



JULIANA ALMEIDA LEITE

**“DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA
PLASMODIUM SPP. BASEADAS EM ANTÍGENOS DE
FASE SANGUÍNEA”.**

***“DEVELOPMENT OF VACCINES BASED ON
PLASMODIUM SPP. BLOOD STAGE ANTIGENS.”***

CAMPINAS, 2013.



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIANA ALMEIDA LEITE

**"DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA *PLASMODIUM SPP.*
BASEADAS EM ANTÍGENOS DE FASE SANGUÍNEA".**

Orientador/Supervisor: Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

Co-orientador/Co-Supervisor: Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

**"DEVELOPMENT OF VACCINES BASED ON *PLASMODIUM SPP.* BLOOD
STAGE ANTIGENS."**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular na área de Imunologia.

Doctorate thesis presented to the Genetics and Molecular Biology Postgraduation Programme of the Biology Institute of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Genetics and Molecular Biology in the Immunology area.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA JULIANA ALMEIDA LEITE E ORIENTADA PELO PROF.DR.FABIO TRINDADE MARANHÃO COSTA.

Assinatura do Orientador:

CAMPINAS
2013.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

L536d Leite, Juliana Almeida, 1984-
Desenvolvimento de vacinas contra *plasmodium* spp. baseadas em antígenos de fase sanguínea / Juliana Almeida Leite. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Fabio Trindade Maranhão Costa.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Vacinas antimaláricas. 2. Malária. 3. Antígeno MAEBL. 4. *Plasmodium yoelii*.
I. Costa, Fabio Trindade Maranhão, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of vaccines based on *plasmodium* spp. blood stage antigens

Palavras-chave em inglês:

Malaria vaccines

Malaria

MAEBL antigen

Plasmodium yoelii

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Fabio Trindade Maranhão Costa [Orientador]

Oscar Bruna Romero

Gerhard Wunderlick

Alessandro dos Santos Farias

Marcelo Brocchi

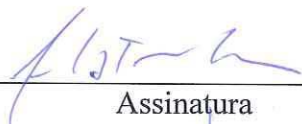
Data de defesa: 12-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

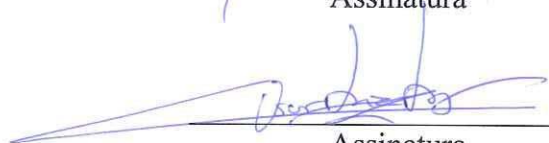
Campinas, 12 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa (orientador)


Assinatura

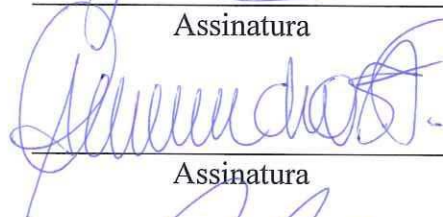
Prof. Dr. Oscar Bruna-Romero


Assinatura

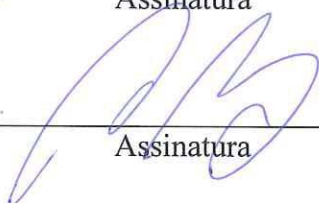
Prof. Dr. Gerhard Wunderlick


Assinatura

Dr. Alessandro Dos Santos Farias


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi


Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Dr. Ronei Mamoni

Assinatura

Dr. José Ronnie Carvelho De Vasconcelos

Assinatura

DEDICO ESTA TESE À MEMÓRIA DE MINHA QUERIDA AVÓ ROMILDE, A MULHER MAIS FORTE QUE CONHECI E TIVE O PRAZER DE TER COMO SEGUNDA MÃE. COM QUEM PUDE APRENDER O QUE NENHUMA ESCOLA OU LIVRO PODEM ENSINAR: A VERDADEIRA SABEDORIA DA VIDA!

AOS MEUS PAIS E MINHA IRMÃ POR SEREM ESTA FAMÍLIA TÃO MARAVILHOSA, POR ME FAZEREM SENTIR AMADA E QUERIDA E POR ESTAREM PRESENTES ME INCENTIVANDO E APOIANDO EM TODOS OS MOMENTOS QUE PRECISEI.

“ E mesmo que tudo não ande da forma que eu gostaria, saber que já não sou o mesmo de ontem me faz perceber que valeu a pena.”

M. Nigro

“Tudo aquilo que o Homem ignora, não existe para ele. Por isso, o Universo de cada um, se resume ao tamanho de seu saber.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa, pela oportunidade oferecida, pela confiança em mim depositada e pela orientação prestada.

À Dra. Silvia Boscardin pela participação na pré-banca e pelas sugestões dadas.

Aos professores Dr. Oscar Bruña-Romero, Dr. Gerhard Wunderlich e Dr. Marcelo Brocchi pela participação na banca examinadora.

Ao Dr. Alessandro Farias pela participação na pré-banca e na banca examinadora e por todas as valiosas discussões e sugestões dadas a este projeto.

Aos Professores Dr. Mauricio Rodrigues, Dr. Laurent Renia e Dr. Bruce Russell pelo apoio, colaboração e auxílio no desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. Daniel Bargieri e à Dra. Catarina Castiñeiras pelas sugestões e pela ajuda na expressão do recombinante.

À Lourdes, Secretária da Pós Graduação da Genética, por auxiliar no que foi preciso.

A todos os integrantes do Laboratório de Imuno-parasitologia Experimental. A minhas mais do que companheiras de laboratório, verdadeiras amigas: Bruna, por me iniciar na pesquisa e pacientemente me treinar; Carol, Marcele, Yara, Stef e Letusa pelo apoio e colaboração neste projeto e durante o desenvolvimento dessa Tese. Além disso quero agradecer a todas vocês e também à Isabelita, mais nova na equipe, mas não menos importante; pela convivência diária, por todos os momentos bons, pelas conversas, risadas e também pela força e compreensão nos momentos difíceis.

A todos os integrantes do Laboratory of Malaria Immunobiology do SigN (Singapore Immunology Network), meu sincero agradecimento por terem me recebido muito bem e por todo conhecimento que compartilharam.

À Dra. Rossarin (Noi) pelos ensinamentos únicos em *P. vivax*.

Ao Benoit pelas lições de citometria, pela viagem de campo a Mae Sot, e por me apresentar a Tailândia. Pela amizade, pelas festas e diversão.

À Marjorie, pela companhia, pelas conversas, por todos os programas que fizemos juntas e por ser tão querida comigo sempre!

À Carla, por tantas idas ao *Animal Facility* e ajuda em tudo que precisei. Mas principalmente pela amizade maravilhosa, pelas longas conversas, pelas viagens incríveis que fizemos juntas. Carlita, você foi minha família durante esse tempo e também um pouquinho de Brasil nesta terra tão tão distante. Você me faz falta todos os dias!!

A todas as pessoas que conheci em Singapura que de alguma forma tornaram este período tão especial e prazeroso. À Dana, por ser a melhor companheira de apartamento que eu poderia esperar. À Cátia pelo réveillon em Bali, à Teja pelas viagens, e ainda Leigh, Francisca, Alberto, Fabien e tantas outras pessoas que passaram pelo meu caminho durante estes seis agradáveis meses.

Aos meus amigos do Colégio Renovatus, amigos de uma vida inteira, obrigada por acompanharem todas as etapas e torcerem por mim! Em especial, para as primeiras amigas que fiz nessa vida: Cris, Mari Pucca e Mari Zaneti; e as queridas Má Basso, Marcela, Jú Barros e Jú Garcia! Amigas desde sempre e para sempre!!!

À Júlia, Ary e Dani, pela amizade sincera e verdadeira que perlonga desde os tempos de faculdade. Por todos os momentos que compartilhamos, provas, trabalhos e também pela convivência, pelas risadas, festas...são muitas histórias pra contar! Essa fase só foi tão divertida porque vocês fizeram parte dela!

Ao Márcio, pelo incentivo e ajuda sempre que precisei; por me escutar e pacientemente me encorajar. Mas principalmente pelo carinho, amizade e companheirismo. Tenho muita sorte de estar apaixonada pelo meu melhor amigo!

Aos meu parentes, pelo apoio, carinho e paciência em todos os momentos e pela confiança no meu potencial.

Aos meus pais, por serem meu porto seguro, pelo amor, pela compreensão, pelo apoio nas minhas decisões e pela confiança em mim depositada. Por me ensinarem tudo que há de importante, por serem tão essenciais na minha vida; gostaria de agradecer a vocês tudo o que sou hoje.

À Gabi, minha irmãzinha, nem mais tão pequenina assim, pelo apoio e incentivo.

À memória de minha adorada avó Romilde, sempre presente no meu coração e em meus pensamentos.

Ao CNPq e à FAPESP pela bolsa fornecida nesses anos de trabalho.

À Unicamp por possibilitar o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

A Deus por permitir que tudo isso fosse possível.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF	Adjuvante completo de Freund
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AIF	Adjuvante incompleto de Freund
AMA1	Antígeno apical de membrana 1
APCs	Células apresentadoras de antígeno
BSA	Albumina bovina
CEEA	Comitê de Ética na Experimental Animal
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CMV	Citomegalovírus
CS	Proteína circunsporozoíta
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
DARC	Antígeno/receptor <i>Duffy</i> para quimiocinas
DBL	<i>Duffy Binding Like</i>
D.O.	Densidade óptica
DVP	Desvio padrão
EBP	Proteína de ligação do parasita
EI	Eritrócito infectado
ELISA	Ensaio Imuno-enzimático
G6PD	glicose-6-fostato-desidrogenase
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal

IFA	Imunofluorescência
IPTG	Isopropylthio β -galactoside
LSA-3	Antígeno do estagio hepático 3
MC	Malária cerebral
MG	Malária gestacional
MS	Ministério da Saúde
MSP	Proteína da superfície do merozoita
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação da cadeia da polimerase
<i>P. berghei</i>	<i>Plasmodium berghei</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. malarie</i>	<i>Plasmodium malarie</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P. yoelii</i>	<i>Plasmodium yoelii</i>
rPyM2-MAEBL	Proteína recombinante baseada no domínio M2 do antígeno MAEBL de <i>Plasmodium yoelii</i>
s.c	Subcutâneo
SFB	Soro fetal bovino
SIgN	<i>Singapore Immunology Network</i>
Sivep	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde

T.A.	Temperatura ambiente
TRAP	Proteína adesiva relacionada a trombospondina
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
X-Gal	5 bromo-4-cloro-3indolyl β -galactopyranoside

RESUMO

A malária é ainda um grande problema de saúde em muitas partes do mundo, causando 219 milhões de novas infecções e 660 mil mortes por ano, devido à presença difundida de parasitas resistentes às drogas e à falta de uma vacina de longa duração e completamente eficaz. MAEBL é uma molécula com estrutura quimérica expressa em eritrócitos infectados (EIs) e possui uma porção amino terminal rica em cisteína, domínios transmembrana, citoplasmático e outros dois domínios (M1 e M2). Embora ambos os domínios estejam envolvidos na ligação do parasita aos eritrócitos, o domínio M2 é essencial para a invasão do merozoíta e exibe maior capacidade adesiva. Recentemente, foi mostrado que MAEBL também é expresso em esporozoítas das glândulas salivares e em hepatócitos infectados. Estas características de MAEBL abrem perspectivas para o desenvolvimento de uma vacina experimental visando estágios eritrocíticos e pré-eritrocíticos do parasita. Neste projeto o domínio M2 do antígeno MAEBL de *Plasmodium yoelii* foi amplificado, clonado e expresso em vetores eucariótico (pIgSP) e procariótico (pET28a), para ser usado em imunização com a proteína recombinante ou em regime *prime(DNA)-boost(proteína)*. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com quatro doses da proteína recombinante (PyM2-MAEBL) em adjuvante completo/incompleto de Freund. Alternativamente, os animais foram injetados na primeira dose com DNA plasmidial pIgSP/M2-MAEBL seguido de três doses com a proteína rPyM2-MAEBL. Ambos os grupos geraram elevados níveis de anticorpos de longa duração em ELISA, os anti-soros reconheceram a proteína recombinante em análises de *western blot* e o antígeno nativo em ensaios de imunofluorescência (IFA). Finalmente, depois da última dose os animais foram desafiados com 10^6 eritrócitos infectados de *P. yoelii* YM (cepa letal). Foi observada redução da parasitemia em ambos os grupos de animais. Além

disso, 90% dos animais injetados com rPyM2-MAEBL sobreviveram e o regime *prime-boost* de imunização conferiu total proteção ao desafio. Os soros de camundongos imunizados apenas com rPyM2-MAEBL ou com o sistema *prime-boost* foram capazes de inibir a invasão dos eritrócitos por *P. yoelii*. Além disso, os anti-soros PyM2-MAEBL foram capazes de reconhecer *P. vivax* e *P. falciparum* em IFA e também inibiram a invasão dos eritrócitos em isolados de campo de ambas as espécies. Coletivamente, esses resultados destacam o potencial do antígeno M2-MAEBL como um promissor candidato vacinal e abrem perspectivas para se continuar a avaliar os níveis de imunidade de vacina experimental M2-MAEBL explorando diferentes adjuvantes e também novas estratégias de imunização como outros protocolos *prime-boost*.

Palavras chave: malária, *Plasmodium*, *Plasmodium yoelii*, MAEBL, vacinas antimaláricas.

ABSTRACT

Malaria is still a major health problem in many parts of the world, causing 219 million new infections and 660 thousand deaths each year due to the widespread presence of drug-resistant strains of the parasite and the lack of a long lasting and full effective vaccine. MAEBL is a structural chimeric molecule expressed in infected erythrocytes (IEs) and has an amino terminal cysteine-rich, a transmembrane and a cytoplasmatic domain and two other domains (M1 and M2). Although both domains are involved in parasite attachment to erythrocytes, M2 domain is essential for merozoite invasion and displays the highest adhesive capacity. Recently, it was shown that MAEBL is also expressed in salivary glands sporozoites and in infected hepatocytes. Thus, MAEBL unique features open perspectives for the development of an experimental vaccine targeting erythrocytic and pre-erythrocytic stages of the parasite. Here we amplified, cloned and expressed MAEBL M2 domain of *Plasmodium yoelii*, in eukaryotic (pIgSP) and prokaryotic (pet28a) vectors, to be used for immunization with the recombinant protein and as a *prime* (DNA)–*boost* (Protein) immunization regimen. Herein, after cloning, expression and purification, we immunized C57BL/6 mice with four doses of *P. yoelii* recombinant protein (PyM2-MAEBL) in complete/incomplete Freund adjuvant. Alternatively, animals were primed with the pIgSP/M2-MAEBL DNA plasmid and boosted with three doses of rPyM2-MAEBL. Both groups of mice displayed high levels of long lasting antibodies in ELISA and antisera recognized the recombinant protein in western blotting analysis and the native antigen in immunofluorescence assays (IFA). Finally, after the last dose mice were challenged with 10^6 infected erythrocytes of *P. yoelii* YM (lethal strain) and a reduction on parasitemia levels was observed in both groups of animals. Moreover, 90% of animals injected with rPyM2-MAEBL survived and the *prime-boost*

regimen of immunization completely prevented mortality. Sera from mice immunized solely with rPyM2-MAEBL or *prime* (DNA)–*boost* (Protein) were able to inhibit *P. yoelii* erythrocyte invasion. Further, the anti-sera PyM2-MAEBL were able to recognize *P. vivax* and *P. falciparum* on IFA and also inhibited erythrocyte invasion of field isolates from both species. Collectively these findings highlight the potential of antigen M2-MAEBL as a promising vaccine candidate and open perspectives to continue to evaluate levels of immunity of M2-MAEBL experimental vaccine exploring different adjuvants and also immunization strategies as other *prime-boost* protocols.

Key words: malaria, *Plasmodium*, *Plasmodium yoelii*, MAEBL, malaria vaccines.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	37
MATERIAIS E MÉTODOS	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
CONCLUSÕES	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
ANEXOS	139
ARTIGOS PUBLICADOS	143

INTRODUÇÃO

Malária - aspectos gerais

A malária resulta em elevadas taxas de mortalidade e morbidade, sendo considerada a infecção parasitária mais importante do mundo. A malária é causada pelo protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, ordem Coccidia, subordem Haemosporidiidea, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. São conhecidas aproximadamente 150 espécies de *Plasmodium* causadoras de malária. Dentre estas espécies, apenas as seguintes são capazes de infectar o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae*. Recentemente, vários estudos têm relatado centenas de casos de malária humana na Malásia e outros países do Sudeste Asiático causados por uma quinta espécie, *Plasmodium knowlesi*, que normalmente infecta macacos (Kantele&Jokiranta, 2011). Estas espécies diferem morfológicamente, imunologicamente, na sua distribuição geográfica, em seus padrões de recaída e nas suas respostas às drogas.

Os agentes transmissores da malária são mosquitos da ordem Díptera, da família Culicidae e do gênero *Anopheles*. Cerca de 60 espécies de anofelinos podem ser vetores da doença (Tuteja, 2007). No Brasil o principal vetor é o *A. darlingii* (de Arruda et al., 1986); e na África o vetor de maior importância é o *A. gambiae* (Coetzee et al., 2000)..

Os sintomas clínicos da doença frequentemente consistem em episódios cíclicos de febre, calafrios, mal-estar, cefaleia, dores musculares, náuseas, sudorese, vômitos, vertigem e anemia. Dentre as espécies, o *P. falciparum* é o mais virulento e responsável pela maioria das mortes e casos graves da doença como: malária cerebral (MC) e malária gestacional (MG), insuficiência renal aguda, edema pulmonar (WHO, 2000). Estas complicações estão associadas à capacidade deste parasita em se ligar ao endotélio vascular e sequestrar em órgãos durante a fase sanguínea da infecção (Greenwood et al., 2008). A malária grave é responsável pela grande maioria dos óbitos e internações,

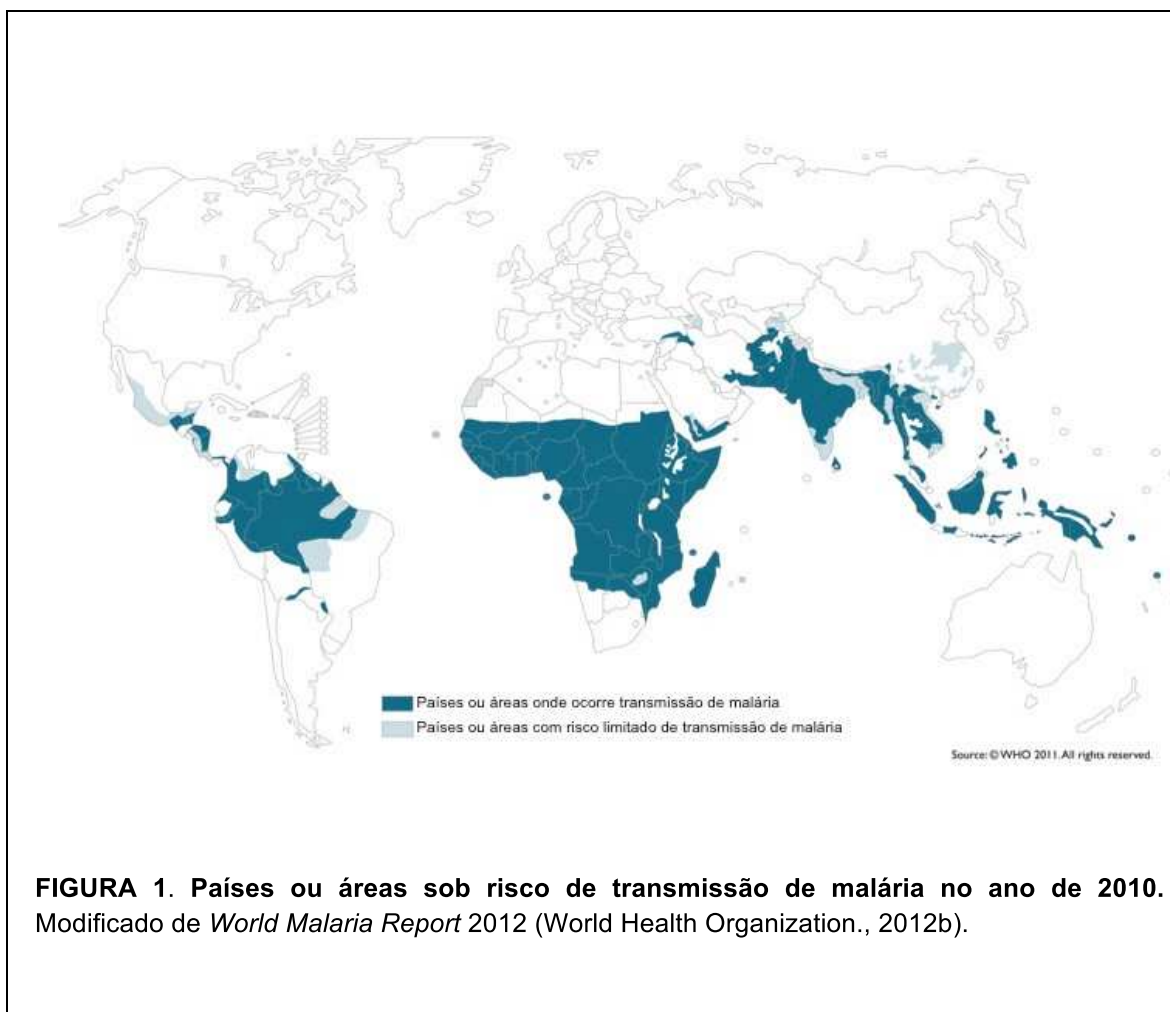
apresentando maior risco em crianças, mulheres grávidas, pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e visitantes provenientes de áreas não-endêmicas (World Health Organization., 2012a).

Apesar de descrito como malária "benigna", muitos trabalhos têm mostrado que *P. vivax* apresenta uma capacidade de citoaderência ao endotélio e as infecções por esta espécie também podem evoluir para complicações clínicas (Carvalho et al., 2010; Guerra et al., 2010). Ainda, a capacidade de *P. vivax* e *P. ovale* permanecerem dormentes por meses como hipnozoítas no fígado faz a infecção por estes parasitas difícil de ser erradicada (Greenwood et al., 2008).

A situação da malária no Brasil e no mundo

A distribuição geográfica das espécies de parasitas da malária é influenciada em parte por competição interespecífica, além de fatores genéticos humanos. Os fatores principais para esta distribuição são as taxas de sobrevivência dos mosquitos vetores e do parasita no vetor, ambos sob a influência de condições ambientais; como a humidade, temperatura e resistência às drogas.

