-42	MSP1-42 e AMA1
<b>Vetor Plasmidial</b>	VR1020	VR1020	*	pVAX1 modificado	pcDNA 3.1	VR1020
<b>Métodos utilizados para administrar a vacina</b>	Injeção intramuscular	Injeção intramuscular, intraperitoneal e subcutânea	Injeção intramuscular	Injeção intramuscular seguida por eletroporação	Injeção intramuscular	Injeção intradérmica
<b>Resultados</b>	Imunização heteróloga (DNA/proteína) induziu grande produção de anticorpos e preveniu a infecção nos mosquitos	Vacina de DNA mostrou significante imunogenicidade, induzindo respostas imunes celular e humoral	Vacina mostrou-se segura e bem tolerada, sendo capaz de induzir respostas imunes celulares	Demonstrou grande imunogenicidade em modelos animais, estimulando imunidade humoral e celular	Resposta imunológica é mais eficiente ao utilizar plasmídeo ( <i>Prime</i> ) e proteína recombinante ( <i>Boost</i> )	Imunização heteróloga utilizando os dois antígenos mostrou-se parcialmente eficaz nos macacos

\*dado não citado no artigo

A utilização de um veículo juntamente com um adjuvante é importante para melhorar a imunização, pois facilita o transporte do antígeno para o local de ação e ativação de células que aumentam a imunogenicidade do antígeno, ou seja, ao misturar os antígenos da vacina com o adjuvante, a resposta imunológica do hospedeiro é aumentada. Contudo, selecionar adjuvantes que sejam seguro para o homem não é tarefa simples (CHERIF et al., 2011; MURPHY, 2014; SOERENSEN; MARULLI, 1999).

Os adjuvantes mais utilizados em pesquisa com o *Plasmodium vivax* incluem o adjuvante de Freund, Montanide ISA 720 e Alum (HERRERA; ARÉVALO-HERRERA, 2010). Contudo, ainda existe um questionamento sobre a adequação deles quanto ao uso em seres humanos, imunogenicidade e estabilidade (OGISE et al., 2016).

O adjuvante completo de Freund foi criado com o objetivo de possibilitar a liberação contínua do antígeno e, conseqüentemente, induzir imunização constante na pessoa imunizada. Já foi demonstrado que esse adjuvante é capaz de impedir o desenvolvimento do plasmódio em diferentes estágios do ciclo de vida. Contudo, em humanos provoca reações adversas como lesões e granulomas no local da injeção (OGISE et al., 2016).

O Alum é um gel baseado em diversas composições de alumínio. A escolha desse adjuvante se deve ao fato de ser seguro, ter formulação relativamente simples, possibilitar o aumento de resposta imune celular e melhorar a estabilização do antígeno. O uso desse adjuvante em estudos baseados no estágio sanguíneo da malária revelou uma resposta imune moderada, apesar do Alum não ser capaz de induzir resposta imune Th1 a qual é importante contra patógenos intracelulares (OGISE et al., 2016).

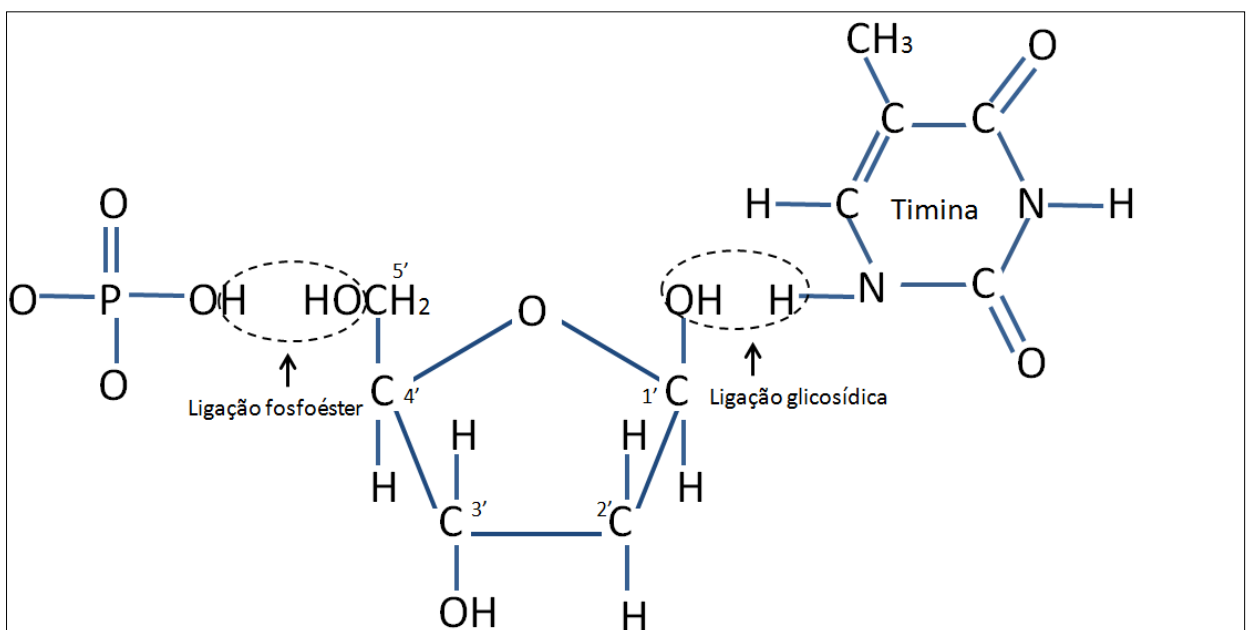
O Montanide é uma emulsão muito utilizada em ensaios vacinais da malária. Em estudos onde foi utilizado juntamente com antígenos da fase eritrocítica foi observada forte resposta imune, mesmo com instabilidade nesses antígenos. Todavia, reações adversas no local da aplicação podem aparecer ao utilizar esse adjuvante (OGISE et al., 2016).