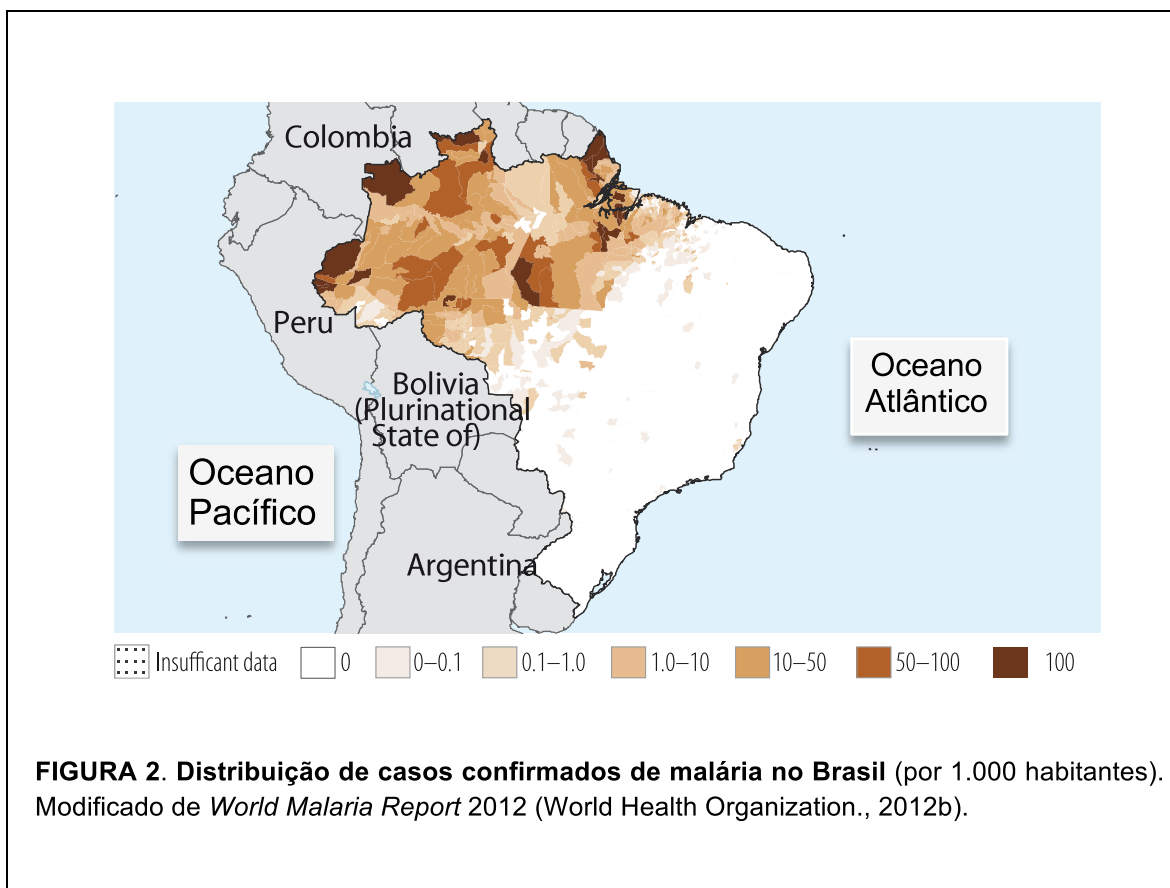
Das quatro espécies mais comuns que infectam seres humanos, *P. vivax* e *P. falciparum* causam a grande maioria das infecções. *P. vivax* apresenta a mais ampla distribuição nos trópicos, subtropicais e zonas temperadas. Devido a limitações de temperatura na sua transmissão pelos mosquitos vetores, *P. falciparum* é geralmente confinado aos trópicos, *P. malariae* é distribuído de forma esporádica. *P. ovale* limita-se principalmente à região Centro-oeste da África e algumas ilhas do Pacífico Sul (Carter&Mendis, 2002; Lysenko&Beljaev, 1969).



Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a malária está presente em 99 países. Atualmente estima-se que metade da população mundial, correspondendo a cerca de 3,3 bilhões de pessoas correm risco de contrair a doença (figura 1) (<http://www.rbm.who.int/keyfacts.html/>). Em 2010 154-289 milhões de casos de malária foram diagnosticados e aproximadamente 660 mil mortes foram registradas (World Health Organization., 2012b). As pessoas que vivem nos países mais pobres são mais vulneráveis à malária. Em 2010, 90% de todas as mortes por malária ocorreram na região da África sub-Saariana, principalmente entre crianças menores de cinco anos de idade. Calcula-se que uma criança morra de malária a cada minuto

(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>). Estes elevados índices de mortalidade e morbidade interferem de maneira significativa no desenvolvimento sócio–econômico e perpetuam um ciclo de pobreza e subdesenvolvimento nos países atingidos.

Brasil e Colômbia representam mais da metade (68%) do número de casos de malária das Américas (World Health Organization., 2012b). No Brasil, no ano de 2011 foram relatados 266.348 casos de malária (Sivep-Malária/SVS/MS). 99,7% dos casos de malária foram notificados na Região Amazônica, considerada área endêmica no país (figura 2), composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, compreendendo 807 municípios (Boletim Epidemiológico da malária 2013: SVS/MS). Cerca de 87% das infecções são causadas pelo *Plasmodium vivax* e aproximadamente 13% por *Plasmodium falciparum* (World Health Organization., 2010b).



Durante décadas a malária vem sendo alvo de intensas campanhas com o objetivo de erradicar a transmissão do parasita por meio de inseticidas e quimioterapia. Entretanto, devido à falta de uma vacina eficiente e ao aumento da resistência de parasitas às drogas convencionalmente utilizadas (Le Bras&Durand, 2003; Wernsdorfer&Payne, 1991) e dos mosquitos vetores aos inseticidas (Dabire et al., 2008; Gnankine et al., 2013); a malária tem reaparecido em diversas regiões do mundo. O problema está se agravando devido à deterioração das condições sócio-econômicas das regiões rurais de países afetados; contribuindo para o reaparecimento de epidemias em áreas onde a malária já havia sido erradicada (Greenwood et al., 2008).

A política de tratamento antimalárico recomendado pela OMS consiste em terapias combinadas utilizando duas ou mais drogas que atuem na fase sanguínea com modelos

de ação independentes, sendo uma delas necessariamente um derivado de artemisinina (artesanato, artemeter, di-hidroartemisinina) (World Health Organization., 2010a).

O desenvolvimento de resistência parasitária representa o maior obstáculo para o alcance do controle da malária e foi observado em todas as classes de antimaláricos convencionalmente utilizados: amodiaquina, cloroquina, mefloquina, quinino, sulfadoxina-pirimetamina, e recentemente em derivados de artemisinina (Kokwaro, 2009; World Health Organization., 2010a).

Portanto, o controle efetivo e o tratamento da malária apresentam enormes desafios. Sendo assim, a busca de uma abordagem integrada que combine medidas preventivas, como a longa duração de mosquiteiros tratados com inseticida e pulverização residual de interiores e o desenvolvimento de novas drogas e vacinas eficientes se faz de extrema importância.

O ciclo de vida dos plasmódios

O ciclo de vida do plasmódio (figura 3) é semelhante entre as espécies, sendo extremamente complexo e envolvendo diversos estágios com expressão de antígenos específicos para sua sobrevivência no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Estas proteínas são essenciais na invasão de uma variedade de tipos de células e para evasão do sistema imune. A infecção do hospedeiro vertebrado inicia-se quando a fêmea infectada do mosquito *Anopheles* injeta 5-20 esporozoítas infectantes no hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo (Rosenberg et al., 1990). Uma vez na corrente sanguínea, os esporozoítas migram através de vários hepatócitos antes de entrar em um (Mota et al., 2001), isto é o início do estágio hepático ou pré-eritrocítico. Os receptores responsáveis pela invasão dos hepatócitos são principalmente os domínios de

trombospondina da proteína circusporozoíta (CS) e proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP). Estes, basicamente se ligam aos proteoglicanos heparan sulfato presentes nos hepatócitos (Miller et al., 2002). Nos hepatócitos os parasitas se desenvolvem e passam por replicação assexuada conhecida como esquizogonia exo-eritrocítica. Ocorre a ruptura dos hepatócitos, onde cada esporozoíta gera 20-30 mil merozoítas que são liberados na circulação (Moorthy et al., 2004). Esta fase pré-eritrocítica tem duração em média de 9 a 16 dias, variando de acordo com a espécie e não apresenta sintomas. Em *P. vivax*, algumas das formas hepáticas permanecem latentes (hipnozoítas) e podem retardar sua esquizogonia por meses ou anos, sendo a causa de recrudescência (Greenwood et al., 2008).

Os merozoítas imediatamente entram nos eritrócitos através de um processo complexo de invasão e iniciam divisão assexuada. Nesta fase, o parasita passa por diferentes estágios de desenvolvimento acompanhado de um metabolismo altamente ativo, incluindo glicólise de grandes quantidades de glicose importada, ingestão do citoplasma do hospedeiro e proteólise da hemoglobina em aminoácidos. O parasita não consegue degradar o heme e este produto se torna tóxico. Sendo assim, a maioria do heme liberado é polimerizado em hemozoína (pigmento malárico) que fica estocada em vacúolos (Tuteja, 2007). O estágio final da fase eritrocítica é denominado esquizonte e caracterizado por múltiplos núcleos. Cada esquizonte maduro contém cerca de 20 merozoítas que são liberados após lise do eritrócito para infectar eritrócitos saudáveis. Este repetitivo ciclo intra-eritrocítico de invasão-multiplicação-liberação-invasão continua em intervalos regulares, levando cerca de 48h em *P. falciparum*, *P. ovale* e *P. vivax* e 72h em *P. malariae* (Greenwood et al., 2008). A liberação dos merozoítas ocorre de forma sincrônica, aproximadamente no mesmo período do dia. Esta lise dos eritrócitos infectados coincide com o aumento da temperatura corporal e libera produtos que

estimulam a produção de citocinas responsáveis pelas demais manifestações clínicas da doença observadas nesta fase (Tuteja, 2007). Eventualmente, uma pequena porção de merozoítas se diferencia dando origem a micro e macrogametas (masculino e feminino, respectivamente) que podem ser ingeridos pelo mosquito anofelino. Desta forma, a fertilização ocorre no intestino médio do mosquito, completando o ciclo de vida com a migração dos esporozoítas para as glândulas salivares (Moorthy et al., 2004).

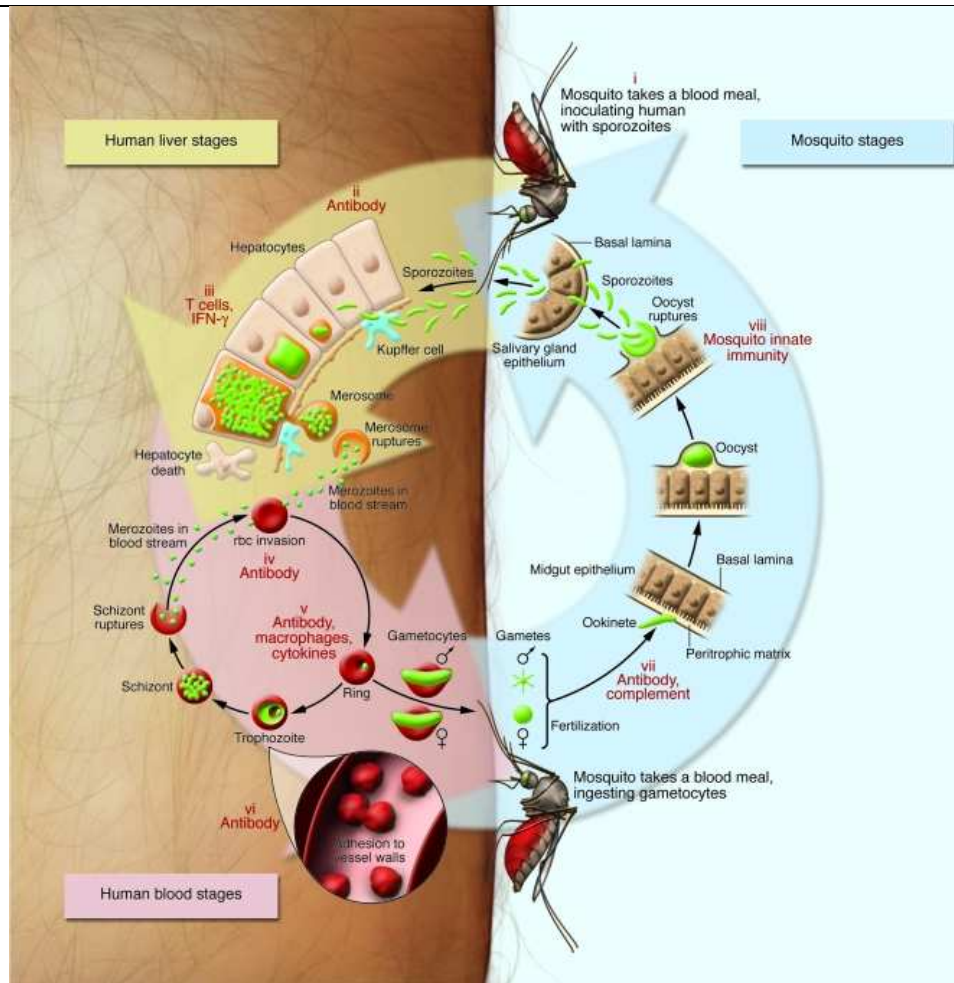


FIGURA 3. Ciclo de vida do *Plasmodium*: inclui numerosas transições e estágios, e qualquer um pode ser alvo da resposta imune do hospedeiro. No momento da inoculação através da picada do mosquito *Anopheles*, esporozoítas devem fugir de anticorpos para (i) acessar vasos sanguíneos e transitar (ii) por meio de macrófagos no fígado e hepatócitos para iniciar a fase hepática da infecção. Parasitas intra-hepatocíticos (iii) são suscetíveis a linfócitos T citotóxicos (CTLs). Aproximadamente após uma semana ocorre a ruptura dos hepatócitos infectados e libertação dos merozoítas como agregados chamados merozomas que permitem fuga dos anticorpos (iv) e invasão dos eritrócitos. Parasitas intraeritrocíticos (v) são suscetíveis a anticorpos opsonizantes e macrófagos, e a respostas de citocinas. Anticorpos que bloqueiam a ligação (vi) de eritrócitos infectados ao endotélio podem prevenir a doença e controlar a parasitemia. Os anticorpos humanos específicos para o (vii) estágio sexual do parasita são ingeridos pelos mosquitos durante a refeição de sangue e podem bloquear a transmissão para mosquitos, embora possam precisar de complemento para matar o parasita. Resposta imune inata do mosquito pode matar o parasita durante a fase de esporogonia (vii, viii) (Greenwood et al., 2008).

O Processo de Invasão dos eritrócitos pelos merozoítas

A sobrevivência e transmissão do parasita depende da habilidade das formas infectantes em reconhecer e invadir as células apropriadas do hospedeiro. A invasão é mediada por interações específicas entre ligantes do parasita e receptores da célula do hospedeiro. Três organelas presentes no complexo apical apresentam papel crucial no processo de invasão: micronemas, roptrias e grânulos densos (Preiser et al., 2000).

A sequência de eventos proposta para invasão do eritrócito pelo parasita tem início quando merozoítos maduros são liberados na corrente sanguínea a partir da ruptura de eritrócitos infectados. Estes merozoítas apresentam uma superfície densa revestida por proteínas, como a proteína de superfície do merozoíta (MSP1-19), que são responsáveis por realizar o primeiro contato com o eritrócito (Preiser et al., 2000). A invasão procede com a reorientação do merozoíta de forma a permitir a interação de seu aparelho apical com a membrana do eritrócito. Em seguida, ocorre a formação de uma junção, entre a membrana do parasita e a hemácia (Miller et al., 1979). Esta etapa é crítica e irreversível. O merozoíta secreta material do micronema e das roptrias, que resultam na invaginação da membrana do eritrócito (Mitchell&Bannister, 1988). Após a formação da junção, fatores desconhecidos estimulam o motor de actina-miosina possibilitando a junção de se mover a partir da extremidade anterior à posterior do merozoíta, movendo o merozoíta para dentro do eritrócito (Miller et al., 2002). Como consequência, o parasita é incluso no vacúolo parasitóforo. A etapa final da invasão consiste na selagem do vacúolo e da membrana do eritrócito (Miller et al., 2002).

É importante ressaltar que o merozoíta é a única forma da fase eritrocítica diretamente exposta ao sistema imunológico do hospedeiro, sendo a invasão do eritrócito um passo essencial para o desenvolvimento do *Plasmodium* e manutenção da infecção.

Invasão de eritrócitos, portanto, é um momento razoável para avaliar diferentes estratégias capazes de bloquear merozoítas.

Nas espécies de *Plasmodium* que acometem o homem, vários receptores de eritrócitos já foram identificados (Culleton&Kaneko, 2010). *P. falciparum* utiliza ácido siálico e glicoforina-A e também percursos alternativos para invadir os eritrócitos, enquanto que *P. vivax* e *P. knowlesi* usam o antígeno/receptor *Duffy* para quimiocinas (DARC) como um receptor para a invasão (Barnwell et al., 1989; Camus&Hadley, 1985; Chitnis&Miller, 1994; Haynes et al., 1988; Miller et al., 1976; Miller et al., 1975; Sim et al., 1994; Wertheimer&Barnwell, 1989).

No entanto, demonstrou-se que *P. knowlesi* exibe vias alternativas para invadir os eritrócitos que um receptor desconhecido diferente de DARC (Chitnis&Miller, 1994; Haynes et al., 1988; Miller et al., 1975). *P. vivax* pode eventualmente infectar pessoas DARC negativas (Cavasini et al., 2007a; Cavasini et al., 2007b; Menard et al., 2010; Mendes et al., 2011; Ryan et al., 2006). Estes resultados desafiam a crença anterior de que a invasão dos eritrócitos por *P. vivax* está restrita ao receptor DARC, embora o ligante e receptor envolvidos na invasão dos eritrócitos DARC-negativos por *P. vivax* ainda sejam desconhecidos.

Pouco se sabe sobre os caminhos de invasão no modelo de malária murino *P. yoelii*, devido, em parte, à falta de um ensaio de invasão *ex-vivo* confiável. Até agora, a elucidação do processo de invasão de *P. yoelii* foi limitado a caros e demorados ensaios *in vivo* (Swardson-Oliver et al., 2002).

Acredita-se que as formas não-virulentas de *P. yoelii* apresentam uma predileção por reticulócitos, ao passo que as formas virulentas predominantemente invadem os eritrócitos maduros (Bungener, 1979; Fahey&Spitalny, 1984). No entanto, este fato foi

questionado e foi demonstrado por (Fahey&Spitalny, 1984) que tanto as cepas virulentas de *P. yoelii* como as não-virulentas possuem uma predileção inicial para reticulócitos. Contudo, devido ao seu crescimento rápido e a um número limitado de reticulócitos para invadir, ambas as cepas do parasita precisam parasitar eritrócitos maduros para proliferar.

Além disso, no início dos anos 2000, Swardson-Olver e colaboradores constataram que DARC é um importante receptor de eritrócitos para a invasão de *P. yoelii* durante ensaios de invasão *in vivo* utilizando camundongos DARC-*Knockout*. Além disso, eles também demonstraram que a entrada de *P. yoelii* nos reticulócitos pode também ser mediada por um receptor diferente de DARC (Swardson-Olver et al., 2002). Além disso, enquanto que o tratamento de normócitos com quimotripsina, mas não com tripsina, praticamente aboliu a invasão de *P. yoelii*, o tratamento de reticulócitos com ambas as enzimas inibiu completamente a invasão do parasita. (Swardson-Olver et al., 2002).

Como *P. yoelii* utiliza DARC para entrar nos eritrócitos, o desenvolvimento de um ensaio *ex-vivo* para estudar o processo de invasão em *P. yoelii* pode ser uma excelente ferramenta para avaliar os passos envolvidos na ligação e entrada de parasitas através de receptores *Duffy*. Além disso, *P. yoelii* tem um caminho alternativo, presumivelmente DARC independente, para invadir reticulócitos, o qual também acontece para *P. vivax*. Sendo assim, seria plausível acreditar que as rotas alternativas de invasão podem ser compartilhadas por estes dois parasitas.

Imunidade natural e induzida contra malária

A resposta clínica contra malária pode variar entre uma infecção assintomática, moderada ou não complicada e até grave, como no caso de malária cerebral, associada apenas ao *P. falciparum*. A evolução da doença é dependente da idade (Aponte et al.,

2007) e influenciada pelo nível de transmissão do parasita (Marsh&Snow, 1997). Os principais fatores na resposta de um indivíduo a malária são a resistência inata e a imunidade adquirida ativamente.

A imunidade inata é uma propriedade inerente do hospedeiro, um estado refratário ou uma resposta inibitória imediata à introdução do parasita e independe de um contato prévio com o parasita. Esta é determinada pela genética do hospedeiro, como a ausência de receptores específicos na superfície dos eritrócitos e polimorfismos genéticos, entre os quais a talassemia, deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) e anemia falciforme (Marsh&Kinyanjui, 2006; Williams, 2006).

Imunidade adquirida ativa é um aprimoramento do mecanismo de defesa do hospedeiro, como resultado de um encontro anterior com o patógeno (ou partes dele). Já a imunidade adquirida passiva é conferida pela transferência de substâncias protetoras pré-natal ou pós-natal da mãe para a criança ou pela administração de tais substâncias.

A imunidade adquirida contra os estágios sanguíneos de *Plasmodium* envolve a resposta imune humoral e a resposta imune mediada por células. Enquanto a imunidade de longa duração contra diversos patógenos pode ser adquirida após uma única infecção, imunidade contra a malária provavelmente nunca é completa mesmo em adultos vivendo em áreas de alta transmissão por toda a vida.

Entretanto, nas áreas onde a malária é endêmica indivíduos expostos naturalmente à infecção malárica desenvolvem imunidade, que permanece enquanto se mantiverem em região de transmissão estável. A imunidade adquirida é de curta duração e cepa-específica; gradualmente desenvolvida após repetidas infecções. Esta imunidade possibilita a habilidade de conter a parasitemia, oferecendo proteção contra o agravamento dos sintomas e diminuindo a mortalidade. As crianças mais velhas e adultos

são resistentes a morbidade, gravidade e morte, embora permaneçam suscetíveis à infecção (Marsh&Kinyanjui, 2006). Ainda, é possível adquirir uma imunidade significativa a malária grave como a malária cerebral após poucas infecções sintomáticas (Gupta et al., 1999).

Estudos sobre transferência passiva de imunoglobulinas de indivíduos imunes garantiram proteção a indivíduos não imunes. Este fato demonstra a importância de anticorpos na imunidade contra malária (McGregor, 1964) e indica que a imunidade adquirida contra fase sanguínea é altamente dependente de anticorpos. Porém, experimentos mostraram que o efeito é parcial, já que não inibe totalmente a parasitemia e a proteção observada foi de curta duração (Sabchareon et al., 1991). Em áreas endêmicas, a transferência passiva de anticorpos IgG durante a gestação da mãe imune para o filho, também foi relatada como capaz de conferir proteção clínica contra malária durante os seis primeiros meses de vida (Williams&McFarlane, 1969).

É aceito o conceito de que anticorpos inibem a invasão do eritrócito pelos merozoítas e previnem a adesão de eritrócitos infectados ao endotélio vascular, entretanto alguns estudos sugerem que os anticorpos hajam em cooperação com leucócitos (Bouharoun-Tayoun et al., 1990).

Subclasses de IgG citofílicas parecem ser particularmente importantes, provavelmente por favorecerem o *clearance* no baço através da opsonização, facilitar citotoxicidade mediada por células e ativação do sistema complemento (Marsh&Kinyanjui, 2006).

A imunidade contra infecção por *Plasmodium* desenvolvida lentamente é provavelmente nunca estéril (Langhorne et al., 2008; Marsh&Kinyanjui, 2006). Os mecanismos subjacentes a estas observações são apenas parcialmente compreendidos.

Além disso, não é claro por que candidatos a vacinas experimentais contra a malária outra promissores (Belnoue et al., 2004) posteriormente, deixam de proteger, ou apenas protegem parcialmente moradores de áreas endêmicas de malária (Guilbride et al., 2010). Embora seja provável que a variação antigênica e diversidade alélica desempenhem um papel importante nestas observações (Bull et al., 1998; Smith et al., 1995; Marsh&Howard, 1986), estudos recentes sugerem que a exposição crônica por *P. falciparum* induz alterações qualitativas nas respostas de células B e T, que também podem desempenhar um papel na evasão do sistema imune. Ainda, "exaustão" funcional (disfunção imune) entre populações de células T e B é uma característica bem descrita de infecções virais crônicas, tais como a hepatite B e C e os vírus HIV (Kim&Ahmed, 2010; Moir&Fauci, 2009; Wherry, 2011). É concebível que a exposição crônica a *P. falciparum* em áreas endêmicas de malária também estaria associada a exaustão de células T e B, contribuindo para a aquisição de imunidade prolongada a malária.

A maioria dos antígenos selecionados como candidatos em vacinas contra malária são alvos da imunidade natural. Embora a imunidade natural contra malária seja relativamente ineficiente, custando alta mortalidade infantil e as vacinas em teste sejam apenas parcialmente protetoras. Logo, entender os possíveis alvos e mecanismos da imunidade protetora é importante para análise de novas vacinas. O objetivo no desenvolvimento de uma vacina é induzir respostas de células-T e anticorpos a um ou mais antígenos, porém em maior magnitude e duração, assim como transcender a especificidade a cepas, em relação ao obtido pela imunidade natural (Moorthy et al., 2004).

Desenvolvimento de vacinas antimaláricas

Apesar de uma constante atividade de pesquisa, ainda não existe uma vacina capaz de impedir de maneira eficaz e duradoura a infecção pelo *Plasmodium* spp.. A dificuldade de desenvolver uma vacina altamente efetiva contra malária está relacionada com a complexidade do ciclo de vida do parasita, extensiva variação antigênica, mecanismos do parasita para escapar das respostas do sistema imune do hospedeiro e enorme biomassa de parasitas dentro do hospedeiro durante a infecção (Kappe et al., 2010).

Análises experimentais sugerem que a indução de uma imunidade protetora contra malária possa ser um objetivo tangível e tem sido de intensa busca pela sociedade científica a anos. As principais observações que corroboram com estas análises são o fato de indivíduos infectados continuamente pelo parasita desenvolverem gradualmente uma imunidade natural, porém de curta duração e cepa-específica (Baird et al., 1991). Além disso, a transferência passiva do soro de pacientes “imunes” induz proteção em crianças infectadas (Sabchareon et al., 1991).

As principais características desejáveis para uma vacina antimalárica devem incluir um bom perfil de segurança em conjunto com uma elevada eficácia contra a infecção e a doença. No entanto, há outras condições que precisam ser tratadas em conjunto com desenvolvimento de vacina contra a malária:

- (i) Ser eficaz na prevenção da doença, na evolução em formas clínicas graves e transmissão na comunidade;
- (ii) ser completamente segura para crianças, jovens e populações de risco;
- (iii) promover proteção contra todas as espécies de *Plasmodium* que infectam o homem;
- (iv) promover imunidade de longa duração;

- (v) ser administrada nos primeiros meses de vida;
- (vi) ser de fácil fabricação, administração, armazenamento e manipulação;
- (vii) ser acessível para os governos dos países de baixa renda (Garcia-Basteiro et al., 2012).

Diferentes classificações para candidatos a vacinas contra a malária têm sido utilizadas por diferentes autores. Estas classificações podem ser baseadas: na fase do ciclo do parasita que visam atuar; na composição da própria vacina (organismo inteiro, proteínas recombinantes ou DNA, e alguns deles em adjuvante ou vetores); na estratégia de vacinação (diferentes doses, regimes de *prime* e *boost*); na capacidade de interromper a transmissão (independentemente ou não de seu efeito sobre a doença clínica) e na população que pretendem atingir (população em áreas endêmicas, viajantes). No entanto, algumas das vacinas candidatas atuam em diferentes fases do parasita combinando estratégias diferentes, tornando difícil criar categorias que não se sobreponham (Garcia-Basteiro et al., 2012). As abordagens vacinais contra malária mais utilizadas estão agrupadas de acordo com pontos do ciclo do parasito, em: vacinas pré-eritrocíticas, vacinas contra estágios sanguíneos e aquelas que buscam bloquear a transmissão. É provável que uma vacina eficaz compreenda diferentes antígenos de diferentes estágios do ciclo.

O desenvolvimento moderno de vacinas antimaláricas deriva de estudos que demonstraram que a imunização com esporozoítas irradiados foram capazes de induzir proteção parcial e total em camundongos (Nussenzweig et al., 1967), em primatas não-humanos (Collins&Contacos, 1972) e em humanos (Rieckmann et al., 1979). Estas evidências abriram perspectivas para o desenvolvimento de uma vacina contra malária, em particular, a utilização de esporozoítas atenuados por irradiação. Entretanto uma vacina experimental baseada neste tipo formulação, embora confira altos níveis de

proteção, não é uma estratégia prática de vacinação. Nesta estratégia de vacinação a obtenção de grandes quantidades de material é um limitante pois cada voluntário recebe um grande número de picadas de mosquitos irradiados. (Hill, 2011). Ainda, há outro fator que deve ser levado em consideração que é a indução de uma imunidade restrita a fase pré-eritrocítica do ciclo evolutivo do parasita, além de ser associada a uma instabilidade genética e virulência residual.

A identificação da proteína do circunsporozoíta (CS) como o principal componente de revestimento do esporozoíta levou à clonagem e sequenciamento deste gene gerando grande expectativa no potencial vacinal deste antígeno. Entretanto, testes clínicos revelaram uma imunogenicidade modesta dos candidatos vacinais e falharam em mostrar eficácia significativa ao desafio com esporozoítas (Hill, 2011).

Na década de 1980, pesquisadores da América do Sul desenvolveram uma vacina baseada em um peptídeo de fase sanguínea (SPf66), que parecia ser eficaz em macacos e humanos (Patarroyo et al., 1988). No entanto, estudos posteriores realizados em diferentes países endêmicos não conseguiram fornecer resultados similares.

Baseado em evidências que mostraram que repetidas infecções em humanos resultam em controle da parasitemia e a imunidade eficaz reduz a doença clínica, foram direcionados estudos para desenvolver e testar o potencial vacinal de diferentes peptídeos e proteínas da fase sanguínea do parasita. Foram avaliadas respostas ao antígeno de membrana apical 1 (AMA1), proteína de superfície do merozoíta (MSP): MSP1, MSP2, MSP3, entre outros. Apesar dos consideráveis esforços, nenhuma destas vacinas até os dias atuais mostrou uma proteção clínica satisfatória (Ellis et al., 2010). As apostas para vacinas contra a fase sanguínea são ainda maiores quando a erradicação da malária é o objetivo, porque elas não devem apenas reduzir a doença, mas também a carga parasitária a um grau que reduza a transmissão (Kappe et al., 2010).

O desenvolvimento de vacinas antimaláricas tem sido bastante intenso contra a malária causada por *P. falciparum*, onde mais de 70 formulações estão em desenvolvimento ou em fase de testes clínicos. No entanto, quando se trata de *P. vivax* poucos esforços e conhecimento têm se acumulado. Em parte, devido, à dificuldade de execução de testes *in vitro* e falta de informação sobre este parasito. Atualmente, vários autores têm considerado a CSP de *P. vivax* como o maior alvo para o desenvolvimento de vacinas recombinantes. Peptídeos sintéticos construídos a partir desta proteína induzem altos níveis de resposta imune humoral e produzem anticorpos que exibem a mesma especificidade gerada em infecções naturais (Arevalo-Herrera&Herrera, 2001; Beeson&Crabb, 2007; Herrera et al., 2007).

Devido à grande dificuldade enfrentada para desenvolver uma vacina eficaz contra malária, é preciso projetar e desenvolver uma grande variedade de novas abordagens, não apenas com o intuito de controlar a infecção e a doença, mas também acessar novas tecnologias em vacinas. Entre os pioneiros avanços no desenvolvimento de vacinas antimaláricas estão: novas formulações de adjuvantes capazes de induzir níveis excepcionais de anticorpos, desenvolvimento de vacinas de subunidades, primeiro teste clínico usando vacinação com DNA, descoberta e testes clínicos de imunização com vetores *prime-boost*, entre outros (Hill, 2011).

Vacinas que atuam na fase pré-eritrocítica

A fase pré-eritrocítica do parasita, assintomática, é iniciada com a picada do inseto vetor e finalizada com a ruptura dos hepatócitos infectados. A maioria das vacinas experimentais contra malária baseia-se em antígenos expressos nesta fase.

Estratégias vacinais baseadas nesta fase visam impedir a infecção do hospedeiro e induzir uma resposta imune contra antígenos das fases iniciais da infecção, ou seja, os

antígenos expostos desde a entrada dos parasitas no sangue (esporozoítas) (Garcia-Basteiro et al., 2012). Ainda, almejam gerar resposta imune que neutralize a habilidade dos esporozoítas de invadir o fígado ou se desenvolver nos hepatócitos (Ripley Ballou&Cohen, 2013). Se uma vacina destinada a esta estratégia fosse 100% eficaz, bloquearia completamente os parasitas de atingirem fases sanguíneas, evitando-se, por consequência, qualquer sintomatologia clínica e risco de transmissão subsequente (Garcia-Basteiro et al., 2012). Esta vacina precisaria ser capaz de induzir altos títulos de anticorpos de alta atividade. Esses anticorpos teriam a função de interceptar o esporozoíta antes que pudesse acessar os vasos sanguíneos e opsonizar o esporozoíta para degradação pelos macrófagos. Ou ainda, bloquear ligantes essenciais do parasita para receptores de invasão dos hepatócitos. Esta vacina ideal induziria resposta de anticorpos de longa duração e células B de memória que gerariam proteção por toda vida em indivíduos imunizados na infância com uma única dose da vacina (Riley&Stewart, 2013).

Antígenos expressos na fase pré-eritrocítica, tais como: a proteína do circunsporozoíta (CS), a proteína da superfície do esporozoíta 2 (SSP-2), também denominada proteína anônima relacionada a trombospondina (TRAP), e o antígeno do estagio hepático 3 (LSA-3) têm sido utilizados como base de vacinas experimentais com o intuito de gerar uma imunidade protetora contra estágios pré-eritrocíticos (Webster&Hill, 2003).

A principal vacina desta fase e a mais eficiente contra malária até o momento é a RTS,S. A RTS,S, é uma vacina baseada em proteína recombinante, que consiste na porção C-terminal do gene da CSP de *P. falciparum* fusionada com a porção amino terminal do ao antígeno de superfície da hepatite B (S). Quando expressa em sistema de *Saccharomyses cerevisiae* o produto fusionado (RTS) se liga ao antígeno de superfície da

hepatite B (S) não fusionado para formar partículas imunogênicas denominadas RTS,S (Bojang et al., 2001). Esta formulação apresentou resultados promissores após testes clínicos em indivíduos de área endêmica. Acredita-se que a emulsificação da RTS,S em um potente adjuvante (AS01, AS02 e QS21), seja possivelmente o fator central da proteção observada (Bojang et al., 2001). Apesar do relativo sucesso, e grandes expectativas, ensaios clínicos de fase III na África com o candidato de vacina antimalárica RTS,S/AS01 apresentaram resultados decepcionantes (Butler, 2012). A vacina não mostrou proteção substancial no grupo chave do estudo, correspondendo a crianças que receberam a primeira dose entre 6 e 12 semanas de idade (Agnandji et al., 2012). Este grupo etário é o alvo chave, pois nos países pobres qualquer vacina contra a malária precisa ser dada a crianças que utilizam a infraestrutura já utilizada em imunizações de rotina nesta idade. (Agnandji et al., 2011). O baixo efeito protetor observado foi a metade dos 62% observada em estudos menores de fase II na mesma faixa etária (Asante et al., 2011) Além disso, foi muito menos que os 55% registrados em testes em um grupo de crianças que foram vacinadas entre 5 e 17 meses de idade (Agnandji et al., 2011).

Recentemente, técnicas descritas a 40 anos para vacinação com picadas de mosquitos irradiados (Nussenzweig et al., 1969; Clyde et al., 1979; Rieckman et al., 1974) foram aperfeiçoadas e possibilitaram a fabricação asséptica e atenuação por radiação dos esporozoítas (Hoffman et al., 2010; Epstein et al., 2011). Desta forma, levando à obtenção de esporozoítas metabolicamente ativos, purificados e crio-preservados para uma vacina injetável. Isto foi alcançado (Hoffman et al., 2010; Epstein et al., 2011) e o primeiro teste clínico conduzido foi realizado em adultos que receberam até seis doses de imunizações com $1,35 \times 10^5$ esporozoítas de *P. falciparum* subcutaneamente (SC) ou por via intradérmica (ID) (Epstein et al., 2011). Entretanto, gerou respostas imunológicas de baixo

nível e mínima proteção. A hipótese de que a limitada eficácia observada seria devido a ineficiência das vias de administração, levaram a testes em primatas não-humanos (Epstein et al., 2011) e humanos (Seder et. al, 2013) imunizados via intravenosa (IV). Estes testes clínicos (Seder et. al, 2013) apresentaram proteção em todos os indivíduos imunizados com $1,35 \times 10^5$ esporozoítas de *P. falciparum*. A eficácia da vacina neste ensaio foi consideravelmente mais elevada do que a induzida por vacinas de subunidade (Kester et al., 2009; Chuang et al., 2013) e consistente com os dados gerados por imunização com picadas de mosquitos (Hoffman et al., 2002). No entanto, as respostas imunes anticorpo e celular induzida pela vacina PfSPZ contra os antígenos específicos de malária testados foram substancialmente mais baixas do que as induzidas por vacinas de subunidades experimentais. Continua a ser uma questão em aberto se a proteção resulta da soma de múltiplas respostas antígeno-específicas de baixo nível ou de respostas robustas para um pequeno número de antígenos ainda não identificados expressos por esporozoítos (Florens et al., 2002). Esta estratégia de vacinação esbarra na limitação da obtenção de grandes quantidades de material e também em críticas quanto a via de administração considerada arriscada.

Vacinas que atuam na fase eritrocítica

Esta fase, responsável pelos sintomas clínicos da doença, é marcada pelo desenvolvimento do parasita nos eritrócitos do hospedeiro, culminando na ruptura destas células e na re-infecção de hemácias saudáveis. Em alguns casos pode haver sequestração de eritrócitos infectados (EI) nos microcapilares de vários órgãos do hospedeiro provocando anemia severa, malária cerebral e gestacional. Estas complicações clínicas são responsáveis pela maioria das mortes por malária. Uma vacina contra formas eritrocíticas teria o objetivo de prevenir a invasão dos eritrócitos e bloquear os glóbulos

vermelhos infectados de aderirem a vários tecidos, o que é de fato o início de uma doença clínica da malária. Apesar de não ser eficaz para prevenir a infecção, minimizaria os sintomas clínicos de um episódio de malária e reduziria as chances de complicações e morte do hospedeiro (Garcia-Basteiro et al., 2012).

Anticorpos neutralizantes podem inativar merozoítas antes da invasão ou engatar mecanismos citotóxicos efetores dependentes de anticorpos contra antígenos alvo expressos na superfície dos esquizontes. Porém, estes antígenos são geralmente submetidos a significantes variações antigênicas e/ou são extremamente complexos. Portanto, a maioria das vacinas são baseadas em apenas uma porção da proteína nativa (Ripley Ballou&Cohen, 2013).

A maioria dos antígenos vacinais atuam contra os estágios sanguíneos do parasita, prevenindo a invasão do parasita no eritrócito. Entre esses antígenos, o mais estudado é a proteína de superfície do merozoíta 1 (MSP1), o qual é o antígeno envolvido na invasão de eritrócitos mais bem caracterizado. Entretanto, o desenvolvimento de uma vacina baseada neste antígeno esbarrou na descoberta de outras vias para invasão e pela demonstração de que anticorpos contra MSP1 podem bloquear a ação de anticorpos protetores (Holder et al., 1999).

Dentre as proteínas expressas na fase eritrocítica, o antígeno apical de membrana (AMA1) tem sido considerado como candidato a vacina contra EI. Este antígeno é relativamente conservado entre diferentes espécies, e anticorpos humanos capazes de reconhecer este antígeno inibem a invasão de merozoítas em novos eritrócitos (Holder et al., 1999).

Outra estratégia para busca de novos candidatos a uma vacina contra fase eritrocítica é focar em proteínas do parasita que são necessárias para invasão do eritrócito. Para iniciar a invasão, o merozoíta primeiramente se liga ao eritrócito e se

reorienta para uma ligação apical. Duas famílias de proteínas de *P. falciparum* foram identificadas como responsáveis na criação da junção entre a porção apical do parasita e o eritrócito: a *Duffy Binding Like* (DBL) e a *Reticulocytes homology ligands* (Rh) (Cowman&Crabb, 2006; Gaur et al., 2004). *P. falciparum* apresenta múltiplos membros desta família. Como consequência, é provável que uma vacina que bloqueie com sucesso a invasão de eritrócitos precisaria ter como alvo vários ligantes do parasita (Crompton et al., 2010).

Recentemente, a proteína da membrana do eritrócito de *P. falciparum* 1 (PfEMP-1), que é expressa na superfície do EI, tem sido utilizada como vacina experimental. Esta vacina visa bloquear a citoaderência parasitária em microcapilares, e consequentemente, as formas severas da doença como a malária cerebral e gestacional. Entretanto, este antígeno é codificado a partir de genes variáveis (*var*) responsáveis pela variação antigênica em *P. falciparum* (Craig&Scherf, 2000). Ainda, este mecanismo de variação antigênica além de ser responsável pelas repetidas infecções e recaída do hospedeiro, também confere um caráter altamente polimórfico para esta molécula; podendo comprometer a eficácia de uma vacina baseada na PfEMP-1.

Poucos antígenos eritrocíticos se encontram em testes clínicos como vacinas. Entre eles estão: AMA1, antígeno de ligação ao eritrócito-175 (EBA-175), MSP1, MSP3. Infelizmente, os candidatos eritrocíticos mais avançados, AMA1 e MSP1, não demonstraram eficácia em crianças africanas durante testes clínicos de fase II (Sagara et al., 2009).

O antígeno MAEBL

Kappe e colaboradores isolaram e identificaram um antígeno de aproximadamente 200 kDa de *Plasmodium yoelii* e *P. berghei* como parte integrante da família de proteínas

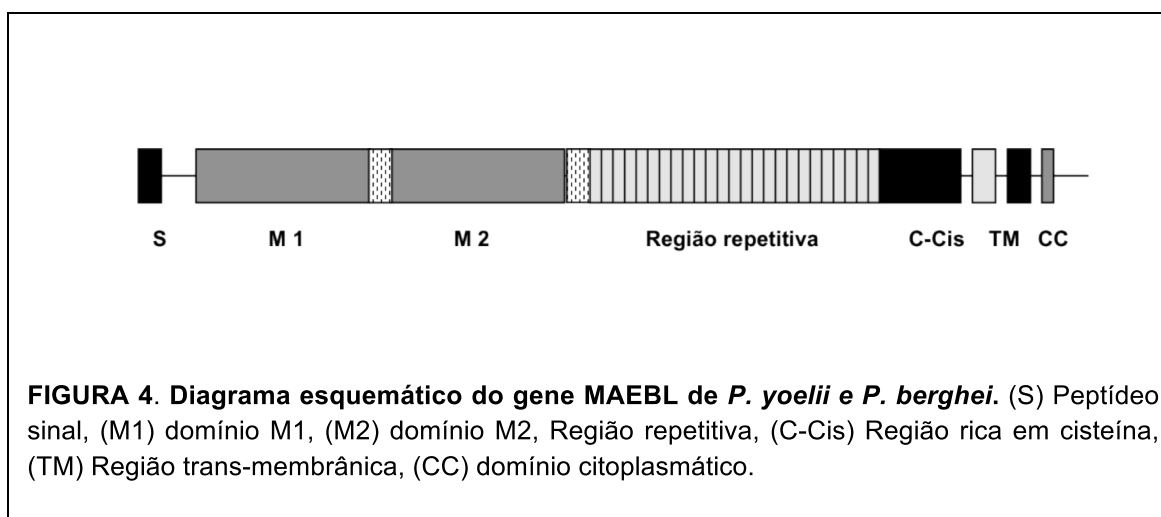
de ligação do parasita ao eritrócito (EBP) (Kappe et al., 1997; Kappe et al., 1998). Este antígeno, denominado MAEBL, possui domínios de duas famílias proteicas presentes em organelas situadas na região apical de merozoítas e relacionadas com a infectividade do parasita (Blackman&Bannister, 2001; Noe&Adams, 1998; Preiser et al., 2000).

O antígeno MAEBL apresenta uma estrutura molecular homóloga a proteínas *Duffy Binding Like* (DBL) na região carboxi-terminal. Por outro lado, sua porção amino-terminal, rica em cisteínas, apresenta similaridade com o domínio de 44 kDa do antígeno apical de membrana 1 (AMA-1). A similaridade de cada região deste antígeno a duas

proteínas distintas confere um caráter estrutural quimérico a esta molécula. Também foi mostrada a capacidade deste antígeno em se ligar a eritrócitos, caracterizando esta família proteica como um novo tronco de uma superfamília de moléculas de adesão do parasita (Kappe et al., 1997; Kappe et al., 1998).

O gene *maebi* de *P. yoelii* e *P. berghei* é composto de uma única cópia e possui uma estrutura de vários éxons, cada éxon representando um domínio funcional (Kappe et al., 1998). Foi mostrado que o éxon 1 codifica o peptídeo sinal da molécula; o éxon 2 os domínios M1 e M2, similares aos domínios ricos em cisteína de AMA1, uma região repetitiva e uma região carboxil também rica em cisteínas com alta similaridade a antígenos EBP-DBL; e o éxon 3 uma região transmembrânica. Por último, o quarto e quinto éxon codifica uma cauda citoplasmática (figura 4).

Os domínios M1 e M2 do antígeno MAEBL de *P. yoelii* são responsáveis pela ligação desta molécula a eritrócitos, esta propriedade adesiva é similar àquela observada pelos antígenos DBL de *P. vivax*, *P. knowlesi* e *P. falciparum* (Adams et al., 2001). Os motivos presentes no antígeno MAEBL de *P. falciparum* que apresentam esta capacidade adesiva foram recentemente descobertos utilizando peptídeos correspondentes a



diferentes porções dos domínios M1 e M2 (Ocampo et al., 2004). Neste trabalho, foi demonstrada a capacidade de alguns destes peptídeos em inibir a invasão de merozoítas de *P. falciparum*, e a existência de dois motivos de adesão no domínio M1 e cinco no domínio M2. Estes resultados sugerem o domínio M2 como o principal responsável pela capacidade adesiva da molécula.