A vacina de DNA tem por princípio a tecnologia do DNA Recombinante que se baseia na extração do DNA, purificação, construção de um plasmídeo recombinante contendo a sequência que codifica para a proteína alvo, transformação em bactérias, clonagem e isolamento dos plasmídeos.

#### 4.11 Estrutura do DNA e processo de síntese proteica

O nucleotídeo é uma estrutura fundamental para a constituição do DNA, formado pela ligação entre um fosfato, um açúcar (desoxirribose) e uma base nitrogenada (adenina, guanina, citosina ou timina). Ocorre uma ligação glicosídica entre o açúcar e a base nitrogenada, e uma ligação fosfoéster entre a hidroxila do açúcar e o fosfato. (WATSON, 2015).

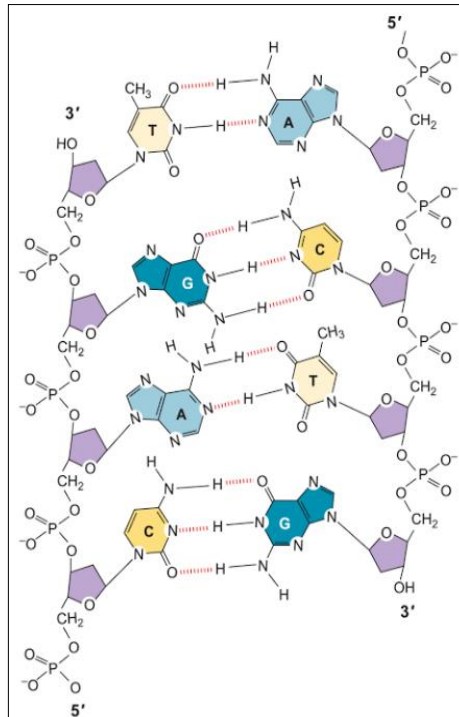
**Figura 9 – Representação de um nucleotídeo de desoxirribose**



Fonte: Modificado de (WATSON, 2015)

O DNA é estruturado em forma de dupla-hélice e é composto por cadeias polinucleotídicas, ou seja, possuem diversos nucleotídeos e entre eles existem ligações fosfodiéster, em que o grupo hidroxila do carbono 3' de um nucleotídeo se liga ao fosfato ligado ao grupo 5' de outro nucleotídeo. Essas cadeias estão dispostas de maneira antiparalela, ou seja, em direções opostas (WATSON, 2015).

**Figura 10 – Estrutura detalhada do polímero polinucleotídico**



Fonte: (WATSON, 2015)

Esse esqueleto formado por moléculas de fosfato e de açúcar apresenta certa regularidade, ao contrário da ordem das bases nitrogenadas, o que determina qual informação está contida no DNA, ou seja, qual sequência gênica será transcrita, traduzida e então expressa. A região a ser transcrita possui sequências específicas de DNA que definem o início e outras sequências que definem o fim da transcrição (WATSON, 2015).

A transcrição do DNA para RNA se dá a partir da fita molde (3'→5') e a enzima RNA-polimerase é responsável por esse processo, o qual ocorre em três etapas: início, alongamento e término. O início é caracterizado pela ligação da enzima a um promotor (sequência do DNA) e é esse promotor que determina o segmento do DNA a ser transcrito, sendo também a principal forma de regulação. A fase de alongamento é caracterizada por formar o segmento de RNA pela RNA-polimerase. A última fase (término) ocorre após toda a síntese da nova molécula de RNA, ou seja, nessa fase a enzima para o processo de transcrição, libera o RNA mensageiro (mRNA) produzido e dissocia-se do DNA (WATSON, 2015).

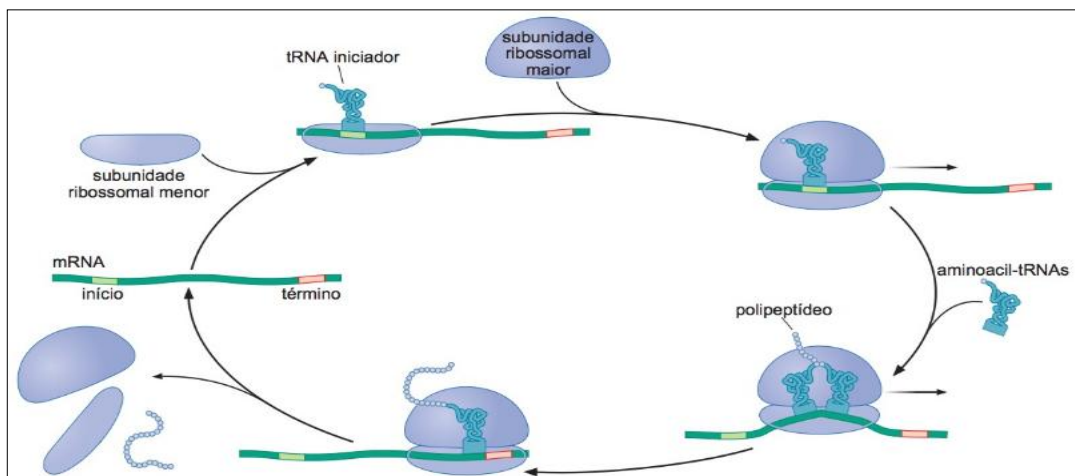
A tradução é o processo caracterizado por originar as proteínas (sequências de aminoácidos) a partir da sequência de nucleotídeos do mRNA. A região codificadora contém os códons (sequências de três nucleotídeos) que determinam a