Também foi mostrado que o gene *maebi* de *P. falciparum* possui maior similaridade com seu correspondente em *P. yoelii* e *P. berghei*, do que com os genes pfAMA1 ou EBA-175 também de *P. falciparum* (Ghai et al., 2002). Além disto, este estudo mostrou que; tal qual o antígeno MAEBL expresso em *P. yoelii* e *P. berghei*, o seu correspondente expresso em *P. falciparum* também apresenta atividade adesiva mediada

principalmente pela região M2. Ainda neste trabalho, foi observado que o soro de pacientes provenientes de regiões endêmicas foi capaz de reconhecer uma proteína recombinante (r-PfM2), baseada na porção M2 do MAEBL de *P. falciparum* e inibir a adesão da r-PfM2 a eritrócitos. Desta maneira, estas evidências tornam o modelo murino de grande relevância para a análise de vacinas experimentais baseadas no antígeno MAEBL.

Apesar do antígeno MAEBL ter sido descrito primeiramente em merozoítas sanguíneos, a produção desta molécula também foi observada em esporozoítas de *P. yoelii*, *P. berghei* e *P. falciparum* coletados a partir de glândulas salivares de mosquitos infectados (Ghai et al., 2002; Kappe et al., 2001; Kariu et al., 2002). Em experimentos de depleção gênica foi mostrado que MAEBL é essencial para a infecção dos esporozoítas nas glândulas salivares do mosquito vetor. Este fato sugere que esta proteína esteja implicada na migração do esporozoíta na glândula salivar (Kariu et al., 2002).

Preiser e colaboradores mostraram que MAEBL é expresso de maneira diferenciada em esporozoítas da glândula salivar e esporozoítas presentes no intestino do inseto (Preiser et al., 2004). Além disto, estes autores demonstram que anticorpos capazes de reconhecer o antígeno MAEBL de *P. yoelii*, também inibem o desenvolvimento do parasita em culturas primárias de hepatócitos infectados por esporozoítas. Estes dados sugerem fortemente a participação desta proteína no desenvolvimento do estágio hepático no hospedeiro vertebrado e abrem perspectivas para sua utilização como alvo de uma resposta imune mais abrangente e eficaz.

Adjuvantes

Em adição ao uso do antígeno certo, a eficácia de uma vacina recombinante depende também do uso de um adjuvante adequado para mediar a indução de múltiplas camadas de respostas imunes protetoras.

Adjuvantes aceitáveis devem aumentar a potência, longevidade e qualidade da resposta imune específica a antígenos, porém causando toxicidade e efeitos imunes de longa duração mínimos (Gupta et al., 1993).

Os adjuvantes tradicionalmente são classificados de acordo com a fonte de seus componentes, propriedades físico-químicas e mecanismos de ação em:

- (i) Imunoestimulantes, agindo diretamente no sistema imune para aumentar a resposta aos antígenos: Exemplos: ligantes TLR, citotoxinas, saponinas e exotoxinas bacterianas;
- (ii) Veículos, apresentando antígenos para o sistema imune. Exemplos: sais minerais, emulsões lipossomas, virosomas (Coler et al., 2009).

Desta maneira, eles podem melhorar a imunogenicidade de antígenos fracos, acelerar a velocidade e a duração da resposta imune; modular isotipo, afinidade e especificidade de anticorpos, (contra antígenos e patógenos). Além disso, adjuvantes podem estimular a imunidade mediada por células, incluindo a indução de determinadas citocinas; promover a indução de imunidade das mucosas; aumentar as respostas imunes em indivíduos imunologicamente imaturos, ou senescentes; diminuir a quantidade de antígeno vacinal utilizada. Ainda mais, podem ajudar a superar competição antigênica em vacinas combinadas ou restrição genética de respostas imunes (Perlmann&Troye-Blomberg, 2002).

Apesar dos adjuvantes aumentarem a imunogenicidade do antígeno vacinal, diferentes adjuvantes ativam preferencialmente diferentes braços do sistema imune, o que

pode conduzir a uma resposta predominante Th-1 ou Th-2 sozinhas ou ambas. Como resultado, a escolha de adjuvantes depende do tipo de resposta imune desejada para o efeito máximo da vacina.

Na ausência de uma resposta imune apropriada, o resultado da imunização será sempre negativo, ou seja, a vacina será insuficiente para neutralizar o agente patogênico e/ou proteger contra as manifestações clínicas da doença. Adjuvantes possuem uma eficácia dependente de sua formulação; ambos desempenham um papel muito importante no aumento e modulação das respostas imunes, e precisam ser considerados como um elemento essencial para o desenvolvimento de vacinas (Coler et al., 2009; Reed et al., 2009). Adjuvantes asseguram a chave para o sucesso de uma formulação vacinal, e o mesmo adjuvante pode não funcionar para todos os antígenos. Formulações eficientes de adjuvantes podem utilizar múltiplos mecanismos para atingir os efeitos imunológicos desejados, que podem incluir a geração de depósitos de antígeno, liberação concomitante de antígeno e imunoestimulante, como aumentar a apresentação dos antígenos vacinais por células dendríticas e macrófagos (Coler et al., 2009).

Adjuvantes de Freund são emulsões de água em óleo de mannide monoleato e óleo mineral, com a adição (adjuvante completo de Freund, ACF) ou sem (adjuvante incompleto de Freund, AIF) de micobactérias inativadas. Desenvolvido ao longo dos anos 60, o ACF é hoje considerada o padrão ouro para adjuvantes, em grande parte devido à sua potência imunoestimulatória (Perlmann&Troye-Blomberg, 2002). É, no entanto, demasiado tóxico para utilização em seres humanos. Foi levantada a hipótese de que os adjuvantes de Freund exercem seus efeitos através de pelo menos três mecanismos: (1) o estabelecimento de um depósito de antígeno vacinal no local da injeção que permite uma liberação gradual e estável do antígeno; (2) proporcionar um veículo para transportar o antígeno emulsionado através do sistema linfático, gânglios linfáticos e do baço; o que

cria vários locais para a geração de respostas imunes; (3) interações com células apresentadora de antígenos (APCs) e outras células mononucleares; (4) gerar inflamação. Como resultado, ACF e AIF estimulam a produção de altos títulos de anticorpos contra o antígeno da vacina. Apesar de geralmente serem geradas amplas subclasses de anticorpos, a resposta imune induzida por adjuvante de Freund é predominantemente Th-1. Quase todas as vacinas com antígenos candidatos contra a malária passaram por testes murinos iniciais de imunização com a ACF e AIF como adjuvantes: Isto acontece, provavelmente, devido à sua potência imunoestimulatória e a suposição de que apenas os antígenos que demonstraram eficácia contra desafios com parasitas podem qualificar-se como candidatos a vacinas (Perlmann&Troye-Blomberg, 2002).

Adjuvantes e veículos usados em vacinas antimaláricas e que foram aprovados para testes clínicos em humanos ou são componentes em vacinas já licenciadas incluem sais de alumínio (alum), MF59TM (emulsão de óleo em água) MPL® (glicolípido), partículas virais, virosomas de influenza e toxina colérica (Coler et al., 2009; Reed et al., 2009).

A necessidade de uma concepção de vacinas com a capacidade de gerar respostas imunes eficazes adaptadas ao agente patogênico e da população alvo, promoveu a pesquisa no sentido da combinação de antígenos, com mais do que um adjuvante, a chamada abordagem de Sistema Adjuvante. Esta abordagem introduz a noção de que a interação com a resposta imune inata e o subsequente efeito sobre a resposta adaptativa pode ser ainda modulada com a combinação de mais de um adjuvante. Ao usar vários adjuvantes em combinação, a ativação das APCs podem ser influenciadas em mais de um nível, assim, uma melhor orientação do tipo de vias adaptativas subsequentes e induzir uma resposta imune mais robusta. A abordagem do

sistema adjuvante envolve a concepção cuidadosamente uma combinação de adjuvantes para produzir um efeito sinérgico ou aditivo melhorando assim a resposta imune que pode resolver dadas desafios. A investigação sobre a resposta imune mais apropriada para um agente patogênico específico, seja ela induzida por anticorpos ou estimuladora de células T, pode ajudar a orientar a seleção de adjuvantes que vai induzir a uma resposta mais eficaz (Leroux-Roels, 2010). Considerando-se todos os candidatos vacinais formulados com novos adjuvantes, os mais avançados em desenvolvimento (em ensaios de Fase III, licenciados ou em busca de licenciamento) são aqueles que contém AS01, AS03 e AS04. Como exemplo de aplicações de adjuvantes e Sistemas Adjuvantes em novos *designs* em vacinas, a vacina RTS, S foi formulada com dois sistemas de adjuvante, primeiramente com AS02, e mais recentemente, com AS01.

Acredita-se que através da combinação certa entre o antígeno e o Sistema Adjuvante, podem ser desenvolvidas vacinas eficazes anteriormente fora do alcance com formulações clássicas.

Sistema *prime-boost* de imunização

Um dos principais obstáculos no desenvolvimento de uma vacina contra a malária tem sido, tradicionalmente, a falta de imunogenicidade das formulações candidatas. Estudos utilizando sistema heterólogo de imunização sequencial, isto é, uma primeira imunização do material antigênico num determinado carreador seguido de imunizações contendo o mesmo gene ou antígeno em outro sistema carreador, têm demonstrado ser capazes de aumentar sinergicamente a resposta imune humoral e celular (Srivastava&Liu, 2003). Estratégias em sistemas *prime-boost* heterólogos têm sido consideradas uma promessa significativa em modelos animais de vacinas de uma série de doenças. Recentemente, vacinas experimentais baseadas nesta técnica têm sido utilizadas com

relativo sucesso contra protozoários patogênicos e viroses como HIV e EBOLA (Amara et al., 2001; Sullivan et al., 2000).

Estudos demonstraram que a imunidade protetora em camundongos contra a cepa altamente virulenta, *P.yoelii*, pode ser induzida por inoculação com uma vacina baseada em vaccínia vírus recombinante e influenza vírus recombinante expressando o epítipo citotóxico da proteína. Esta imunidade protetora foi maior quando os dois vetores vivos distintos foram usados nas injeções iniciais e de reforço. Ainda, foi mostrado que a proteção induzida pela imunização com estes vírus recombinantes foi principalmente mediada por células T CD8⁺ (Li, et al. 1993).

No modelo de malária murina, regimes de *prime-boost* heterólogo com a imunização de DNA plasmidial, seguido por imunização com proteína recombinante ou *Vaccinia* vírus atenuado ou poxvírus tem resultado em respostas imunes de qualidade superior quando comparado com reforços homólogos com o DNA ou proteína recombinante. Em geral, os dados indicam que o DNA plasmidial (com ou sem co-expressão de citocinas) representa a melhor modalidade para iniciação de uma resposta imune. Contudo, reforço heterólogo com poxvírus recombinantes gera resposta T CD8⁺ mais robusta (porém, as respostas de anticorpos pobres) e reforço heterólogo com a proteína recombinante em adjuvante gera maior resposta mediada por anticorpos (mas, por vezes, pobre respostas de células T CD8⁺). Respostas robustas TCD4⁺ são geradas por ambos os métodos de imunização reforço. Em todos os casos, a ordem de imunização é crucial (Schneider et al., 1999)

Adenovírus atualmente estão sendo considerados como uma opção promissora entre os diferentes vírus já testados como vetores para a vacina experimental contra a malária. Após repetidas demonstrações de sua elevada imunogenicidade e capacidade de induzir uma potente resposta imune de memória de células T e, em menor medida,

também de células B contra os produtos transgênicos sem causar patologia significativa (Peiperl et al., 2010). Neste sentido, adenovírus como vetores vacinais tem sido utilizados como ferramenta para induzir a imunidade contra a malária e tem demonstrado valor excepcional como componentes dos protocolos *prime-boost* para indução de respostas imunes. A administração desta vacina, juntamente com a plataforma de vacinas à base de proteína pode também resultar em respostas polifuncionais mediada por células contra a malária. Ainda acarreta em melhoria dos níveis de anticorpos específicos de *Plasmodium* e células T CD4+, de extremo interesse no combate às fases sanguíneas do parasita. Combinações de diferentes vírus (o adenovírus e poxvírus são considerados mais eficientes) e/ou proteína em adjuvantes em protocolos de imunização diferenciados, dependendo dos antígenos usados, poderiam acabar resolvendo os problemas de imunogenicidade apresentados pelos candidatos de uma vacina contra a malária.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os níveis de imunidade e proteção em camundongos injetados com uma vacina experimental baseada no antígeno M2-MAEBL de *P. yoelii*.

Objetivos Específicos

- 1- Clonar a sequência do gene M2-MAEBL de *P. yoelii* em vetor de expressão bacteriano (pET28a) ou eucariótico (pIgSP) para:
 - 1.1- Produção de proteína recombinante em bactéria (rPyM2-MAEBL);
 - 1.2- Geração de plasmídeos de expressão em células de mamíferos (pIgSP/M2-MAEBL);
- 2- Imunizar camundongos isogênicos utilizando:
 - 2.1- DNA plasmidial (pIgSP/M2-MAEBL);
 - 2.2- Proteína recombinante (rPyM2-MAEBL) emulsificada em adjuvante completo ou incompleto de Freund;
 - 2.3- Sistema de *prime-boost* heterólogo: DNA plasmidial (pIgSP/M2-MAEBL) seguido de proteína recombinante (rPyM2-MAEBL).
3. Avaliar a resposta imune induzida:
 - 3.1- Título, classe e subclasses de anticorpos contra a proteína recombinante;
 - 3.2- Reconhecimento de anticorpos contra a proteína nativa;
 - 3.3- Reconhecimento heterólogo dos anticorpos gerados contra a proteína nativa em *P. vivax* e *P. falciparum*.
- 4- Determinar os níveis de proteção induzidos nos animais imunizados.

5- Avaliar o potencial do soro anti-M2-MAEBL em inibir a invasão de formas sanguíneas de *Plasmodium*.

6- Determinar os mecanismos mediadores da proteção:

6.1- Participação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺;

6.2- Opsonização e indução do potencial fagocítico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e parasitas

Nos experimentos realizados neste projeto de tese foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens BALB/c e C57BL/6 de 6 a 7 semanas de idade fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos em nosso biotério *germ-free* e os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, sob aprovação do Comitê de Ética na Experimental Animal – CEEA/Unicamp (protocolo 1437-1). Foram utilizadas as linhagens *P. yoelii yoelii* YM (letal) e *P. yoelii yoelii* 17X (não letal), gentilmente cedidas pelo Dr. Laurent Renia (Singapore Immunology Network – SIgN, Singapura). Formas sanguíneas dos parasitas foram obtidas após descongelamento de criotubos mantidos a -80°C seguidos da infecção de camundongos via intraperitoneal (i.p).

Purificação de DNA genômico

Camundongos BALB/c infectados com *P.yoelii* YM foram sangrados no dia correspondente ao pico da parasitemia (>70%). Cinquenta microlitros do pellet de sangue do animal infectado foi ressuspendido em 550 µL de Tampão de Digestão. Após incubação durante a noite a 37°C, foi adicionado um volume (vol/vol) de Fenol-Tris (Sigma, pH:7,5 – 8,0). Em seguida, foi centrifugado a 15.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e a este foi adicionado um volume de solução Fenol-clorofórmio (Sigma). A centrifugação foi repetida e a parte aquosa foi removida novamente e foi adicionado 0,1 volumes de NaAc (3M) e 2 volumes de etanol 100%; o material genético foi precipitado durante a noite a -20°C. O pellet de DNA foi lavado duas vezes com etanol 70% e posteriormente ressuspendido em água ultra pura para ser utilizado em reação em cadeia da polimerase (PCR).

Soluções utilizadas:

- Tampão de Digestão: NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM, EDTA 25mM, SDS 0,5%.

Cultivo de bactérias

Meios para cultivo utilizados:

- Meio LB: Meio contendo bactotripton 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l, NaCl 5 g/l e pH ajustado para 7,3.
- Meio LB sólido: Como descrito acima contendo 1,5% de ágar bacteriológico.
- Meio SOB: Meio contendo bactotripton 20 g/L, extrato de levedura microbiológico 5 g/l, NaCl 0,5 g/L, pH 7,0, seguido de suplementação com 5 mL de uma solução de $MgCl_2$ 2M estéril.
- Meio SOC: Este meio possui a mesma composição do meio SOB, acrescido de 20 ml de uma solução de glicose 1 M para 1 litro de meio.
- Meio TB: Meio contendo 12 g bactotripton, 24 g/L de extrato de levedura microbiológico e 4 mL glicerol num volume de 900 mL. Como suplemento utilizou-se 100 ml de uma solução KH_2PO_4 0,17 M e K_2HPO_4 0,72 M estéril.

Todos os meios foram esterilizados por autoclavação.

Vetores de expressão

pGEM-T

O vetor pGEM-T (Promega) de 3.0 Kb com resistência a ampicilina tem sido utilizado para a clonagem direta de produtos de PCR devido a extremidades 3' portadoras de timidina (T). Este vetor contém promotores T7, SP6 e uma região com múltiplos sítios

de restrição na região codante para enzima β -galactosidase, permitindo a diferenciação baseada em cor dos clones positivos dos negativos; respectivamente brancos ou azuis.

pIgSP

O vetor pIgSP, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Mauricio Rodrigues (Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo) é baseado no vetor pcDNA3 (Invitrogen). Este último tem sido utilizado com sucesso nas experiências de imunização com DNA recombinante (Boscardin et al., 2003; Vasconcelos et al., 2004). O vetor pcDNA3 contém os genes que codificam resistência a neomicina e ampicilina, um promotor CMV derivado do citomegalovírus, um promotor T7, um “polylinker” e o promotor SP6 (disposto no sentido contrário de transcrição dos dois primeiros promotores). Após o promotor SP6, este plasmídeo possui uma sequência eucariótica que codifica para a adição de uma cauda poli-A aos mRNAs transcritos a partir do promotor CMV. Dessa maneira, a sequência codificadora inserida no “polylinker” fica sob controle do promotor do CMV. O vetor pIgSP é baseado no pcDNA3, porém acrescido de uma sequência sinal e uma região contendo um epítipo de célula T universal (Boscardin et al., 2003).

pET28a

Para produção de proteínas recombinantes em células procarióticas foi utilizado o vetor pET28a (Novagen). Este vetor é capaz de expressar uma proteína de fusão contendo na sua porção N-terminal uma cauda com seis histidinas, para purificação em resina de níquel, e uma região marcadora T7. Este vetor também possui o gene que codifica resistência a kanamicina.

Amplificação da sequência correspondente ao domínio M2 do antígeno MAEBL de *P. yoelii*

Para amplificação do domínio M2 e subsequente clonagem nos vetores plgSP e pET28a, foram utilizados oligonucleotídeos específicos baseados na sequência compreendida entre os nucleotídeos 5411-5583 do gene *maeb1* de *P. yoelii yoelii* (Genbank, Accession number AF031886). Desta maneira, utilizamos os oligonucleotídeos: (i) *sense* plgSPM2F 5'-**GGA GGT ACC** CTT AAC AAA TAT ATG AAA TCT AAT GTT GAA CTT-3' e (ii) *anti-sense* plgSPM2R 5'-**CTC GAA TTC** CTA CGA TTC ATC GGT ATT TCT TGT AG-3', que contêm respectivamente os sítios de restrição *KpnI* e *EcoRI* (negrito), e um códon de parada (sublinhado) a fim de facilitar a clonagem no vetor plgSP. Em relação as clonagens no vetor pET28a, foi utilizado o mesmo oligo *anti-sense* descrito acima e o oligo (iii) *sense* pET28aM2F 5'-**CGC GGA TCC** CTT AAC AAA TAT ATG AAA TCT AAT GTT GAA CTT -3', este último contendo o sítio de restrição *BamHI* (negrito).

As reações de PCR foram realizadas num volume total de 20 µl, e contendo numa concentração final 20 ng de DNA molde, 5 µM dos oligonucleotídeos (RW genes), 125µM de cada dNTPs (Invitrogen), 2 mM MgCl₂ e 0,5 unidade de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). A amplificação foi observada após 94°C por 5 min de denaturação, e 30 ciclos realizados a 45°C por 2 min, 72°C por 2 min, e 94°C 1 min. A reação foi finalizada após 5 min a 72°C.

Eletroforese de DNA

Moléculas de DNA inteiras ou enzimaticamente clivadas foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose em concentrações variáveis, de 0,8 a 1,5%, dependendo do tamanho molecular da amostra, em tampão TAE 0,5X. Uma corrente para gerar uma voltagem de 65-100V entre os eletrodos da cuba foi aplicada ao gel. O gel foi

corado com SYBR-Safe 1x (Molecular Probes – Invitrogen), observado em transiluminador de U.V. e fotografado. Como referência para o tamanho dos fragmentos, foi utilizado DNA de fago λ digerido pela enzima Hind III (Invitrogen) ou o padrão “1kb Plus DNA Ladder” (Invitrogen). O tamanho dos fragmentos de interesse foi estimado em função da migração dos padrões. Os fragmentos foram quantificados de acordo com a intensidade da banda e relacionando-a com a concentração dos padrões.

Soluções utilizadas:

- TAE (1X concentrado): Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0.

Purificação de banda de gel de agarose

Para a purificação de bandas de gel de agarose 1% foi utilizado o “*GeneClean II Kit*” (Q-Biogene). A banda contendo o fragmento de DNA desejado foi extraída utilizando-se bisturi estéril, e colocada em tubo de microcentrifuga. Em seguida, foi adicionado 3 volumes de uma solução de iodeto de sódio saturada por 10 min à 55°C para dissolver a agarose. Após este período, foi acrescentado 5 μ l de resina (“*Glassmilk*”), previamente ressuspendida conforme especificações do fabricante, à solução contendo o fragmento de DNA em tampão fornecido. A mistura foi deixada por 30 min à temperatura ambiente (T.A.) e centrifugada a 10.000 x g por 10 seg. O precipitado foi ressuspendido em Tampão de Lavagem, diluído conforme as normas do fabricante, e centrifugado a 10.000 X g por 10 seg. Após a remoção do sobrenadante, o procedimento de lavagem foi repetido mais uma vez. Para a eluição do fragmento de DNA, após as lavagens, a resina contendo o DNA foi ressuspendida em água ultra pura em um volume igual ao volume de resina, e incubada a 55°C por 15 min. O sobrenadante contendo o fragmento de DNA foi coletado e quantificado em gel de agarose.

Bactérias competentes

Para os experimentos de clonagem e produção de plasmídios vetores foram utilizadas as cepas (Life Technologies) de *Escherichia coli* DH5 α (pGEM-T; pIgSP) e *Escherichia coli* BL-21 DE3 (pET28a).

Preparo de bactérias competentes

Para o preparo das bactérias competentes, uma colônia de bactéria foi inoculada em 4 mL de meio SOB, seguindo-se de incubação durante 16 h a 37°C sob agitação constante. Em seguida, adicionou-se 1mL da cultura saturada em 40 mL de meio SOB para crescimento a 37°C até a densidade óptica atingir entre 0,6 e 0,8 a 600 nm. As células foram transferidas para tubos estéreis e deixadas no gelo por 15 min. Após serem centrifugadas a 4°C por 10 min e 3.000 X g, o meio de cultura foi descartado e as bactérias foram ressuspensas em 20 mL de uma solução de CaCl₂ 0,05 M, seguido de incubação em gelo por 3h. Após nova centrifugação, as bactérias foram ressuspensas em 4 mL CaCl₂ 0,05 M com glicerol 15% e divididas em alíquotas de 100 μ L. Cada tubo foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido e depois transferido para freezer a -80°C.

Transformações de bactérias competentes

Para as transformações, foram adicionados 10-100pg do DNA plasmidial em alíquotas de 100 μ L de bactérias competentes, seguido de incubação no gelo por 30 min. Após este período, a mistura foi incubada a 42°C durante exatamente 90 s e retornada ao gelo por 2 min. Em seguida, foram adicionados 800 μ L de meio LB e a mistura foi deixada sob agitação constante a 37°C durante 2 h. O volume total da mistura foi semeado em placas de meio LB sólido contendo antibiótico seletivo, ampicilina 125 μ g/mL (Sigma) ou kanamicina 30 μ g/mL (Sigma), de acordo com o plasmídio utilizado.

Clonagem de fragmentos amplificados em vetor pGEM-T

Os produtos de PCR, foram clonados, utilizando o vetor pGEM-T do “kit Vector System” (Promega). Uma alíquota da reação de PCR, previamente quantificada entre 200-500 ng foi adicionada a uma solução contendo Tampão de Ligação, fornecido pelo fabricante, e 50 ng do vetor pGEM-T. Em seguida, foi adicionado 1 µl de T4 DNA *Ligase* (3 U/µl) (Invitrogen) e o volume foi completado para 10 µl com água ultra pura. A reação de ligação foi deixada durante a noite à temperatura ambiente, e o produto foi utilizado para posterior transformação utilizando bactérias *E. coli* DH5α competentes. O produto da ligação foi semeado em placas LB contendo ampicilina, X-Gal (Promega) e IPTG (Invitrogen). Diversas colônias brancas, que possivelmente continham os plasmídios que receberam o inserto na correta orientação, foram inoculadas em meio LB para extração do DNA plasmidial em pequena escala.

Ligação do produto amplificado com o vetor de expressão

A ligação foi realizada a uma relação vetor / inserto de 1:3, ou 1:10, utilizando-se 100 ng do vetor e o equivalente equimolar de inserto a ser clonado. A reação foi realizada em um volume total de 10 µl, na presença de 1 U de T4 DNA *Ligase* (Invitrogen), do vetor e do inserto previamente preparados durante 16h a 14°C. O produto desta ligação foi utilizado para transformação de bactérias competentes.

Sub-clonagem de fragmentos amplificados em vetores de Expressão pIgSP e pET28a

Os novos plasmídios gerados, pGEM-T/M2-MAEBL, foram digeridos, respectivamente com *KpnI* e *EcoRI* ou *BamHI* e *EcoRI*. As bandas liberadas após tratamento enzimático foram purificadas. Os fragmentos purificados foram inseridos nos

vetores plgSP ou pET28a, previamente tratados com as enzimas *KpnI* e *EcoRI* ou *BamHI* e *EcoRI*, respectivamente. Com isto, permitiu-se a ligação do fragmento ao vetor, originando os plasmídios de expressão denominados plgSP/M2-MAEBL (eucariótico) e pET28a/M2-MAEBL (procariótico). Os produtos das ligação foram transformados em *E. coli* DH5 α (PlgSP) e *E. coli* BL-21 DE3 (pET28a). Estas foram semeadas em placas de meio LB sólido contendo antibiótico seletivo, ampicilina 125 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma) ou kanamicina 30 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma), de acordo com o plasmídio utilizado. Diversas colônias foram crescidas em LB para extração do DNA plasmidial em pequena escala. Em seguida foram realizadas análises de géis de agarose para confirmação das colônias que continham os plasmídios que receberam o inserto na correta orientação e seleção destas para extração de DNA plasmidial em larga escala (plgSP/M2-MAEBL) ou expressão de proteína recombinante (pET28a/M2-MAEBL).

Extração de DNA plasmidial – Lise alcalina

Em pequena escala

Uma colônia de bactéria transformada com o plasmídio desejado foi crescida a 37°C durante 16 h em 2 mL de meio LB contendo o antibiótico apropriado. As células foram recolhidas por centrifugação em tubos de microcentrífuga a 12.000 X g durante 5 min. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 100 μL da Solução I e deixadas em banho de gelo por 5 min. A seguir, foi acrescentado 200 μL da Solução II, e o conteúdo foi misturado por suave inversão dos tubos. Após 2 min em gelo, 150 μL da Solução III foram acrescentados e o conteúdo foi novamente misturado por inversão seguindo de incubação no gelo por 15 min. A suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 4 min e 400 μL do sobrenadante foi transferido para outro tubo. A este volume transferido, adicionou-se 1 volume de isopropanol gelado e o tubo foi mantido a -

20° C durante 30 min. O DNA plasmidial foi precipitado por centrifugação a 12.000 x g por 10 min, e ressuspendido em 50 µl de água ultra pura antes de ser conservado a -20° C.

Em larga escala

Uma colônia de bactéria transformada com o plasmídio desejado (pIgSP/M2-MAEBL) foi inoculada em 100 mL de meio SOC contendo o antibiótico apropriado a 37°C por 16h sob agitação constante (pré-inóculo). Após esse período, o 50 mL do volume total de células foi adicionado a 450 mL de meio TB contendo o antibiótico (inóculo) apropriado e incubado nas mesmas condições do pré-inóculo. As células foram recolhidas por centrifugação em garrafas para ultra-centrífuga (100mL) a 5.000 rpm durante 15 min a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. A cada garrafa foi adicionado 42 mL de Solução I contendo 50 mg de lisozima e as bactérias foram ressuspendidas e vortexadas até total solubilização. A seguir, 39 mL da Solução II foram adicionados em cada garrafa, e o conteúdo foi misturado por inversão suave do tubo. 30 mL da Solução III foram acrescentados, e o conteúdo foi mantido em gelo por 25 min, após ter sido misturado por inversão. A suspensão foi centrifugada a 8.000 rpm por 20 min a 4°C e a solução foi transferida para uma proveta, passando antes por uma filtração com gaze. A este conteúdo foi adicionado o mesmo volume de isopropanol e foi transferido para tubos de centrífuga de 50 mL e mantido no freezer durante 18h. Os tubos foram centrifugado a 12.500 rpm por 25 min a 4°C e sobrenadante foi descartado. O DNA foi ressuspendido em 1mL de água ultra pura por tubo, ao final, o volume de todos os tubos foi agrupado e foi adicionado o mesmo volume de LiCl 5M (Invitrogen) gelado seguido de homogeneização e foi realizada centrifugação a 5.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi gentilmente transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado com a adição de isopropanol (vol/vol) e o tubo foi mantido na geladeira durante a noite. No dia seguinte, foi realizada

centrifugação a 12.500rpm por 20 min a 4⁰C. O pellet foi ressuspendido em 1mL de água ultra pura e mantido por 15 min a 56⁰C. O DNA foi tratado com 0,5 µl de *Rnase-A* a 10µg/mL (Invitrogen) a 37°C por 15 min. Em seguida, foi adicionado 1vol/vol de polietilenoglicol - PEG 6000 (Sigma) 13% gelado e o tubo foi vortexado. Foi realizada centrifugação a 14.000 rpm por 25 min a TA. O sobrenadante foi descartado e o pellet (DNA) foi ressuspendido em água ultra pura.

Soluções utilizadas:

- Solução I: EDTA 10mM, Tris-HCl 25mM e glicose 50mM;
- Solução II: NaOH 0,2M e SDS 1%;
- Solução III: Acetato de Potássio 3M, Ácido Acético Glacial 5M;
- PEG 6000 (13%): 30 mL NaCl 5M, 13g PEG 6000, 100mL de água ultra pura

Purificação de DNA plasmidial em gradiente de CsCl

O material (DNA plgSP/M2-MAEBL) extraído em larga escala foi purificado para imunizações através de protocolo padrão de gradiente de CsCl (Sambrook&Russell, 2001). Para cada mililitro de solução de DNA foi utilizado 1g de CsCl sólido. Foram acrescidos 0,8 mL de Brometo de Etídio (10mg/mL) para cada 10mL de solução DNA/CsCl. Com o auxílio de uma seringa com agulha de grande calibre a mistura foi transferida para tubos próprios (*Quick seal* Beckman) que foram selados e centrifugados a 50.000 rpm por 16h a TA sem freio para desaceleração em centrífuga vertical Beckman (rotor V65). Foi coletada com auxílio de uma agulha a banda de coloração intermediária localizada no centro do gradiente (DNA circular viável) entre as bandas vermelho clara (DNA linear ou nicado) e o pellet de coloração intensa (complexos de RNA em Brometo

de etídio). Ao DNA coletado foram adicionados 12 volumes de Butanol-1-hidratado e o tubo foi vortexado e centrifugado a 1700rpm por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o pellet foi lavado 4 vezes em 1vol/vol de Butanol-1. O volume de DNA foi ajustado na proporção de 1,5mL de DNA para 2,5 mL de água ultra pura e a esta mistura foram adicionados 2,5 volumes de etanol e mantido a 4°C durante a noite. O DNA plasmidial foi precipitado por centrifugação a 3.000 rpm por 30 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi submetido a 3 lavagens com etanol 70% e centrifugação a 3.000 rpm a 4°C por 5 min. O DNA puro foi então ressuspendido em 1mL de água ultra pura, quantificado em espectrofotômetro em densidade óptica (D.O.) 260 nm e conservado a -20° C.

Sequenciamento de DNA

Todos os plasmídios gerados tiveram suas sequências analisadas utilizando o *kit ET Terminator* (Amershan Biosciences) e o sequenciador automático *MegaBace* (Amershan Biosciences), seguindo as condições utilizadas pela Rede Nacional de Sequenciamento, da qual um de nossos cooperadores é membro.

Expressão e purificação da proteína recombinante PyM2-MAEBL

Bactérias competentes *E. coli* BL-21 DE3 foram transformadas através de choque térmico com o plasmídeo pET28a/M2-MAEBL, como previamente descrito e as colônias transformadas foram selecionadas em placas de meio LB-ágar contendo 30 µg/ml de kanamicina. Em seguida, pré-inóculos contendo uma colônia de diferentes bactérias transformadas foram deixadas para crescer durante a noite em meio LB na presença de 30 µg / mL de kanamicina, a 37°C, sob agitação constante. O inóculo foi feito pela adição de 0,5 mL de cada pré-inóculo (ou 5%) em 10 ml de meio LB com 30 µg/ml de

kanamicina, e cultivado a 37°C, com agitação até atingir uma D.O.₆₀₀ entre 0,6 a 0,8 nm. Nesta faixa da curva de crescimento bacteriano foi feita a indução da expressão da proteína recombinante em diferentes concentrações de IPTG (Invitrogen) (0.01 a 1.0 mM), durante um período que variou de 4 a 15h, a uma temperatura entre 30 a 37°C e sob agitação constante, em todos os casos. Após a indução da proteína, a solução foi centrifugada 8.000 x g durante 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet congelado. No dia seguinte, o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de Tampão de Sonicação. Então, a solução foi sonicada para lise das células e centrifugada a 13.000 x g durante 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi separado do pellet. O pellet foi solubilizado em 100 mL de Solução A durante 1h no gelo através de repetidas passagens da solução por seringa com uma agulha de alto calibre. Este material foi aplicado a uma coluna com N2⁺ NTA-agarose de resina (Qiagen) previamente equilibrada com a mesma solução. Em seguida, a coluna foi lavada com 150 mL de Solução B. A eluição da proteína foi realizada em 40 mL da Solução C. A proteína eluída foi dialisada contra Tampão fosfato salino (PBS). Como controle negativo da expressão foi utilizada uma colônia transformada tratada nas mesmas condições, porém na ausência de IPTG. Os resultados da expressão, porção solúvel e insolúvel, nestas diferentes condições foram analisados em SDS-PAGE seguido de coloração com *Comassie Brilliant Blue G* e por *immunoblot*.

Soluções utilizadas:

- Tampão de Sonicação: NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 0,3M, PMSF 1mM, Lisozima 1mg/mL.
- Solução A (Tampão Denaturante de Lise/Ligação): Tris-HCl 100 mM, ureia 8 M, DTT 100 mM, pH 8.0 Tris-HCl 100 mM, ureia 8 M

- Solução B (Tampão Denaturante de Lavagem): Tris-HCl 100 mM, ureia 8 M, DTT 100 mM, pH 6.5
- Solução C (Tampão Denaturante de Eluição): Tris-HCl 100 mM, ureia 8 M, DTT 100 mM, pH 5.5.
- Tampão Fosfato Salino (PBS) [1X]: KH_2PO_4 6mM, Na_2HPO_4 30mM, pH 7,4.-

Gel de poliacrilamida – SDS-PAGE

As amostras de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 13% em Tampão de Corrida. Antes da aplicação, foi adicionado às amostras o Tampão de Amostra. Uma corrente para gerar uma voltagem de 140V entre os eletrodos da cuba foi aplicada ao gel durante 80 min. O gel foi corado com Solução Corante, durante 20 min e em seguida descorado utilizando Solução Descorante. Então, o mesmo foi observado e fotografado. Como referência para o tamanho dos fragmentos, foram utilizados marcadores de peso molecular conhecidos. O tamanho dos fragmentos de interesse foi estimado em função da migração dos padrões. Os fragmentos foram quantificados de acordo com a intensidade da banda e relacionando-a com a concentração dos padrões.

Soluções utilizadas:

- Tampão de Amostra (4x): 20% Glicerol, 4% SDS(10%), 60mM Tris-HCl pH 6,8; Azul de Bromofenol 0,03%, água ultra pura.
- Tampão de Corrida (10x): 0,2M Tris, 1,5M Glicina, 30mM SDS, água ultra pura.

- Preparação de Gel de Poliacrilamida (13%)

<i>Running Gel- 9 mL</i>	<i>Stacking Gel – 5 mL</i>
30% acrilamida	12% acrilamida
0,8% bis acrilamida	1,2 % bis acrilamida
Tris 0,75M , SDS 0,2%, pH 8,8	Tris 0,25M, SDS 0,2%, pH 6,8
Água deionizada	Água deionizada
Persulfato de amônio (PA) 10%	Persulfato de amônio (PA) 10%
15µl Temed (Invitrogen)	15µl Temed (Invitrogen)

- Preparação de Solução Corante e Descorante.

<i>Solução Corante – 500 mL</i>	<i>Solução Descorante - 500 mL</i>
62,5 mL Comassie Brilliant Blue G 1%	225 mL Etanol
250 mL ácido acético	50 mL Ácido Acético
137,5 mL Água deionizada	225 mL Água deionizada

Immunoblotting

As amostras foram transferidas do gel de acrilamida para uma membrana de nitrocelulose (Amershan) utilizando-se Tampão de Transferência durante 1 H a 100 V com auxílio do equipamento *Mini-Trans-Blot*™ (Bio-Rad). Em seguida, as membranas foram coradas em solução *Ponceau-S* durante 1 min, e a descoloração foi realizada em água destilada. As membranas foram incubadas em Solução de Bloqueio durante 2 H à TA. Após este período, foram adicionados anticorpos anti-His₆ (Sigma) ou o soro hiperimune de animais infectados com *P. yoelii*, diluídos em solução bloqueadora, e deixados durante

1 h à TA. Posteriormente, foram feitas três lavagens sucessivas com PBS-Tween 0.05%. Após a série de lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-*mouse* IgG conjugado a peroxidase (Sigma) e diluído 1:2000 em solução bloqueadora. Após 1h de incubação à TA, as membranas foram novamente lavadas com PBS-Tween 0.05%. Finalmente, o *immunoblot* foi revelado após incubação com solução como anticorpo secundário. O *immunoblot* foi revelado com solução reveladora e a imagem foi analisada.

Soluções utilizadas:

- Tampão de Transferência: 0,03g Trizma, 14,04g glicina, etanol 200mL, completar para 1L com água ultra pura.
- Solução Bloqueadora: PBS – 5% Leite desnatado (Molico), 2% albumina bovina (BSA), pH 7,2;
- PBS-Tween: PBS 1X, 0,05% Tween 20 (Sigma).
- Solução Reveladora: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.6 mg / mL de 3,3' Diaminobenzidine e 1 µL/ mL de H₂O₂ (30%) (Sigma).

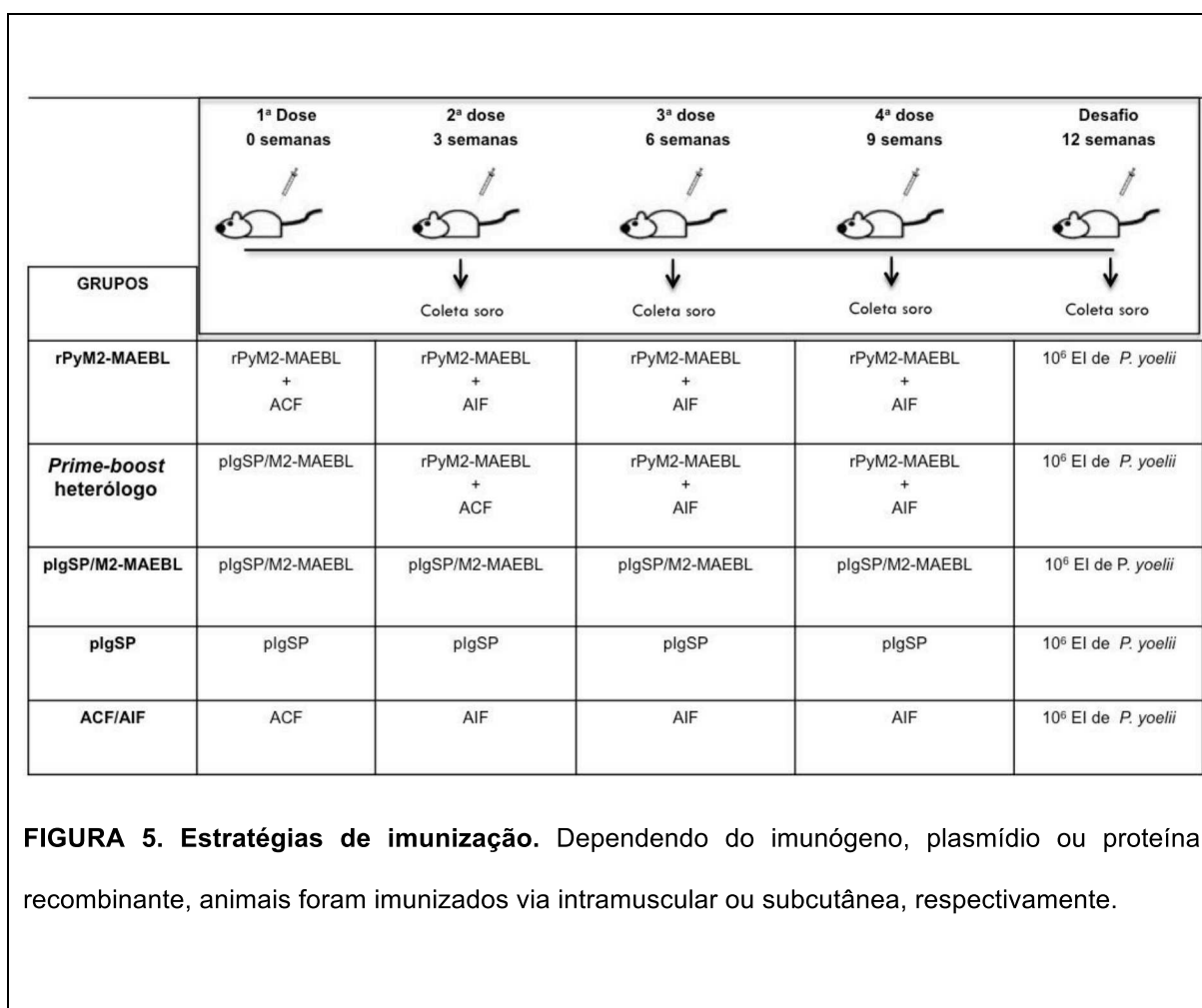
Obtenção de soro hiperimune contra formas sanguíneas de *P.yoelii*

Para obtenção do soro hiperimune, camundongos BALB/c de 6 a 7 semanas de vida foram infectados 7 vezes com intervalos de 30 dias, utilizando a cepa não letal *P. yoelii* 17X na dose de 10⁶ eritrócitos infectados (EIs).

Estratégias de imunização

Os regimes de imunização seguiram as estratégias detalhadas na figura 5. Camundongos C57BL/6 foram injetados, sub-cutaneamente (s.c.), quatro vezes a cada três semanas com 5 µg/animal/dose do recombinante PyM2-MAEBL emulsificado em

adjuvante completo de Freund (ACF) na primeira dose ou incompleto (AIF) nas doses posteriores. No grupo *prime-boost* heterólogo (1 DNA + 3 proteína) os animais receberam uma dose intramuscular (i.m.) de 100 µg de DNA plasmidial (pIgSP/M2-MAEBL) seguida de três doses de 5 µg/animal do recombinante PyM2-MAEBL em ACF (primeira dose) ou AIF (doses posteriores). Como controle, grupos de animais foram injetados apenas com adjuvante de Freund, com DNA plasmidial (pIgSP/M2-MAEBL) ou apenas com o vetor pIgSP. O soro dos animais foi coletado imediatamente antes de cada dose subsequente, e 15 dias após a última dose. Os animais foram desafiados 30 dias após a última imunização.



Determinação do título de anticorpos no soro dos animais imunizados por ELISA

A detecção de anticorpos séricos foi feita através de ELISA usando placas de polivinil de 96 poços (Costar) sensibilizadas com 50 µL por poço do recombinante PyM2-MAEBL diluído em tampão carbonato 0,05 M (pH 9.6) para uma concentração final 2 µg / mL. Após incubação durante a noite à T.A. e, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS - Tween 0,05%, e incubadas por 2 h a 37°C com 200 µL / poço de solução bloqueadora. Os soros dos animais imunizados foram diluídos em Solução Bloqueadora a partir de 1:100 e deixados durante 1 H à TA. Depois de cinco lavagens com PBS-Tween 0,05%, foi adicionado 50 µL / poço de anticorpo goat anti-mouse IgG conjugado a peroxidase (KPL) diluído 1:4000 em Solução Bloqueadora. Após nova incubação de 1 H à TA, as placas foram lavadas 5 vezes em PBS-Tween 0,05%, e foi adicionado 100 µL / poço do substrato enzimático ortofenilenodiamina - OPD (1.0 mg / mL) diluído em tampão fosfato-citrato 0,15M. Após 15 min de incubação a reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 4N. A D.O foi lida no comprimento de 492 nm. A detecção de subclasses de IgG foi realizada como mencionado, exceto que foram utilizados anticorpos secundários específicos para IgG1, IgG2b e IgG2c (Southern Technologies) de camundongos diluídos 1:2.000. Os resultados foram expressos em log como a média ± DVP (desvio padrão).

Soluções utilizadas:

- Solução bloqueadora: PBS 1X, 5%Leite desnatado (Molico), 2% albumina (BSA).
- Substrato Enzimático: 1 tablete de ortofenilenodiamina (OPD) (Sigma) em 20 mL de Tampão Fosfato-Citrato 0,15M.

Concentração de esquizontes de *P. yoelii* YM

2-3 mL de sangue de animais infectados com *P. yoelii* foram coletados em tubos de citrato sangrados no pico da parasitemia (entre os dias 05 e 06 pós-infecção). O sangue total foi centrifugado a 500 x g durante 5 minutos para separar o plasma. Após remoção do plasma, os eritrócitos foram lavados em meio McCoy 5A (Sigma) e ajustados para 50% de hematócrito. Em seguida, a solução de sangue foi submetida a MidiMACS LS (Miltenyi Biotec), protocolo de concentração do parasita em estágios maduros como anteriormente descrito (Trang et al., 2004). As células não retidas na coluna foram coletadas e desprezadas. Ao final, a coluna foi removida do imã e colocada em um tubo de 15mL. Os parasitas retidos foram eluídos em 3mL de meio McCoy 5A e removidos com o auxílio de um êmbolo fornecido no *kit*. Em seguida, foi realizada centrifugação a 500 x g e um esfregaço de sangue foi feito para certificar a concentração de parasitas e eliminação de leucócitos. Os parasitas concentrados foram utilizados em variados ensaios.