incorporação do aminoácido. Esses códons formam uma cadeia contínua chamada de fase aberta de leitura (ORF – *Open Reading Frame*), sendo que cada ORF é responsável pela formação de uma proteína específica (WATSON, 2015).

O processo da tradução se inicia na extremidade 5' da ORF, no primeiro códon (códon de início, que em células eucarióticas é o 5'-AUG-3') e termina na extremidade 3', onde está o códon de parada (podendo ser 5'-UAG-3', 5'-UGA-3' ou 5'-UAA-3'). As moléculas de RNA transportador (tRNA) são responsáveis por interpretar a informação contida nos códons e traduzi-la em aminoácido. Outra molécula importante no processo da tradução é o ribossomo. Essa macromolécula é composta pelas subunidades maior (forma as ligações peptídicas) e menor (onde os tRNAs se ligam ao mRNA e leem os códons) (WATSON, 2015).

A tradução ocorre em um ciclo de associação e dissociação do ribossomo com o mRNA, conhecido como “ciclo do ribossomo”.

**Figura 11 – Ciclo do Ribossomo**



Fonte: (WATSON, 2015)

Sendo assim, a tradução começa quando ocorre a ligação do mRNA e do tRNA com a subunidade menor do ribossomo. Após a formação dessa ligação, uma subunidade maior livre é recrutada, formando um ribossomo completo. A síntese da proteína tem início no primeiro códon da extremidade 5' do mRNA e termina no códon de parada, localizado na outra extremidade. Ao encontrar esse último códon, o ribossomo libera a cadeia polipeptídica formada, dissocia-se do mRNA, liberando as subunidades maior e menor para que possam ficar disponíveis para fazer a

ligação com outra molécula do RNA mensageiro e dar início a um novo ciclo da síntese proteica (WATSON, 2015).

#### **4.12 Tecnologia do DNA Recombinante**

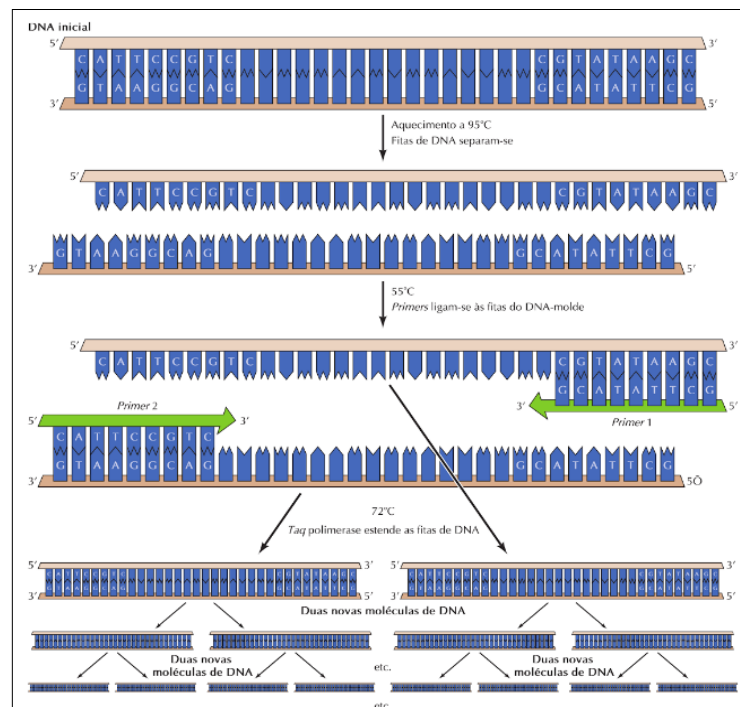
Em 1973, os cientistas norte-americanos Stanley Cohen e Herbert Boyer produziram os primeiros organismos com DNA Recombinante. Eles utilizaram enzimas de restrição para clivar sequências de DNA de dois plasmídeos de *Escherichia coli*, sendo que cada plasmídeo era capaz de conferir resistência a antibióticos diferentes, e então uniram os fragmentos com DNA ligase. Novas células de *E. coli* receberam esse plasmídeo recém formado e observou-se que essas células eram resistentes aos dois antibióticos. Esse evento deu início à tecnologia do DNA Recombinante (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013; SADAVA, et al., 2009).

A técnica do DNA Recombinante permite recombinar duas moléculas diferentes de DNA após a clivagem das mesmas com enzimas de restrição (endonucleases que rompem ligações fosfodiéster em sítios específicos de sequências palindrômicas) tornando possível a obtenção de organismos com características exclusivas (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013). Juntamente com técnicas de replicação, separação e identificação é possível produzir grandes quantidades de fragmentos de DNA purificados, com o objetivo de poder estudar, localizar, isolar e até mesmo alterar diversos segmentos de DNA (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013; DEVLIN, 2007; WATSON, 2015).

O processo da clonagem de DNA é feito através da introdução da molécula de DNA Recombinante em um organismo hospedeiro (normalmente a *Escherichia coli*) capaz de replicá-lo, ou seja, produzir mais cópias dessa molécula. O processo de construção do DNA Recombinante inicia-se com a extração do DNA de células do organismo que possui o gene de interesse capaz de codificar a proteína antigênica e clivagem desse material em sequências específicas, utilizando enzimas de restrição. Após ser clivado, esse DNA precisa ser ligado a um vetor de expressão com uma enzima de ligação (DNA ligase). Assim, as moléculas de DNA Recombinante são criadas e podem ser propagadas e produzidas em grande quantidade (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013; WATSON, 2015).

Após a extração do DNA de interesse, o isolamento do gene específico pode ser feito através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), que permite a amplificação de pequenos fragmentos de DNA em grandes quantidades e em poucas horas (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013).

**Figura 12 – Amplificação de uma molécula de DNA por PCR**



Fonte: (COOPER; HAUSMAN, 2007)

Na PCR são utilizados oligonucleotídeos/*primers* (normalmente constituídos por 15 a 20 bases) que flanqueiam a região de interesse do DNA a ser amplificada. A primeira etapa consiste em separar as duas fitas do DNA através do aquecimento e então é feito um resfriamento que possibilita o anelamento dos *primers* em cada fita do DNA molde. A síntese de novas moléculas de DNA é feita a partir das regiões as quais os *primers* estão ligados e a DNA polimerase (*Taq polimerase*) é responsável por esse processo. Tudo isso acontece diversas vezes, em ciclos que resultam na duplicação do DNA através da amplificação (COOPER; HAUSMAN, 2007).

Após a amplificação do gene específico a eletroforese é feita para separar as moléculas de acordo com o tamanho. Assim é possível fazer a extração do gel, ou seja, corta-se a banda correspondente ao gene de interesse e ela deve ser purificada. Depois de purificá-la, a ligação no vetor é feita (BORGES-OSÓRIO;

ROBINSON, 2013). Para fazer essa ligação, tanto o fragmento de DNA quanto o vetor precisam ser digeridos com a mesma enzima de restrição (endonuclease) (SOERENSEN; MARULLI, 1999).

A ligação dos dois fragmentos diferentes de DNA é possível ao utilizar-se uma DNA ligase (faz a ligação fosfodiéster entre o fosfato na extremidade 5' e um OH livre na extremidade 3') e enzimas de restrição, que são específicas de acordo com a sequência de nucleotídeos que possuem. Algumas são capazes de hidrolisar as duas fitas de DNA de forma simétrica, ou seja, cortam as fitas de DNA no mesmo par de bases dentro da sequência de reconhecimento, produzindo extremidade cega e outras são capazes de cortar as duas fitas de forma assimétrica, formando “caudas” de fita simples (DEVLIN, 2007; SADAVA et al., 2009). Essas caudas são chamadas de extremidades coesivas, já que possuem sequências de bases que podem parear com as bases da outra extremidade complementar (SADAVA et al., 2009).

**Figura 13 – Representação de endonucleases**

Extremidades coesivas	Extremidades cegas
5' G ↓ A A T T C 3' 3' C T T A A ↑ G 5'	5' C A G ↓ C T G 3' 3' G T C ↑ G A C 5'
Ex: ECOR I	Ex: Pvu II

Fonte: Modificado de (NEW ENGLAND BIOLABS, 2016)

O tamanho do fragmento a ser clonado determina qual vetor deve ser escolhido, pois o vetor plasmidial somente consegue ter a ele ligado, fragmentos de até seu tamanho. Além disso, esse vetor deve ser capaz de transferir o DNA para dentro da célula de outro organismo (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013). Normalmente os vetores utilizados possuem características essenciais para que o DNA clonado possa propagar-se na célula hospedeira, sendo que o vetor mais comum é o plasmídeo, que é uma molécula de DNA circular (DEVLIN, 2007; WATSON, 2015).

Os vetores de expressão são muito utilizados quando se quer expressar genes mutantes presentes no inserto do DNA, já que são capazes de controlar esse

processo. Para isso, precisam ter promotores de transcrição junto ao sítio múltiplo de clonagem a fim de fazer com que esses genes sejam transcritos em RNA mensageiro e posteriormente traduzidos em proteínas recombinantes (WATSON, 2015).

O vetor de expressão precisa ser menor do que os cromossomos do hospedeiro ter um sítio múltiplo de clonagem (região do plasmídeo que possui sequências para determinadas enzimas de restrição e sítio de inserção do gene), origem de replicação (permite a replicação do DNA, independentemente da célula hospedeira), gene de resistência a antibiótico e um promotor de transcrição (possibilita a expressão do gene inserido em níveis muito altos) (SADAVA, et al., 2009). Esse vetor permite a análise das funções do gene de interesse, já que uma de suas características é a presença de um promotor de transcrição imediatamente ao lado do sítio de inserção do gene, possibilitando a expressão e também o isolamento e purificação do mesmo (WATSON, 2015).

Após o processo de ligação dos fragmentos produzidos pelas enzimas de restrição, a molécula de DNA recombinante é formada e deve ser inserida em uma célula capaz de fazer a replicação desse material para que então possa alterar a expressão do gene de interesse. Esse processo de introduzir a molécula de DNA recombinante em uma célula é chamado de clonagem (DEVLIN, 2007; WATSON, 2015).