Confecção de lâminas para Imunofluorescência indireta

Para visualizar se anticorpos anti-PyM2-MAEBL seriam capazes de reconhecer o antígeno nativo diretamente no parasita, foram realizados ensaios de imunofluorescência (IFA) em esquizontes maduros de *Plasmodium* murino (*P. yoelii*) e humano (*P. vivax* e *P. falciparum*). Com este objetivo, o concentrado de esquizontes de *Plasmodium* obtido como detalhado para cada espécie testada, foi ressuspendido em hematócrito 70% em meio RPMI (Sigma) e 3ul desta suspensão foi utilizada na confecção de cada lâmina de esfregaço. As lâminas foram estocadas em temperatura ambiente na presença de sílica e em recipiente vedado.

Ensaio de imunofluorescência indireta (IFA)

Lâminas preparadas contendo esquizontes maduros foram imersas em acetona (Merck) gelada por 20 min a 4°C para fixação. Em seguida, após secagem à temperatura ambiente, poços para as diferentes condições a serem testadas foram criados com auxílio de caneta hidrofóbica Dakopen (Dako). Foi realizado bloqueio através da incubação com 3% BSA/PBS durante 30 min a 37°C. Posteriormente, foram adicionados *pool* do soro dos animais imunizados diluídos 1:50 em 3% BSA/PBS e incubados por 1h a 37°C. As lâminas foram lavadas 3 vezes em imersão com PBS 1x durante 2 min sob agitação para remover o excesso de anticorpo primário. Foi realizada incubação durante 1h com Alexa-Fluor 568 *goat anti-mouse IgG* (Invitrogen) na diluição 1:1000 em 3% BSA/PBS. As lâminas foram lavadas 3 vezes em imersão com PBS 1x durante 2 min sob agitação para remover o excesso de anticorpo secundário. Em seguida foi adicionado DAPI (Invitrogen) diluído 1:200 em água ultra pura e incubado por 10 min em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas 1 vez em imersão com PBS 1x durante 1 min. Foi adicionado às lâminas 1 gota de *Fluorosave* (Calibiotechem) e estas foram cobertas com lamínulas e incubadas overnight a 4°C. Lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Nikon TS100-F).

Determinação dos níveis de proteção induzidos nos animais imunizados

Os níveis de imunoproteção contra formas sanguíneas de *P. yoelii* foram avaliados determinando a sobrevivência e a parasitemia. Para medir a parasitemia foram feitos esfregaços corados com auxílio do Kit Panótico Rápido (Laborclin) a partir de uma gota de sangue da cauda dos animais infectados i.p. com 10⁶ Els de cepa letal de *P. yoelii*. A porcentagem de parasitemia foi determinada calculando-se o número de Els em 1.000 células.

Participação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

Grupos de 15 camundongos C57BL/6 foram submetidos aos regimes de imunização detalhados na figura 5. Três semanas após a quarta dose, 5 animais foram injetados com 0,5mg/animal de anticorpos monoclonais (BioXcell) anti-CD4⁺ ou anti-CD8⁺ para depleção destas populações de linfócitos. Os outros cinco animais imunizados foram injetados com IgG controle (Sigma) na mesma concentração dos demais anticorpos. No dia seguinte a depleção, os animais foram infectados i.p. com 10⁶ Els de *P. yoelii* YM (cepa letal) e foram avaliadas a sobrevivência e a parasitemia dos animais em esfregaços corados com *Kit* Panótico Rápido (Laborclin).

Ensaio de fagocitose

Camundongos BALB/c foram injetados i.p. com tioglicolato de sódio 3% (Merck) para estimulação da migração dos macrófagos para região peritoneal. Depois de 24h, os macrófagos foram obtidos através de lavagem peritoneal com 5mL de PBS gelado. As células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 10 min a 4^oC. As células foram ressuspendidas a uma concentração final de 4 x 10⁶ macrófagos/mL em RPMI (Sigma) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Nutricell). Foram adicionados 200µl (4 x 10⁵ macrófagos) por poço a lâminas de 8 poços (LabTek) e as lâminas foram incubadas a 37^oC com 5% CO₂ para os macrófagos pudessem aderir. Durante este tempo, animais infectados com *P. yoelii* YM foram sangrados e enriquecidos em colunas MACS LS como previamente descrito. Em seguida, o concentrado de formas maduras do parasita foi incubado com 0,1% saponina (Merck) para permeabilizar a membrana dos Els. Estes EI foram lavados 3 vezes em meio RPMI. Após lavagem, Els (4 x 10⁶ por poço) foram incubados na presença de soro dos animais imunizados na diluição 1:50 durante 1h. Após

opsonização, a solução de Els e soro foi adicionada aos macrófagos aderidos e incubada por 1h a 37°C com 5% CO₂. Então, as lâminas foram lavadas 5 vezes em PBS para remoção de macrófagos não aderentes e Els não ingeridos. As lâminas foram coradas com auxílio do Kit Panótico Rápido (Laborclin). O número de Els ingeridos por 500 macrófagos totais foi contado por microscopia para cada amostra individual.

Ensaio de inibição da invasão de formas sanguíneas de *P. vivax* e *P. falciparum*.

Estes ensaios foram realizados em cooperação com o Dr. Bruce Russell e o Dr. Laurent Renia (Singapore Immunology Network, Singapura). Isolados frescos de campo de *P. vivax* e *P. falciparum* utilizados nestes ensaios foram provenientes de amostras de sangue de pacientes infectados em Mae Sot, na região noroeste da Tailândia.

Preparação das células alvo – Enriquecimento de reticulócitos:

20 mL de sangue de cordão umbilical foram coletados em tubo de heparina imediatamente após o parto. O grupo sanguíneo foi determinado usando um *Kit* ABO padrão (EBRAN). Após remoção do plasma, as células foram lavadas em meio McCoy 5A (Sigma) e ajustadas a 50% hematócrito usando meio McCoy 5A. Leucócitos e plaquetas foram depletadas através de duas passagens em coluna de filtração CF11 (Whatman), de acordo com (Sriprawat et al., 2009). Células vermelhas do cordão umbilical foram novamente ajustadas para 50% hematócrito usando meio McCoy 5A (Sigma). Esta solução de sangue foi dividida em duas porções e cuidadosamente sobreposta em tubos contendo 6mL de Percoll (GE Healthcare) isotônico 70% e centrifugado por 15 min a 1200 x g. A banda de reticulócitos concentrados localizada na interface do Percoll foi cuidadosamente removida e lavada duas vezes em meio McCoy 5A (Sigma) (Russell et al., 2011). O preparado lavado e concentrado de reticulócitos foi mantido a 4°C em meio

McCoy 5A (Sigma) em hematócrito menor que 20%. A porcentagem de reticulócitos foi contada em esfregaços corados com *Accustain Reticulocytes Stain* (Sigma). As células alvo foram usadas durante um mês após a preparação.

Soluções utilizadas:

- Percoll Isotônico – usado para preparar as concentrações de uso: 9 partes de Percoll (GE - Healthcare) e 1 parte de PBS 10X.

Concentração de esquizontes – Gradiente de Percoll

Isolados frescos foram coletados apenas de pacientes que não receberam tratamento antimalárico prévio e que apresentaram parasitemia microscópica maior que 1 parasita por 1000 hemácias. 5mL de sangue de pacientes infectados com *P. vivax* ou *P. falciparum* foram coletados em tubos de heparina. Estes isolados chegaram ao laboratório em até 5h após a coleta. Apenas amostras contendo 75% dos parasitas em estágio de trofozoíta maduro (aproximadamente 20h após-invasão *in vivo*) foram utilizadas. Leucócitos e plaquetas foram removidos utilizando coluna CF11 (Sripawat et al., 2009) e o filtrado foi lavado duas vezes em meio McCoy 5A (Sigma). O filtrado de hemácias infectadas (aproximadamente 1,5 mL de pellet de hemácias infectadas por isolado) foi cultivado ao estágio de esquizonte em 12mL de meio McCoy 5A (Sigma) suplementado com 2,4g/litro de glicose, 40mg/mL de Gentamicina Sulfatada e 20% soro humano AB (inativado) em 5% O₂ a 37.5°C por 22h.

A solução de sangue/meio foi centrifugada e ajustada a 50% hematócrito antes da adição de 3mL de 0,125% tripsina (Invitrogen) em PBS e incubação por 15min a 37°C. Foi realizada lavagem meio McCoy 5A (Sigma) e adicionado 1mL de soro AB ao pellet de hemácias infectadas, que foi homogeneizado e incubado por 5min a temperatura

ambiente. Meio McCoy 5A (Sigma) foi adicionado ao pellet de hemácias infectadas tripsinizadas para atingir o volume de 5mL, o qual foi sobreposto em Percoll (GE Healthcare) Isotônico 45% no caso de isolados de *P. vivax* (Carvalho et al., 2010) e 70% para amostras de *P. falciparum* (Moll et al., 2008). Foi realizada centrifugação por 15 min a 1200 X g. A banda correspondendo ao concentrado de esquizontes localizada na interface do Percoll foi cuidadosamente removida e lavada duas vezes em meio McCoy 5A (Sigma).

Ensaio de inibição da invasão em *P. vivax*

De acordo com Russell, et. al. 2011, a preparação do concentrado de esquizontes foi misturada com as células alvo (sangue de cordão umbilical) na proporção 1:6. A solução foi diluída em 2% hematócrito usando meio McCoy 5A (Sigma) 20% soro humano AB (inativado) e cultivado em microplacas num volume de 200 µl 5% O₂ a 37.5°C por 24h-30h, dependendo da maturação do parasita. O potencial inibitório de anticorpos anti-PyM2-MAEBL, foram testados adicionando *pool* da 4^a dose do soro de animais imunizados com a proteína rPyM2-MAEBL apenas ou em sistema *prime-boost* heterólogo na diluição 1:50 a mistura final do ensaio de invasão. Como controle foi utilizado *pool* do soro da 4^a dose de animais do grupo ACF/AIF. Como controle positivo da inibição foi usado soro policlonal anti-*P. vivax* Duffy Binding Protein (PvDBP) IgG (Fraser et al., 1997). No final do ensaio foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo de cada poço coradas com Giemsa (Sigma). O número de anéis/trofozoítas em 1000 células foi determinado por análise microscópica.

Ensaio de inibição da invasão em *P. falciparum*

A preparação do concentrado de esquizontes foi misturada com as células alvo (hemácias/normócitos não infectados) na proporção 1:12. A solução foi diluída em 2% hematócrito usando meio McCoy 5A 10% soro humano AB (inativado) e cultivado em microplacas num volume de 200 µl, 5% O₂ a 37.5°C por 12h. O potencial inibitório de anticorpos anti-PyM2-MAEBL, foram testados adicionando *pool* da 4^a dose do soro de animais imunizados com a proteína rPyM2-MAEBL apenas ou em sistema *prime-boost* heterólogo na diluição 1:50 a mistura final do ensaio de invasão. Como controle foi utilizado *pool* do soro da 4^a dose de animais do grupo ACF/AIF. Como controle positivo de inibição foi utilizado E64 (Sigma) 100µM para assegurar a não ruptura dos esquizontes. No final do ensaio foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo de cada poço coradas com Giemsa (Sigma). O número de anéis/trofozoítas em 1000 células foi determinado por análise microscópica.

Padronização e ensaios ex-vivo de invasão de formas sanguíneas de *P. yoelii* YM

Preparação das células alvo – Enriquecimento de reticulócitos

A fim de obter eritrócitos enriquecidos em população de reticulócitos para utilização em ensaios de invasão, camundongos BALB/c foram sangrados durante sete dias para induzir a anemia, e, assim, aumentar a produção de reticulócitos pela medula óssea. Cerca de 150 µl de sangue foram coletados diariamente pelo plexo orbital. Após, o sangue total rico em reticulócitos (35-50%) foi coletado em tubo de citrato e lavado 3 vezes em McCoy 5A (Sigma). Em seguida, o sangue foi ressuspenso em McCoy 5A, para 50% hematócrito e a suspensão passada por duas colunas CF11 para a remoção de leucócitos (Sripawat et al., 2009). O obtido da coluna foi lavado três vezes em meio

McCoy 5A, e utilizado nos ensaios de invasão de *P. yoelii*. A porcentagem de reticulócitos foi contada em esfregaços corados com *Accustain Reticulocytes Stain* (Sigma).

Enriquecimento e amadurecimento de *P. yoelii*

Animais infectados com *P.yoelii* YM foram sangrados no pico da parasitemia (70-90%) e o sangue foi lavado 3 vezes em meio McCoy 5A (Sigma). Em seguida, o sangue coletado foi submetido ao protocolo de concentração de parasitas através das colunas MidiMACS LS previamente descrito. Uma lâmina de esfregaço sanguíneo foi confeccionada após o procedimento para certificar a concentração dos parasitas e eliminação dos leucócitos. O pellet de trofozoítas maduros foi ressuspensionado em 5mL de meio McCoy 5A (Sigma) suplementado com 2,4g/litro de glicose, 40mg/mL de Gentamicina Sulfatada e 20% soro humano AB (inativado e adsorvido em hemácias murinas) e incubado a 5% CO₂ a 37°C por 3-6h para amadurecimento. Em intervalos regulares foram confeccionadas lâminas para acompanhar o amadurecimento dos parasitas até a maioria se encontrar em estágio de esquizontes.

Ensaio de invasão

Após o amadurecimento, esquizontes de *P. y oelii* YM, o concentrado de esquizontes foi misturado com as células alvo (sangue rico em reticulócitos) na proporção de 1:20. A solução foi diluída em 4% hematócrito usando meio McCoy 5A suplementado com 2,4g/litro de glicose, 40mg/mL de Gentamicina Sulfatada e 20% soro humano AB (inativado e adsorvido em hemácias murinas) e cultivado microplacas num volume de 100 µl a 37°C durante 20-24h em “*candle jar*” de acordo com protocolo previamente descrito (Trager&Jensen, 2005). O potencial inibitório de anticorpos anti-PyM2-MAEBL, foram testados adicionando *pool* da 4^a dose do soro de animais imunizados com a proteína

rPyM2-MAEBL apenas ou em sistema *prime-boost* heterólogo na diluição 1:50 a mistura final do ensaio de invasão. Como controle foi utilizado *pool* do soro da 4^a dose de animais do grupo ACF/AIF. Como controle positivo de inibição foi utilizado E64 (Sigma) 100µM para assegurar a não ruptura dos esquizontes. No final do ensaio foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo de cada poço coradas auxílio do Kit Panótico Rápido (Laborclin). O número de anéis/trofozoítas em 1000 células foi determinado por análise microscópica.

Análise estatística

A análises desta tese foram efetuadas com auxílio do *software* PrismTM versão 5.0. Os índices de sobrevivência dos animais imunizados após desafio letal foi determinado por *Log Rank-test*. Comparações entre 2 grupos de dados não-paramétricos foram analisados por *Mann-Whitney U test*. Para análises não paramétricas entre mais de 2 grupos de dados foi utilizado *Kruskal-Wallis Test – Dunn's Post Test*. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amplificação da sequência de nucleotídeos correspondente ao domínio M2

Foram realizadas amplificações por PCR com oligonucleotídeos específicos, com o intuito de construir plasmídios de expressão em células eucarióticas ou procarióticas, correspondendo a região do domínio M2 para serem utilizados em imunizações ativas de DNA nu, ou para a produção de proteína recombinante, respectivamente. Conforme mostrado na figura 6, foram realizadas reações de PCR na presença de DNA genômico de *P. yoelii*, e oligonucleotídeos contendo sítios de restrição 5'-*KpnI* / *EcoRI*-3' ou 5'-*BamHI* / *EcoRI*-3'; respectivamente para clonagem nos vetores plgSP ou pET28a. Os produtos de 1200 pares de bases (pb) amplificados (figura 6, coluna 2 e 5) foram utilizados posteriormente em clonagens no vetor pGEM-T e, subsequente subclonagem nos vetores plgSP e pET28a. Este procedimento permitiu a inserção do produto na mesma fase de leitura da sequência sinal presente no vetor plgSP ou na mesma fase de leitura da cauda de histidina do vetor pET28a. Como controle de especificidade do produto amplificado, foram realizadas reações de PCR na ausência do DNA molde ou na presença de DNA genômico heterólogo de *P. falciparum*. Como é mostrado na figura 6 (coluna 4), não fomos capazes de observar amplificação na ausência de material nuclear; entretanto na presença de DNA extraído da cepa 3D7 de *P. falciparum* foi observada ocasionalmente (coluna 3 e 6) uma fraca banda também de 1.2 Kb. A razão para a presença ocasional de uma banda de mesmo tamanho observada após amplificação a partir de DNA genômico de *P. yoelii* ou de *P. falciparum* reside na alta similaridade entre os genes MAEBL destas duas espécies de parasita (Ghai et al., 2002).

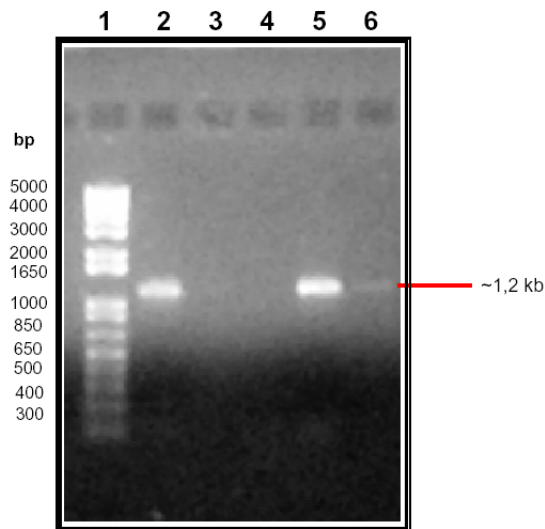


FIGURA 6 - Produto de amplificação por PCR observado em gel de agarose 1% corado por SYBR-SAFE: Reações de PCR foram conduzidas na presença de DNA genômico de formas sanguíneas de *P. yoelii*, e oligonucleotídeos contendo sítios de restrição *KpnI* e *EcoRI* (Coluna 2) ou *BamHI* e *EcoRI* (Coluna 5); respectivamente para clonagem no vetor pIgSP ou pET28a. Como controle negativo as reações foram realizadas na ausência de DNA molde (Coluna 4) ou na presença de DNA genômico de *P. falciparum* cepa 3D7 (Colunas 3 e 6). Coluna 1, marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) em pares de bases (pb).

Clonagem dos fragmentos amplificados em vetores de expressão

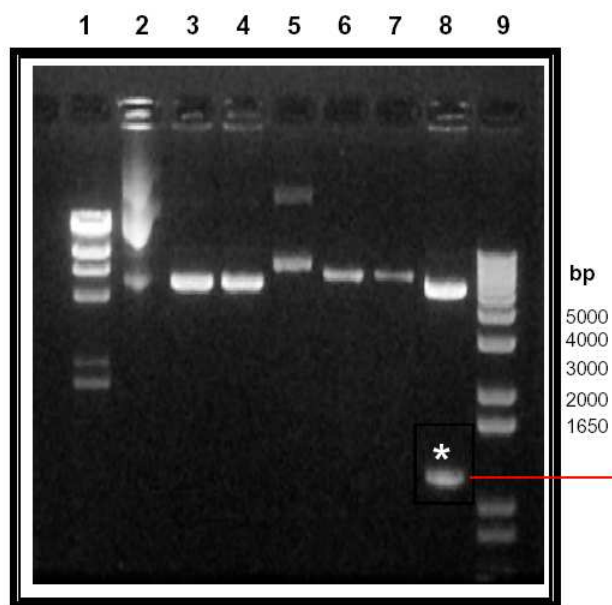
Os produtos de PCR foram clonados diretamente no vetor pGEM-T de acordo com as normas do fabricante. As colônias geradas, após clonagem no vetor pGEM-T resultaram em clones, dos quais um fragmento de 1200 pb foi removido após digestão enzimática com *KpnI-EcoRI* ou *BamHI-EcoRI*. Após esta digestão enzimática foi observado um fragmento de 1200 pb (dados não mostrados), correspondendo ao produto de PCR anteriormente amplificado (figura 7, coluna 2) demonstrando a funcionalidade destes sítios de restrição no fragmento amplificado. O produto da dupla digestão do

plasmídio pGEM-T/M2-MAEBL com as enzimas *KpnI-EcoRI* foi excisado, e purificado do gel de agarose com auxílio do “*kit GeneClean II*” de acordo o protocolo descrito anteriormente.

A fim de gerar o plasmídio de expressão em células eucarióticas contendo a sequência gênica correspondente ao domínio M2, utilizado em imunizações ativas com DNA nu, o vetor pIgSP foi preparado por tratamento simultâneo com as enzimas *KpnI-EcoRI*, para determinação da funcionalidade dos sítios de restrição do vetor pIgSP que receberão o inserto de interesse (figura 7, colunas 3 e 4). Paralelamente, o plasmídio pGEM-T/M2-MAEBL tratado simultaneamente com as enzimas de restrição *KpnI-EcoRI* e purificado foi inserido no vetor pIgSP previamente tratado com as mesmas enzimas. Os clones gerados após a ligação do inserto, correspondendo a sequência de nucleotídeos do domínio M2, foram digeridos simultaneamente com as enzimas *KpnI-EcoRI* e um fragmento de 1200 pb foi liberado (figura 7, coluna 8). Comprovando assim, a geração do plasmídio denominado pIgSP/M2-MAEBL para futuras imunizações intramusculares de DNA nu.