Uma vacina ideal contra malária seria aquela feita com diversos antígenos de diferentes etapas do ciclo do parasita, ou seja, composta por antígenos da fase hepática, sanguínea e da presente no mosquito (bloqueador da transmissão da doença), e também componentes específicos do *Plasmodium vivax* e do *Plasmodium falciparum*, que são as principais espécies desse parasita (TUTEJA, 2002).

A estratégia de criar uma vacina multiantigênica seria importante principalmente contra o *Plasmodium vivax*, uma vez que são feitos poucos investimentos para produção de proteínas recombinantes contra esse parasita (SHEIKH et al., 2016). Contudo, antes que se consiga elaborar uma vacina multivalente, outras estratégias são válidas.

Sendo assim, a criação de uma vacina contra a malária causada pelo *Plasmodium vivax* poderia ser feita através da tecnologia do DNA Recombinante, mesmo que ainda não se saiba se esse tipo de vacinação é capaz de induzir uma proteção suficiente. Essa estratégia mostra-se interessante já que é mais simples e mais barata do que outros métodos utilizados para elaboração de vacinas, como por exemplo, a produção de proteínas recombinantes. Além disso, testes em animais mostram resultados promissores quanto à indução de resposta imune humoral e celular (TUTEJA, 2002).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabendo da gravidade da malária e que ela ainda ocorre em diversos países, inclusive no Brasil (principalmente Região Amazônica), novas formas de controle dessa doença são necessárias. Assim, a criação de vacinas, apesar das dificuldades que existem, é uma estratégia a se pensar, já que algumas espécies do parasita estão se mostrando resistentes à principal droga utilizada no tratamento.

O desenvolvimento de uma vacina contra qualquer estágio do plasmódio é complexo, sendo que uma das principais dificuldades está em eleger candidatos vacinais adequados e que possam ser utilizados para que se consiga criar uma vacina eficaz. Além disso, diversas formulações vacinais estão sendo testadas, como vacinação com o plasmódio atenuado, Proteína Recombinante e vacina de DNA. Essa última é importante, pois seria possível criar uma vacina multiantigênica, ou seja, contra diversos antígenos do plasmódio.

A imunização feita através da utilização da vacina de DNA está em desenvolvimento, e por esse motivo a imunogenicidade ainda não é ideal, então novas medidas precisam ser tomadas para melhorar a vacinação com o plasmídeo recombinante. Apesar disso essa estratégia parece promissora, já que a vacina de DNA possui diversas vantagens em relação aos outros métodos, pois ao utilizar o próprio organismo para sintetizar a proteína (antígeno do parasita), essa vacina estimula a imunidade celular e também a humoral, além de ser de fácil produção, mais barata e mais fácil de armazenar.

Sendo assim, esforços para o desenvolvimento de uma vacina de DNA contra qualquer antígeno do plasmódio são válidos, pois a malária ainda é responsável por diversos casos de morbidade e mortalidade em muitos países e novas formas de controle mais eficazes seriam muito importantes para reduzir e até mesmo acabar com esses casos preocupantes.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 355 p.

AGUIRRE, Augusto Valderrama et al. Antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of *Plasmodium vivax* PV200L: A potential malaria vaccine subunit. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.l.], v.73, p. 16-24, Nov. 2005. Disponível em: <[http://www.ajtmh.org/content/73/5\\_suppl/16.long](http://www.ajtmh.org/content/73/5_suppl/16.long)>. Acesso em: 29 jul. 2016.

AKHOURI, Reetesh et al. Role of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related anonymous protein in host-cell interactions. **Malaria Journal**, [S.l.], v. 7, n. 1, p.63-73, Apr. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2373790/>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

ARÉVALO-HERRERA, Myriam et al. Malaria transmission blocking immunity and sexual stage vaccines for interrupting malaria transmission in Latin America. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 106, p.202-211, Aug. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4830685/>>. Acesso em: 18 abr. 2017.

BEESON, James G. et al. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. **Fems. Microbiology Reviews**, Oxford, v. 40, n. 3, p.343-372, Feb. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article/40/3/343/2570117/Merozoite-surface-proteins-in-red-blood-cell>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

BIRKETT, Ashley J. Building an effective malaria vaccine pipeline to address global needs. **Vaccine**, Washington, v. 33, n. 52, p.7538-7543, Dec. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15014152>>. Acesso em: 13 set. 2016.

BIRKETT, Ashley J. Status of vaccine research and development of vaccines for malaria. **Vaccine**, Washington, v. 34, n. 26, p.2915-2920, Jun. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X16002942>>. Acesso em: 19 ago. 2016.

BORGES-OSÓRIO, Maria R.; ROBINSON, Wanyce M. **Genética Humana**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 784 p.

BOYLE, Michelle J. et al. Recent insights into humoral immunity targeting *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. **International Journal For Parasitology**, [S.l.], v. 47, n. 3, p.99-104, Jul. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751916301370>>. Acesso em: 24 out. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletins e mapas interativos**: Região Amazônica. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <[https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1316\\_2017\\_01\\_12/casos\\_notificados\\_2016\\_regio\\_Amaznica](https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1316_2017_01_12/casos_notificados_2016_regio_Amaznica)>. Acesso em: 04 jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 35 p. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_pratico\\_malaria.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf)>. Acesso em: 20 fev. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 116 p. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/malaria\\_diag\\_manual\\_final.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/malaria_diag_manual_final.pdf)>. Acesso em: 20 fev. 2017.