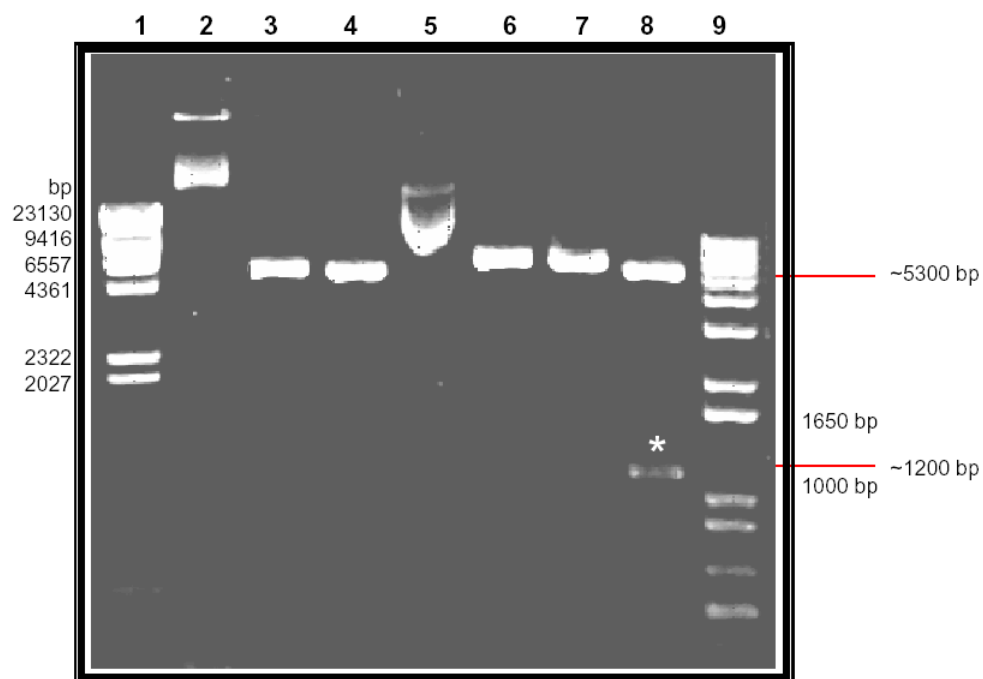
Paralelamente, e com o intuito de gerar um plasmídio de expressão em células procarióticas para produção de uma proteína recombinante para ser utilizada em imunizações, a sequência gênica correspondente ao domínio M2 foi inserida no vetor de expressão pET28a. Sendo assim, o fragmento de 1200 pb amplificado com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição para as enzimas *BamHI-EcoRI*, após clonagem no vetor pGEM-T, foi removido por meio de digestão simultânea com *BamHI-EcoRI* e inserido no vetor de expressão pET28a. A fim de determinar no vetor alvo a presença dos sítios de restrição adicionados no fragmento amplificado por PCR, o plasmídio pET28a foi submetido a digestões enzimáticas simples ou conjugadas com *BamHI* e *EcoRI* (figura 8 , colunas 3 e 4). Em seguida, bactérias competentes foram

transformadas com o produto da ligação do fragmento amplificado de 1200 pb e do vetor pET28a previamente digerido com *Bam*HI e *Eco*RI, e diferentes clones bacterianos foram analisados para determinar a presença do inserto correspondendo ao domínio M2. Análises com enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI mostraram que o novo plasmídio gerado possuía tamanho superior ao vetor (figura 8, colunas 4 e 6), que após dupla digestão enzimática um fragmento de 1200 pb foi liberado (figura 8, coluna 8, asterisco); demonstrado a geração de um novo plasmídio denominado pET28a/M2-MAEBL possuindo a sequência de nucleotídeos correspondente ao domínio M2. O esquema de geração dos plasmídios plgSP/M2-MAEBL e pET28a/M2-MAEBL estão resumidos na figura 9.



- 1- λ HIND III
- 2- pIgSP não digerido
- 3- pIgSP + *KpnI*
- 4- pIgSP + *EcoRI*
- 5- pIgSPM2 não digerido
- 6- pIgSPM2 + *EcoRI*
- 7- pIgSPM2 + *KpnI*
- 8- pIgSPM2 + *KpnI* + *EcoRI*
- 9- 1Kb DNA Ladder

FIGURA 7. Clonagem da sequência gênica correspondente ao domínio M2 em vetor de expressão eucariótica, pIgSP. Após amplificação o fragmento M2, contendo os sítios *KpnI* e *EcoRI* foi inserido no vetor pGEM-T seguido da purificação do fragmento de 1.200 pb (Figura 6). A banda purificada foi introduzida no vetor pIgSP e um clone contendo o fragmento de 1.200 pb foi selecionado (Coluna 5) após comprovação por digestão enzimática (Colunas 6, 7 e 8; asterisco). A confirmação da presença dos sítios de restrição iniciais também foi realizada por meio de digestão enzimática (Colunas 3 e 4).



- 1- λ HIND III
- 2- pET28a não digerido
- 3- pET28a + *EcoRI*
- 4- pET28a + *BamHI*
- 5- pET28aM2 + não digerido
- 6- pET28aM2 + *EcoRI*
- 7- pET28aM2 + *BamHI*
- 8- pET28aM2 + *EcoRI* + *BamHI*
- 9- 1Kb DNA Ladder

FIGURA 8: Clonagem da sequência gênica correspondente ao domínio M2 em vetor de expressão procarionte, pET28a. Após amplificação o fragmento M2, contendo os sítios *BamHI* e *EcoRI* foi inserido no vetor pGEM-T seguido da purificação do fragmento de 1.200 pb (Figura 6). A banda purificada foi introduzida no vetor pET28a e um clone contendo o fragmento de 1.200 pb foi selecionado (Coluna 5). Após comprovação por digestão enzimática (Colunas 6, 7 e 8; asterisco). A confirmação da presença dos sítios de restrição iniciais também foi realizada por meio de digestão enzimática (Colunas 3 e 4).

Expressão e purificação da proteína recombinante PyM2-MAEBL

A expressão do recombinante M2-MAEBL só foi obtida após inúmeras tentativas (apenas as 5 últimas são representadas) variando-se a concentração de IPTG, o tempo de indução e a temperatura de incubação (Tabela 1). Na quinta tentativa, vinte colônias de bactérias transformadas foram induzidas como descrito em Materiais e Métodos. No entanto, observamos expressão por apenas duas destas colônias. As duas colônias de bactérias que resultaram em expressão do antígeno foram devidamente congeladas.

Tabela 1. Análise comparativa das condições de indução da expressão da proteína recombinante rM2-MAEBL.

Tentativa	IPTG	Temperatura	Indução (Horas)	Agitação	Expressão
Primeira	0,10 mM	30°C	4	Sim	Não
Segunda	0,10 mM	30°C	16	Sim	Não
Terceira	0,01 mM	37°C	4	Sim	Não
Quarta	1,00 mM	37°C	4	Sim	Não
Quinta	0,10 mM	37°C	4	Sim	Sim

Para a expressão, a indução foi realizada utilizando-se 10, 75 e 100 mL de meio e a verificação da expressão de um recombinante de aproximadamente 45 kDa foi observada no pellet e no sobrenadante de cultura. Conforme pode ser observado na figura 10, a produção do recombinante é dependente do volume do meio, é insolúvel, e detectada apenas no lisado do pellet. Entretanto, devido à possibilidade de que a proteína recombinante não tivesse sido solubilizada no tampão denaturante e estivesse em suspensão; o pellet foi centrifugado para a obtenção de um segundo pellet e

sobrenadante. Este segundo pellet foi novamente ressuspensionado em tampão denaturante, para a formação de uma suspensão contendo o recombinante. O novo pellet e sobrenadante foram analisados em SDS-PAGE e *immunoblot*. De acordo com a figura 11, a re-solubilização do pellet inicial resultou num produto solúvel de 45 kDa detectado no novo pellet e, sobretudo, no novo sobrenadante, e de maneira dependente do volume de meio utilizado. Sendo assim, o recombinante PyM2-MAEBL foi produzido num volume final de 150 mL, em diferentes frascos totalizando 2 litros de meio de cultura de acordo com o protocolo descrito. Além disto, devido à insolubilidade do produto formado, foram realizadas etapas adicionais, inclusive a passagem da solução em seringa, acarretando num procedimento de 2-3 horas de duração. A purificação do recombinante, a partir do pellet denaturado, foi realizada de acordo o protocolo previamente mencionado nesta tese baseado no fato de que o grupo imidazólico da histidina se liga fortemente ao níquel e à medida que baixa-se o pH, a ligação é menos forte. Em pH ácido a histidina se desliga do níquel. A proteína purificada foi dialisada contra Ureia 2M em PBS e concentrada usando coluna Centriprep YM-10 (Millipore) (figura 12).

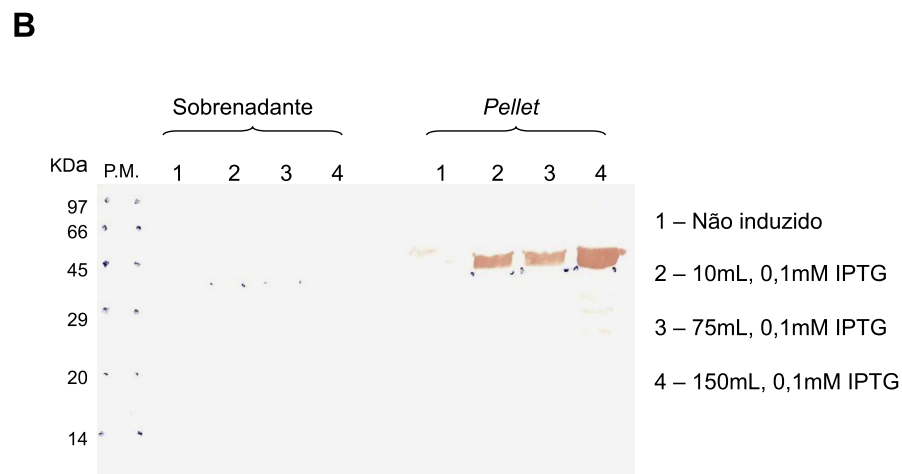
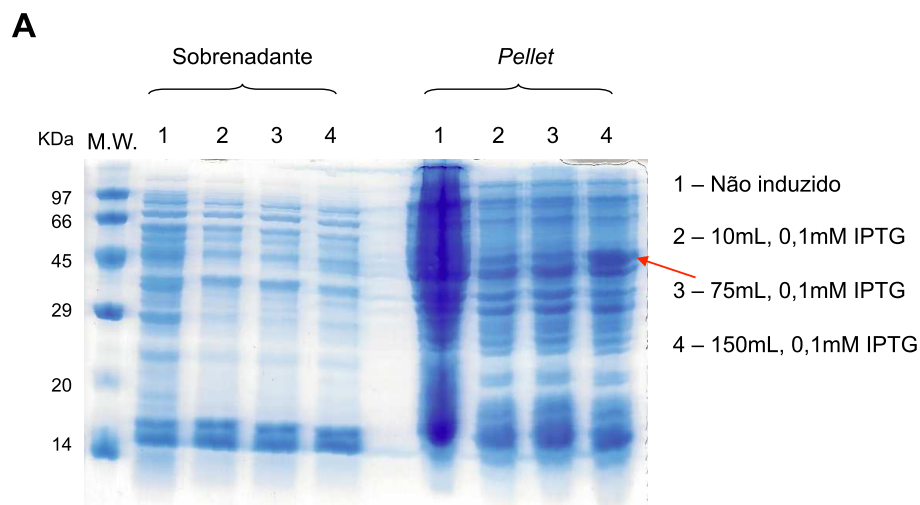


FIGURA 10. Uma colônia de *E. coli* BL-21 DE3 transformada com o plasmídeo pET28a/M2-MAEBL foi cultivada em 10, 75 ou 150mL de meio LB até $D.O_{600nm} = 0,6-0,8$ e a expressão da proteína recombinante foi induzida com 0,1mM de IPTG. 10mL de cada cultura foram centrifugados, ressuspensos e sonificados. Após a sonicação o material foi centrifugado e o sobrenadante foi separado do *pellet*, que foi ressuspendido em ureia 8M. 5 μ L de sobrenadante ou de *pellet* foram submetidos a SDS-PAGE em condições denaturantes (2-mercaptoetanol) e o gel foi corado com Comassie blue (**A**) ou transferidos para uma membrana de celulose seguida de *immunoblot* realizado com anti-His₆ 1:1500 e anti-mouse IgG conjugado a peroxidase (**B**).

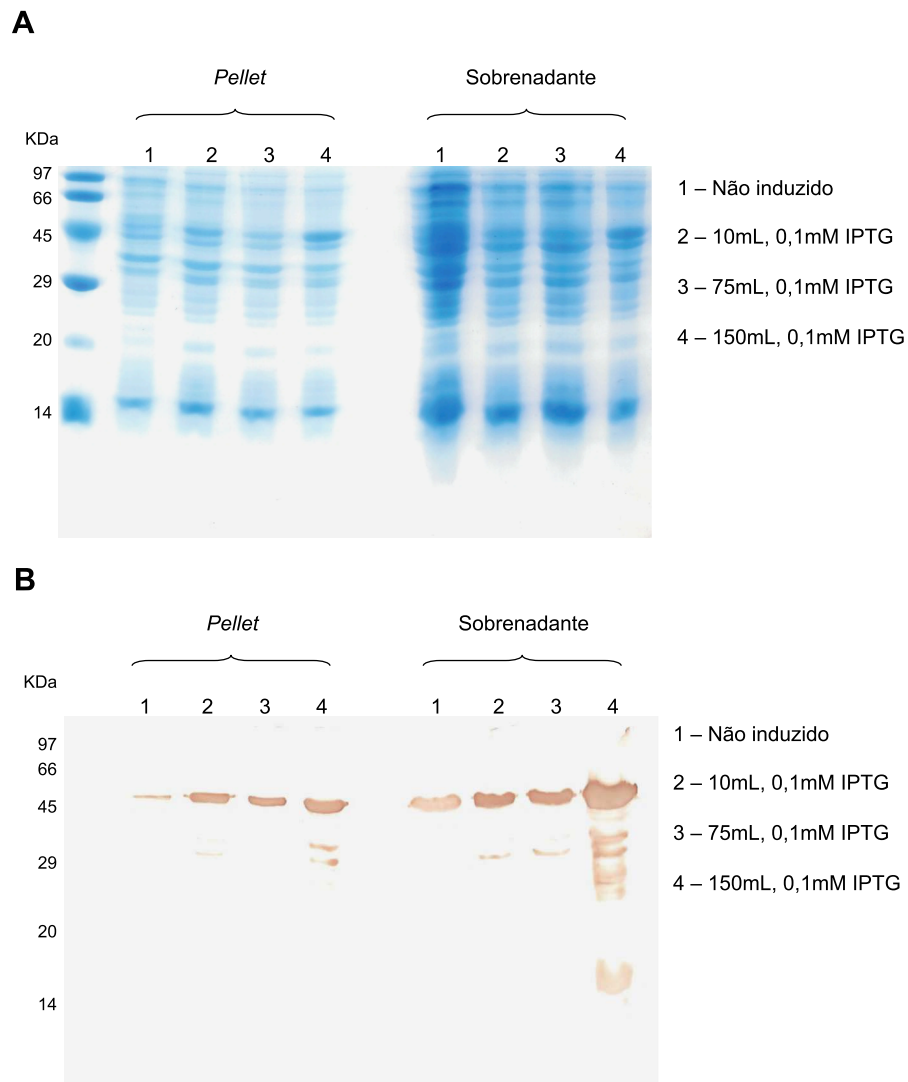


FIGURA 11. Uma colônia de bactéria BL-21 DE3 transformada com o plasmídeo pET28a/M2-MAEBL foi cultivada em 10, 75 ou 150mL de meio LB até $D.O_{600nm} = 0,6-0,8$ e a expressão da proteína recombinante foi induzida com 0,1mM de IPTG. 10mL de cada cultura foram centrifugados, ressuspensos e sonicados. Após a sonicação o material foi centrifugado e o sobrenadante foram separados do pellet, que foi ressuspendido em ureia 8M e centrifugado novamente. O pellet foi separado do sobrenadante e ressuspendido em ureia 8M. O sobrenadante e o pellet da centrifugação pós ureia foram submetidos a SDS-PAGE **(A)** e transferidos para uma membrana de celulose. **(B)** O *immunoblot* foi realizado com anti-His₆ 1:1500 e anti-mouse IgG conjugado a peroxidase.

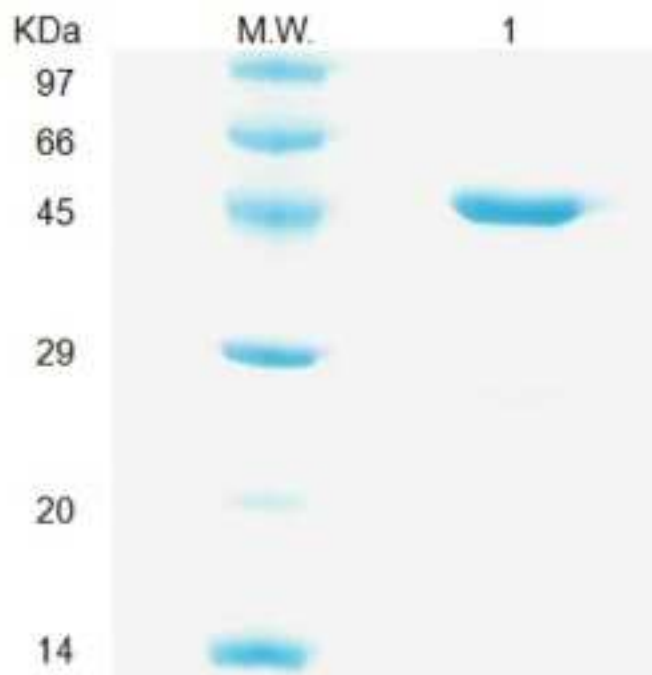
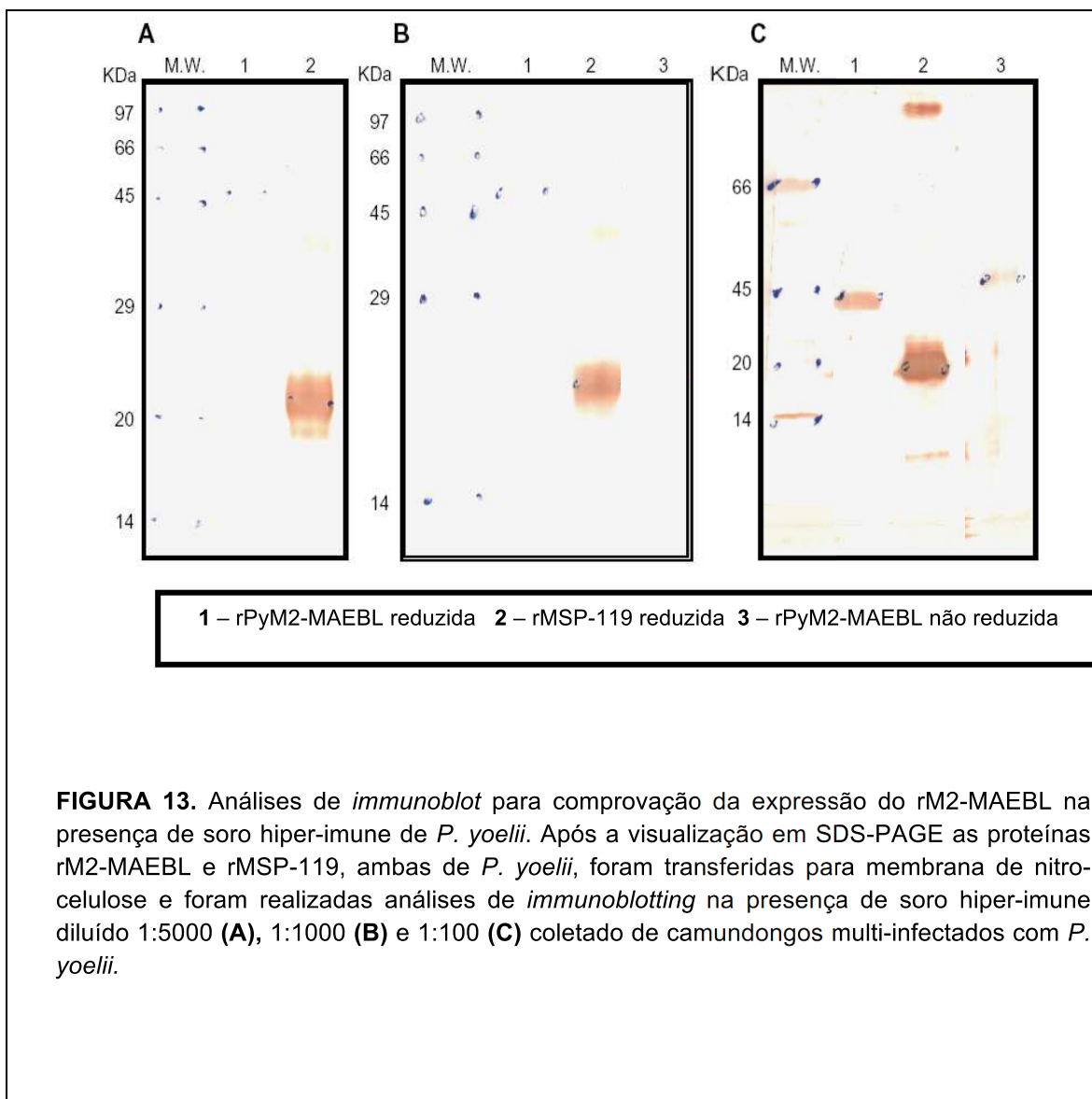


FIGURA 12. Análise de gel SDS-PAGE sob condições denaturantes do recombinante expresso e purificado, PyM2-MAEBL, após diálise contra Ureia 2M em PBS e concentração utilizando coluna Centriprep YM-10 (Millipore). **(1)** Banda única de aproximadamente 45kDa comprovando a obtenção e pureza do recombinante PyM2-MAEBL.

Como mostrado nas figuras 10B e 11B o recombinante gerado, que contém uma cauda de histidina (6 repetições), foi reconhecido em ensaios de *immunoblot* utilizando anticorpo anti-His₆ diluído 1:1500. Todavia, visando determinar o grau de integridade e similaridade estrutural em relação ao domínio M2 nativo, realizamos novos ensaios de *immunoblot* na presença de soro hiperimune de camundongos multi-infectados com a

cepa não letal *P. yoelii* CL. Conforme é mostrado na figura 13, o soro hiperimune diluído 1:100 foi capaz de reconhecer o recombinante PyM2-MAEBL reduzido, e sensivelmente o não reduzido. Em contraste, em diluições de 1:1000 e 1:5000 o mesmo soro hiperimune não foi capaz de se ligar ao rM2-MAEBL, porém reconhecendo o antígeno recombinante MSP-1₁₉ (rMSP-1₁₉; gentilmente cedido pelo Prof. Maurício Rodrigues, UNIFESP) da mesma espécie de parasita. Coletivamente, estes resultados demonstram que o rM2-MAEBL possui similaridade estrutural com seu homólogo nativo presente no parasita. No entanto, a diferença na magnitude de reconhecimento pode estar relacionada a duas hipóteses não excludentes; (i) devido ao fato de que os antígenos MSP-1 e 2 totalizam 2/3 dos antígenos presentes na superfície do merozoíta (Gilson et al., 2006), e consequentemente o MAEBL estaria menos presente e induzindo uma menor resposta imune mediada por anticorpos; (ii) a provável similaridade estrutural do rM2-MAEBL com seu homólogo nativo seria menor do que o rMSP-1₁₉ e sua forma nativa, apesar de ambos terem sido expressos e purificados de maneira semelhantes.