BRASIL. Portal da Saúde. Ministério da Saúde. **Malária**: Descrição da doença. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11342-descricao-da-doenca>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

BUENO, Lilian Lacerda et al. Identification of a Highly Antigenic Linear B Cell Epitope within *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1). **Plos One**, [S.l.], v. 6, n. 6, p.1289-1300, Jun. 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0021289#pone-0021289-g003>>. Acesso em: 18 abr. 2017.

CASARES, Sofia; BRUMEANU, Teodor-doru; RICHIE, Thomas L. The RTS,S malaria vaccine. **Vaccine**, [S.l.], v. 28, n. 31, p.4880-4894, Jul. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X10007218>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

CASTELLANOS, Angélica et al. *Plasmodium vivax* thrombospondin related adhesion protein: immunogenicity and protective efficacy in rodents and *Aotus* monkeys. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 3, p.411-416, Jun. 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762007000300022](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762007000300022)>. Acesso em: 20 mar. 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **About Malaria**: Biology. 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

CHAUDHURY, Sidhartha et al. The biological function of antibodies induced by the RTS,S/AS01 malaria vaccine candidate is determined by their fine specificity. **Malaria Journal**, [S.l.], v. 15, n. 1, p.1-12, May 2016. Disponível em: <<https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-016-1348-9>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

CHENG, Y. et al. The *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 Paralog Is a Novel Erythrocyte-Binding Ligand of *P. vivax*. **Infection And Immunity**, [S.l.], v. 81, n. 5, p.1585-1595, Mar. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648005/>>. Acesso em: 18 abr. 2017.

CHERIF, Mahamoud S. et al. Immunogenicity of novel nanoparticle-coated MSP-1 C-terminus malaria DNA vaccine using different routes of administration. **Vaccine**, [S.l.], v. 29, n. 48, p.9038-9050, Nov. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X1101437X>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

COOPER, Geoffrey M.; HAUSMAN, Robert E. **A Célula: Uma Abordagem Molecular**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 736 p.

CUTTS, Julia C. et al. Immunological markers of *Plasmodium vivax* exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. **Bmc Medicine**, [S.l.], v. 12, n. 1, p.1-20, Sept. 2014. Disponível em: <<https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-014-0150-1>>. Acesso em: 12 dez. 2016.

DEVLIN, Thomas M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**, 6. ed. São Paulo: Edgar Blucher, 2007. 1186 p.

DINIZ, Mariana de Oliveira; FERREIRA, Luís Carlos de Souza. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 19-30, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-40142010000300003&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000300003&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 15 Jul. 2016.

DOOLAN, Denise L; HOFFMAN, Stephen L. DNA-based vaccines against malaria: status and promise of the Multi-Stage Malaria DNA Vaccine Operation. **International Journal For Parasitology**, [S.l.], v. 31, n. 8, p.753-762, Jun. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751901001849>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

DUTTA, Sheetij et al. Merozoite Surface Protein 1 of *Plasmodium vivax* Induces a Protective Response against *Plasmodium cynomolgi* Challenge in *Rhesus* Monkeys. **Infection And Immunity**, [S.l.], v. 73, n. 9, p.5936-5944, Sept. 2005. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/73/9/5936.long>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

FACULDADE DE MEDICINA DA USP. **Patologia de Febres Hemorrágicas FMUSP: Malária**. 2013. Disponível em: <<http://www2.fm.usp.br/pfh/mostrahp.php?origem=pfh&xcod=Malaria>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

FERRARO, B. et al. Inducing Humoral and Cellular Responses to Multiple Sporozoite and Liver-Stage Malaria Antigens Using Exogenous Plasmid DNA. **Infection And Immunity**, [S.l.], v. 81, n. 10, p.3709-3720, Jul. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3811783/>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

FILHO, Geraldo B. **Bogliolo Patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1501 p.

HERRERA, Sócrates; ARÉVALO-HERRERA, Myriam. Progress Toward the Development of a *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine. In: JIRILLO, Emilio; BRANDONISIO, Olga (Ed.). **Immune Response to Parasitic Infections: Protozoa**. [S.l.]: Bentham Science Publishers, 2010. Cap. 4. p. 43-54. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=bfTnV-T60uoC&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em: 19 fev. 2017.

HILL, Adrian V. S. Vaccines against malaria. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [S.l.], v. 366, n. 1579, p.2806-2814, Sept. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3146776/>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

HOFFMAN, Stephen L. et al. The march toward malaria vaccines. **Vaccine**, [S.l.], v. 33, n. 4, p.13-23, Nov. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15010701>>. Acesso em: 09 set. 2016.

HOLZ, Lauren e; FERNANDEZ-RUIZ, Daniel; HEATH, William R. Protective immunity to liver-stage malaria. **Clinical & Translational Immunology**, [S.l.], v. 5, n. 10, p.105-115, Oct. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5099428/>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

HOSTETLER, Jessica B. et al. A Library of *Plasmodium vivax* Recombinant Merozoite Proteins Reveals New Vaccine Candidates and Protein-Protein Interactions. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.l.], v. 9, n. 12, p.1-24, Dez. 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004264>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

HOWES, Rosalind E. et al. Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.l.], v. 95, n. 6, p.15-34, 11 Jul. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5198891/>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

JIRILLO, Emilio; BRANDONISIO, Olga. **Immune Response to Parasitic Infections: Protozoa**. [S.l.]: Bentham Science Publishers, 2010. 195 p. Disponível em: <

T60uoC&pg=PA49&lpg=PA49&dq=Pvs25&source=bl&ots=auTehUL\_O-&sig=4BMNkPsbUA6AlgnIolk6D0iMe7g&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwisg8bw3\_TSAhWIjJAKHdw1CQg4ChDoAQghMAI#v=onepage&q=Pvs25&f=false>. Acesso em: 10 fev. 2017.

KINDT, Thomas J.; GOLDSBY, Richard A.; OSBORNE, Barbara A. **Imunologia de Kuby**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 704 p.

KONGKASURIYACHAI, Darin et al. Potent immunogenicity of DNA vaccines encoding *Plasmodium vivax* transmission-blocking vaccine candidates Pvs25 and Pvs28—evaluation of homologous and heterologous antigen-delivery prime-boost strategy. **Vaccine**, [S.l.], v. 22, n. 23-24, p.3205-3213, Aug. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X0400180X>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

LACERDA, Marcus VG et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal**, [S.l.], v. 11, n. 1, p.1-18, Jan. 2012. Disponível em: <<https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-12>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

LI, Fengwu et al. *Plasmodium* Ookinete-secreted Proteins Secreted through a Common Micronemal Pathway Are Targets of Blocking Malaria Transmission. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 279, n. 25, p.26635-26644, Apr. 2004. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/279/25/26635.long>>. Acesso em: 07 out. 2016.

LIMA-JUNIOR, Josué da Costa; PRATT-RICCIO, Lilian Rose. Major Histocompatibility Complex and Malaria: Focus on *Plasmodium vivax* Infection. **Front. Immunol.**, [S.l.], v. 7, n. 13, p.1-13, Jan. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4728299/>>. Acesso em: 13 set. 2016.

LIN, Clara S. et al. Multiple *P. falciparum* Merozoite Surface Protein 1 Complexes Mediate Merozoite Binding to Human Erythrocytes. **The Journal Of Biological Chemistry**. [S.l.], v. 291, n. 14, p. 7703-7715, Jan. 2016. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/early/2016/01/28/jbc.M115.698282.long>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

LONG, Carole A.; ZAVALA, Fidel. Malaria vaccines and human immune responses. **Current Opinion In Microbiology**, [S.l.], v. 32, p.96-102, Aug. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527416300418>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

MACHADO, Patrícia et al. A contribuição dos polimorfismos humanos do eritrócito na proteção contra a malária. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 4, p.85-96, dez. 2010. Disponível em:

<[http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?pid=S2176-62232010000400013&script=sci\\_arttext&lng=es](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?pid=S2176-62232010000400013&script=sci_arttext&lng=es)>. Acesso em: 23 set. 2016.

MACIEL, Cibele; MACIEL, Ceres. Malária. In: ROCHA, Arnaldo (Org.). **Parasitologia**. São Paulo: Rideel, 2013. cap. 8, p. 80-91.

MENDES, Amanda. **Brasil recebe certificado de eliminação do sarampo**. 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/25846-brasil-recebe-certificado-de-eliminacao-do-sarampo>>. Acesso em: 27 mar. 2017.

MONTEIRO, Thais H. A. et al. Basic sanitation, socioeconomic conditions, and degree of risk for the presence and maintenance of malaria in a low-transmission area in the Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 48, n. 5, p.573-579, Oct. 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822015000500573&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822015000500573&lang=pt)>. Acesso em: 25 jul. 2016.

MUELLER, Ivo; SHAKRI, Ahmad Rushdi; CHITNIS, Chetan E. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. **Vaccine**, [S.l.], v. 33, n. 52, p.7489-7495, Dec. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15013365>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 868 p.

NEAFSEY, Daniel E. et al. Genetic Diversity and Protective Efficacy of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine. **New England Journal Of Medicine**, [S.l.], v. 373, n. 21, p.2025-2037, Nov. 2015. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1505819#t=article>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. 546 p.

NOGUEIRA, Fátima; ROSÁRIO, Virgílio Estólio do. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 3, p.109-124, set. 2010. Disponível em: <[http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?pid=S2176-62232010000300015&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?pid=S2176-62232010000300015&script=sci_arttext&lng=pt)>. Acesso em: 17 jun. 2016.

OBALDIA, Nicanor et al. A *Plasmodium vivax* plasmid DNA- and adenovirus-vectored malaria vaccine encoding blood stage antigens AMA1 and MSP142 in a prime/boost heterologous immunization regimen partially protects *Aotus* monkeys against blood stage challenge. **Clinical And Vaccine Immunology**, [S.l.], p.01-43, Feb. 2017. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/content/early/2017/02/03/00539-16.long>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

OGISE, Josiah et al. Adjuvants in malaria vaccine development strategies: a review. **Pathogen And Infectious Disease**, [S.I.], v. 2, n. 1259, p.1-8, 22, Apr. 2016. Disponível em: <<http://www.smartscitech.com/index.php/pid/article/view/1259/pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

OLIVEIRA-FERREIRA, Joseli et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, [S.I.], v. 9, n. 115, p. 1-15, Apr. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2891813/>>. Acesso em: 25 jul. 2016.

ORD, Rosalynn L.; RODRIGUEZ, Marilis; LOBO, Cheryl A. Malaria invasion ligand RH5 and its prime candidacy in blood-stage malaria vaccine design. **Human vaccines & Immunotherapeutics**, [S.I.], v.11, n.6, p.1465-1473, Feb. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4514319/>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

PINA-COSTA, Anielle de et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 5, p.618-633, Aug. 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762014000500618&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762014000500618&lang=pt)>. Acesso em: 15 jun. 2016.

RANG, H. P., et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 829 p.

REY, Luis. **Bases da parasitologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 391 p.

REY, Luis. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 883 p.

REYES-SANDOVAL, Arturo; BACHMANN, Martin F. *Plasmodium vivax* malaria vaccines: Why are we where we are?. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, [S.I.], v. 9, n. 12, p.2558-2565, Dec. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4162059/>>. Acesso em: 03 fev. 2017.

RICHARDS, Jack S; MACDONALD, Nicholas J; EISEN, Damon P. Limited polymorphism in *Plasmodium falciparum* ookinete surface antigen, von Willebrand factor A domain-related protein from clinical isolates. **Malaria Journal**, [S.I.], v. 5, n. 1, p.55-60, Jul. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1526741/>>. Acesso em: 08 jan. 2017.

RICHIE, Thomas L. et al. Clinical trial in healthy malaria-naïve adults to evaluate the safety, tolerability, immunogenicity and efficacy of MuStDO5, a five-gene, sporozoite/hepatic stage *Plasmodium falciparum* DNA vaccine combined with

escalating dose human GM-CSF DNA. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, [S.I.], v. 8, n. 11, p.1564-1584, Nov. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3601132/>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

RODRÍGUEZ, María del Carmen et al. The surface protein Pvs25 of *Plasmodium vivax* ookinetes interacts with calreticulin on the midgut apical surface of the malaria vector *Anopheles albimanus*. **Molecular And Biochemical Parasitology**, [S.I.], v. 153, n. 2, p.167-177, Jun. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685107000722>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

SADAVA, David et al. **Vida: A Ciência da Biologia: Célula e Hereditariedade**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 461 p. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536320502/cfi/491>>. Acesso em: 15 out. 2016.

SALAVATIFAR, Maryam et al. High-Level Expression, Purification and Characterization of A Recombinant *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1: Implication for vivax Malaria Vaccine Development. **Cell Journal (yakhteh)**, [S.I.], v. 3, n. 17, p.520-531, Oct. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4601873/>>. Acesso em: 15 out. 2016.

SHEIKH, Inayat Hussain et al. Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine encoding 42kDa fragment of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1. **Acta Tropica**, [S.I.], v. 162, n. 1, p.66-74, Oct. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X16303801>>. Acesso em: 04 abr. 2017.

SOERENSEN, Bruno; MARULLI, Kathia B. B. **Manual de saúde pública**. São Paulo: Arte & Ciência, 1999. 494 p. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=obi2G2kaqhYC&pg=PA381&dq=MANUAL+D+E+SAUDE+PUBLICA+199&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwjjaqKi4ldTSAhXJf5AKHSxIDY0Q6AEIGjAA#v=onepage&q=adjuvante&f=false>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

SOUSA, Taís N. de et al. The Duffy binding protein as a key target for a *Plasmodium vivax* vaccine: lessons from the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 5, p.608-617, Aug. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4156454/>>. Acesso em: 07 out. 2016.

TUTEJA, Renu. DNA Vaccine Against Malaria: A Long Way To Go. **Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology**, [S.I.], v. 37, n. 1, p.29-54, Jan. 2002. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10409230290771447>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

VALENCIA, Sócrates H. et al. Platform for *Plasmodium vivax* vaccine discovery and development. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 106, p.179-192, Aug. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4832982/>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

VANBUSKIRK, K. M.; SEVOVA, E.; ADAMS, J. H.. Conserved residues in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.l.], v. 101, n. 44, p.15754-15759, Oct. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC524844/>>. Acesso em: 15 abr. 2017.

WATSON, James D. **Biologia Molecular do gene**, 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. 878 p.

WEBSTER, Daniel; HILL, Adrian V.S. Progress with new malaria vaccines. **Bull World Health Organ**, Genebra , v. 81, n. 12, p. 902-909, Dec. 2003 . Disponível em: <[http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0042-96862003001200009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0042-96862003001200009&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 22 mar. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **DNA Vaccines**. 2016a. Disponível em: <<http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/dna/en/>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Questions and answers on malaria vaccines**. 2016b. Disponível em: <[http://www.who.int/immunization/research/development/malaria\\_vaccine\\_qa/en/](http://www.who.int/immunization/research/development/malaria_vaccine_qa/en/)>. Acesso em: 20 jun. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report**. 2016c. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>>. Acesso em: 04 jan. 2017.

ZEYREK, Fadile Yildiz et al. Analysis of Naturally Acquired Antibody Responses to the 19-kd C-Terminal Region of Merozoite Surface Protein-1 of *Plasmodium vivax* from Individuals in Sanliurfa, Turkey. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.l.], v. 78, n. 5, p. 729-732, May 2008. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/78/5/729.short?related-urls=yes&legid=tropmed;78/5/729>>. Acesso em: 04 set. 2016.