Resposta imune induzida pelo recombinante PyM2-MAEBL e sistema *Prime* (DNA) *Boost* (proteína) heterólogo

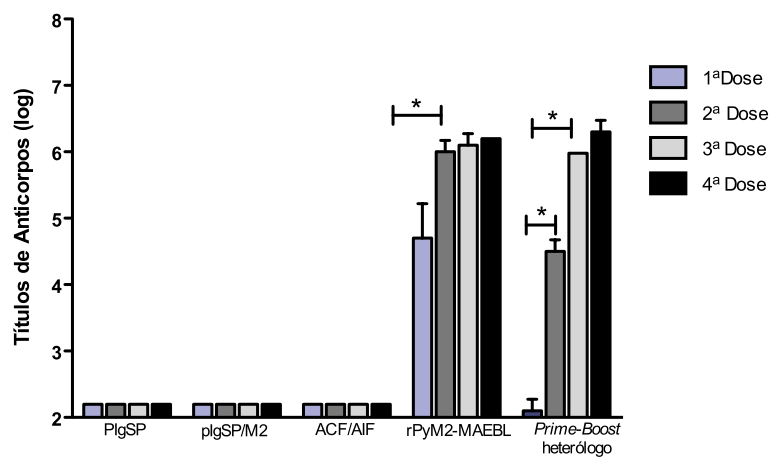
A fim de validar os experimentos de imunizações avaliando a resposta imune induzida pelo rPyM2-MAEBL, 5 grupos de camundongos (6-10) foram imunizados de acordo com o protocolo descrito anteriormente e utilizando estratégias de imunização detalhadas na figura 5. Os soros dos animais imunizados foram coletados após cada dose

e o título de anticorpos ($\log_{10}$) contra o próprio rPyM2-MAEBL foi quantificado por ELISA. Como pode ser observado na figura 14A, o rPyM2-MAEBL foi altamente imunogênico gerando altos títulos de anticorpos tanto no grupo que recebeu apenas a proteína recombinante quanto no grupo *prime-boost* heterólogo. No grupo rPyM2-MAEBL após a primeira dose já foram detectados elevados níveis de anticorpos ($\log_{10} = 4,7 \pm 0,51$) capazes de reconhecer o recombinante. Os títulos de anticorpos foram potencializado após a segunda dose ($\log_{10} = 6,02 \pm 0,17$), quase alcançando níveis máximos após esta dose. De fato, houve um pequeno aumento após a terceira dose, entretanto a elevação do título de anticorpos não se mostrou significativa, demonstrando que os títulos de anticorpos atingiram um *plateau*. O sistema *prime-boost* heterólogo de imunização apresentou baixos níveis de anticorpos ($\log_{10} = 2,1 \pm 0,17$) após a primeira dose correspondente à imunização com DNA (pIgSP/M2-MAEBL). Contudo, após as doses subsequentes de proteína (rPyM2-MAEBL), foi observado o mesmo padrão nos níveis de anticorpos observados no grupo que recebeu apenas a proteína. Em contraste, não foram detectados anticorpos anti-MAEBL no soro dos animais injetados com adjuvante, DNA plasmidial pIgSP/M2-MAEBL ou apenas o vetor pIgSP. Estes dados demonstram a especificidade dos anticorpos gerados e a alta imunogenicidade do recombinante gerado.

Células T CD4⁺ Th1 e subconjuntos Th2 têm papéis cruciais na diferenciação de células B, proliferação e regulação de isotipos (Freeman et al, 1980). Ainda, a proteção contra fase sanguínea da malária tem sido descrita como mediada por células B secretoras de IgG1 e IgG2c com funções definidas na secreção de anticorpos específicos para controlar a infecção parasitária (Burns et al., 1997). Com o intuito de qualificar a resposta imune humoral analisamos subclasses de IgG nos animais imunizados após a 4^a dose. Conforme é mostrado na figura 14B, animais imunizados com o recombinante rPyM2-MAEBL ou com o sistema *prime-boost* heterólogo (1 DNA- 3 proteína)

desenvolveram altos títulos de anticorpos IgG1, IgG2b, e IgG2c específicos contra rPyM2-MAEBL. Ainda, foi observada uma razão balanceada IgG1/IgG2c; respectivamente 3.16 para o grupo rPyM2-MAEBL e 5.62 no grupo *prime-boost* heterólogo. Níveis significativamente elevados de IgG2c e IgG1 em camundongos imunizados antes do desafio no presente estudo apontam para um perfil misto de citocinas Th1/Th2. Isto indica que estes antígenos têm o potencial para ativar ambas as subpopulações Th1/Th2 de células T. O discreto aumento observado na concentração de IgG1 no grupo *prime-boost* heterólogo, possivelmente está relacionado com a imunização com DNA como primeira dose.

A



B

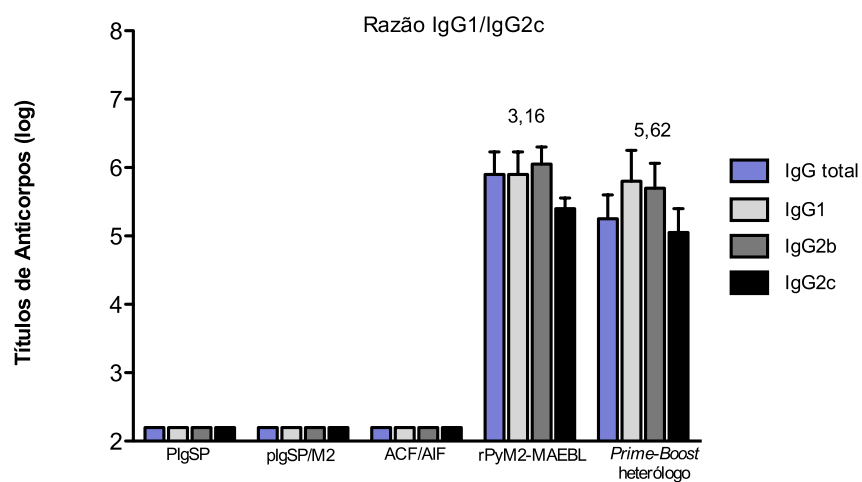


FIGURA 14. (A) Imunização com o rPyM2-MAEBL e sistema *prime-boost* heterólogo (1 DNA-3 Proteína) gera anticorpos específicos. **(B)** Subclasses de IgG e razão IgG1/IgG2c de soro da 4ª dose de camundongos imunizados. Os resultados estão expressos como a média do log do título de anticorpos $\pm$ desvio padrão (DVP) de triplicatas do *pool* de soro utilizado.

No entanto, apesar da detecção de elevados títulos de anticorpos capazes de reconhecer o antígeno recombinante em ensaios de ELISA, a possibilidade destes animais em controlar o desenvolvimento das formas sanguíneas do parasita reside, em parte, na habilidade destes anticorpos em reconhecer o antígeno na sua forma nativa. Noe e Adams, 1998 demonstraram que MAEBL é expresso relativamente cedo durante a esquizonia, já se encontrando presente na superfície do merozoíta mesmo antes do rompimento do esquizonte (Noe&Adams, 1998). Desta maneira, e com o intuito de verificar a presença de anticorpos capazes de reconhecer o domínio M2 diretamente no parasita, realizamos ensaios de imunofluorescência usando esquizontes maduros de *P. yoelii*. Como observamos na figura 15, o soro dos camundongos imunizados (*pool* da quarta dose) com o recombinante PyM2-MAEBL e sistema *prime-boost* heterólogo, em uma diluição 1:50, apresentou anticorpos capazes de reconhecer esquizontes de *Plasmodium yoelii*. Como controle negativo do ensaio foi usado soro de animais do grupo adjuvante (ACF/AIF) na mesma diluição. Além disso, em uma diluição 1:100 também foi observada reatividade com o soros dos grupos rPyM2-MAEBL e sistema *prime-boost* heterólogo.

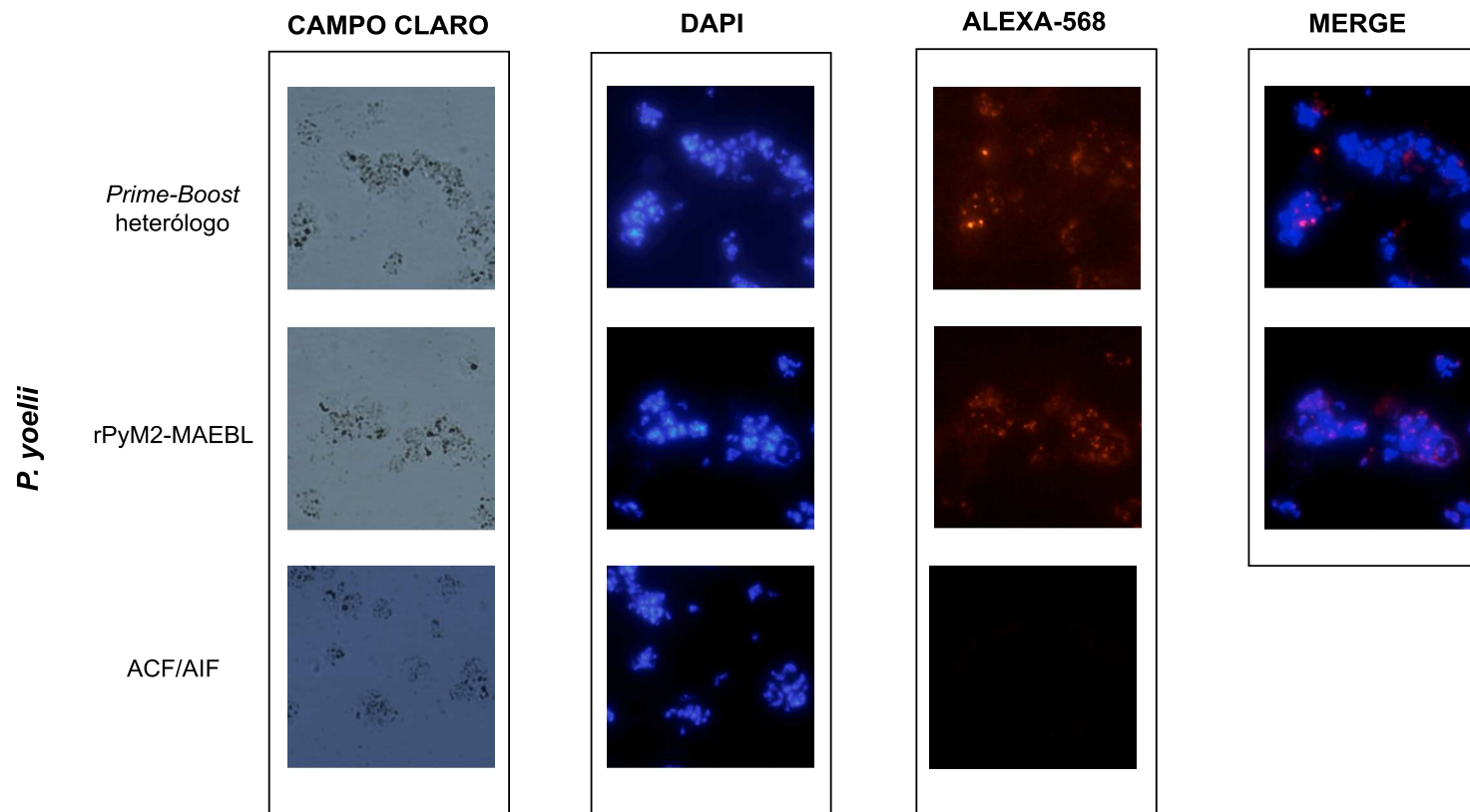


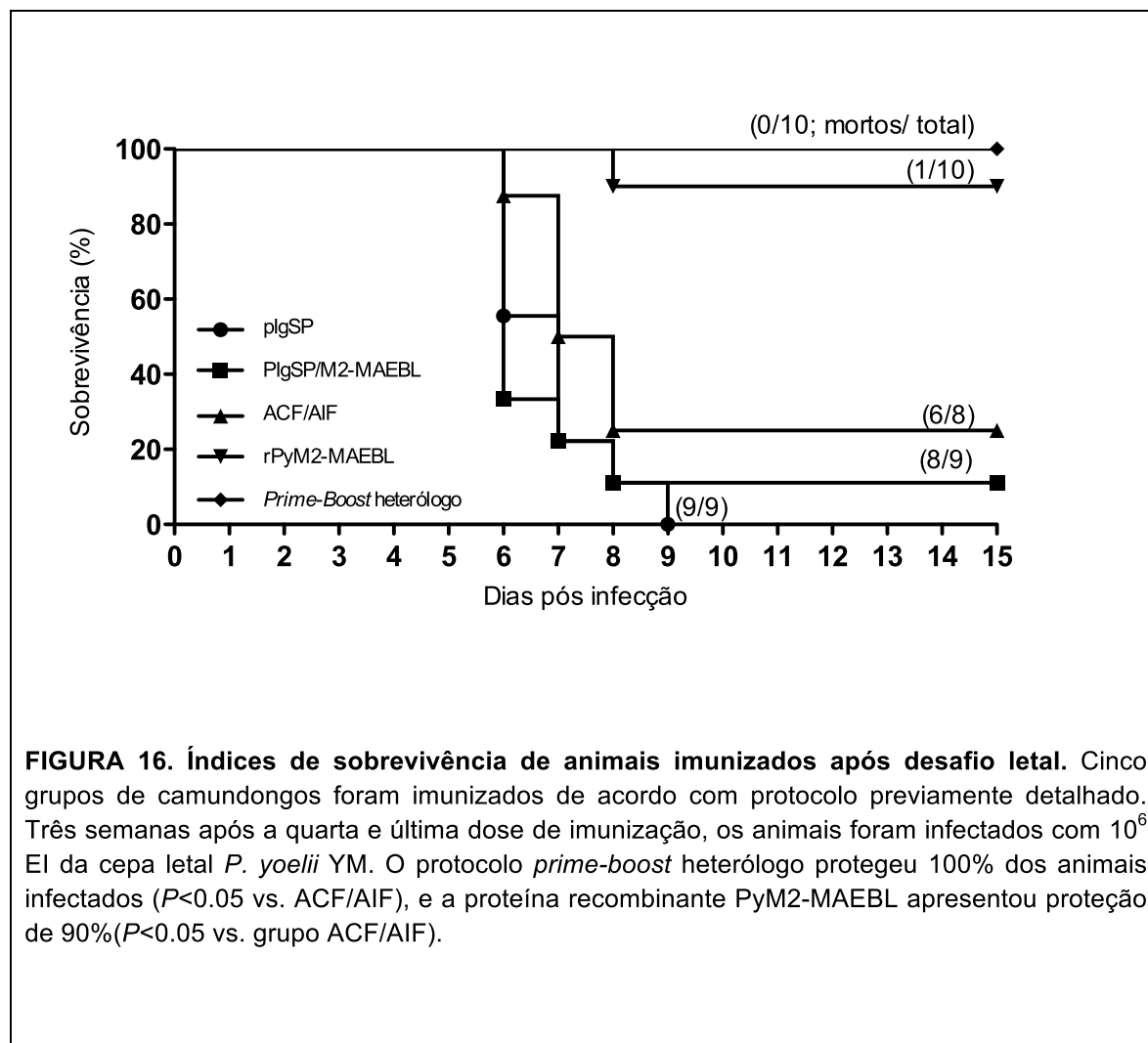
FIGURA 15. Anticorpos anti-rPyM2MAEBL reconhecem esquizontes de *Plasmodium yoelii*. *Pool* do soro da 4^a dose de animais imunizados com rPyM2MAEBL e no sistema *prime-boost* heterólogo foram utilizados na diluição de 1:50 em ensaios de Imunofluorescência indireta contra esquizontes de *P. yoelii*. Um *pool* do soro da 4^a dose de camundongos injetados apenas com adjuvante foi usado como controle negativo.

Proteção induzida por imunização com vacina experimental com a proteína rPyM2-MAEBL e em sistema de *prime-boost* heterólogo (DNA- proteína).

P. yoelii YM é um modelo murino rígido para testar a eficiência de vacinas devido a alta virulência desta linhagem. Camundongos C57BL/6 injetados com os diferentes protocolos de imunização foram desafiados via intraperitoneal (i.p.) com 10^6 formas sanguíneas da cepa letal *P. yoelii* YM. Como mostrado na figura 16, 75% dos animais injetados com adjuvante, 88,88% dos animais injetados com DNA plasmidial plgSP/ M2-MAEBL ou 100% dos que receberam apenas o vetor plgSP sucumbiram a infecção após 6-8 dias, demonstrando a elevada virulência da cepa e do inóculo utilizado. Em contraste, os grupos imunizados com rPyM2-MAEBL unicamente foram protegidos em 90% diante do desafio letal, enquanto o sistema *prime-boost* heterólogo (DNA -proteína) conferiu proteção total (100%). Estes níveis de proteção observados foram estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle ACF/AIF ($p < 0,05$; *Log Rank*).

Ainda, durante o desafio letal a parasitemia dos animais foi monitorada diariamente através esfregaços sanguíneos confeccionados com uma gota de sangue da cauda dos animais infectados corados com *Kit* Panótico Rápido (Laborclin). Conforme podemos observar na figura 17, animais dos grupos controles (plgSP, plgSP/M2-MAEBL e ACF/AIF) apresentaram altos níveis de parasitemia atingindo 80-100% seguidos de morte destes animais, com exceção de dois animais do grupo ACF/AIF que sobreviveram ao desafio provavelmente devido a resposta inespecífica do adjuvante de perfil Th1. Contudo, animais dos grupos rPyM2-MAEBL e *prime-boost* heterólogo foram capazes de controlar a infecção reduzindo o desenvolvimento do parasita nos dias 05-07 da infecção. Entre os dias 09 e 10 já não encontramos parasitas no sangue periférico destes animais que demonstraram total recuperação (figura 17). No entanto, esta redução na parasitemia não parece estar associada com os níveis de anticorpos anti-M2-MAEBL detectados nos

ensaios de ELISA, pois não encontramos correlação quando comparamos os títulos de anticorpos com os níveis de parasitemia e sobrevivência dos animais (dados não mostrados).



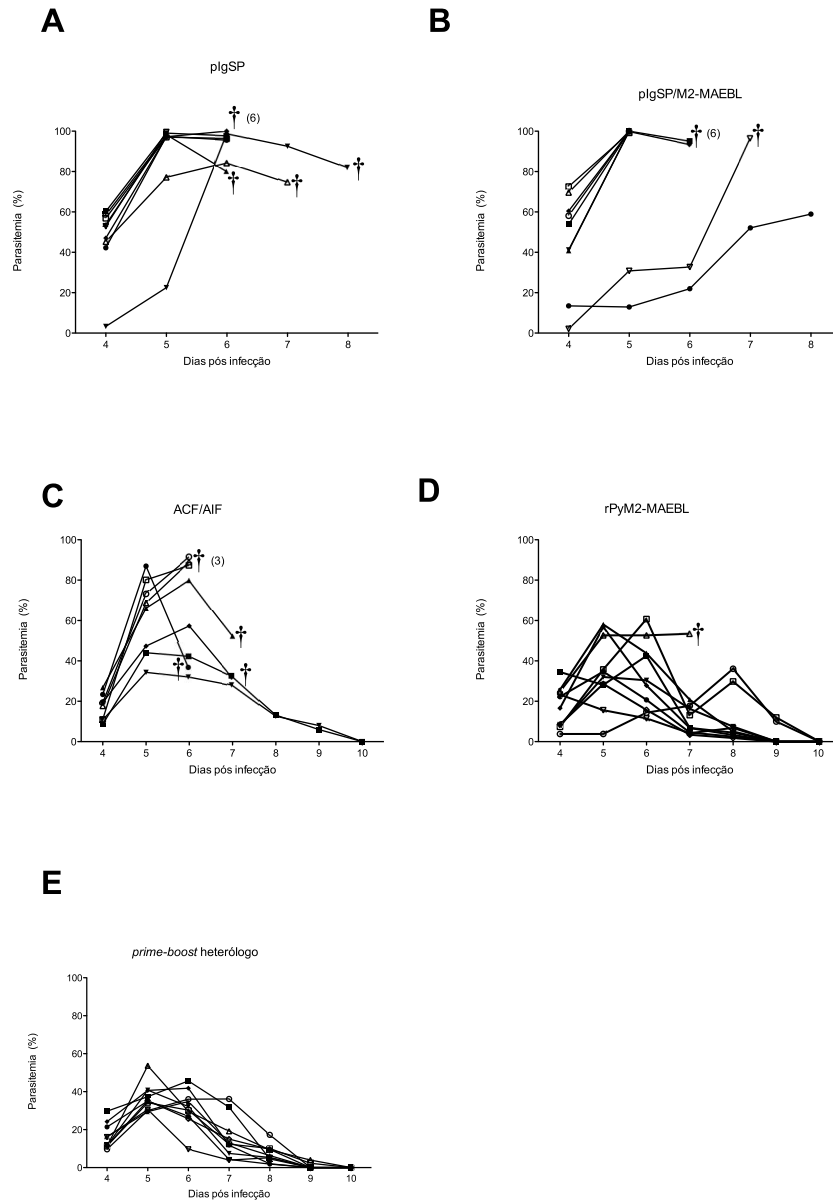


FIGURA 17. Níveis de parasitemia (%) de camundongos dos diferentes grupos imunizados foram avaliados após infecção com *P. yoelii* YM três semanas após a 4ª dose. Imunização com MAEBL unicamente ou em sistema *prime-boost* heterólogo foi capaz de reduzir significativamente o crescimento parasitário após infecção com 10^6 IE of *P. yoelii* YM. As cruzes representam animais que sucumbiram à infecção, se mais de um animal morreu no mesmo dia o número total de mortos se encontra entre parênteses.

Os dados de imunização aqui apresentados correspondem a um único experimento, porém realizamos outros experimentos de imunização anteriores. Como pode ser observado na Tabela 2, iniciamos os testes imunizando animais com 3 doses da proteína recombinante emulsificada em ACF e AIF; entretanto observamos aumento de até 57% na proteção após o acréscimo de uma dose no protocolo de imunização. Consequentemente, adotamos a estratégia de quatro doses com o intuito de maximizar a resposta imune e para que todos os animais apresentassem títulos de anticorpos similares, acarretando em maiores níveis de proteção. Na literatura, também já foi observado que o aumento de doses reforço foram mais eficientes em gerar altos níveis de anticorpos como em manter a resposta (Jeamwattanaalert et al., 2007).

A escolha de inserir outro grupo vacinal compreendendo um sistema *prime* (1 DNA)-*boost* (3 proteína) de imunização foi baseada em evidências de que injeções intramusculares de DNA nu (plasmídios) resultam em expressão gênica que leva a indução de resposta imune protetora (Ulmer et al., 1994; Ulmer et al., 1993; Wolff et al., 1990). Embora a injeção de DNA em plasmídios induza resposta imune humoral e celular, os níveis de imunogenicidade são de baixa magnitude e se mostraram insuficientes para proteger contra malária (McConkey et al., 2003). Numerosos estudos descreveram estratégias para aumentar a imunogenicidade ou alterar o tipo de resposta induzida por vacinas de DNA contra malária realizando protocolos de imunização com uma dose de DNA (*prime*) seguida de reforço (*boost*) geralmente com proteína recombinante ou adenovírus e poxvírus não replicantes.

Não observamos porém, diferença significativa entre a imunização com a proteína recombinante e o regime *prime-boost* heterólogo de imunização, logo que a proteína sozinha atingiu níveis altos de anticorpos e proteção. Contudo, considerando que a expressão da proteína é trabalhosa e demorada e não resulta em grandes concentrações

de material, são necessárias várias extrações o que muitas vezes limita a condução dos experimentos. Nesse sentido o sistema *prime-boost* heterólogo se mostra vantajoso por poupar a utilização da proteína recombinante na primeira dose.

É importante ressaltar que as proporções nos níveis de proteção se mantiveram similares entre os grupos em mais de dois experimentos comprovando a reprodutibilidade dos resultados (Tabela 2, experimentos 2 e 3).

Tabela 2. Dados correspondentes a todos os experimentos de imunização realizados.

Experimento1	Doses	Animais: vivos/total	Proteção (%)
ACF/AIF	3	0/4	0%
rPyM2-MAEBL	3	2/6	33,33%
Experimento2	Doses	Animais: vivos/total	Proteção (%)
PIgsP	4	0/7	0%
PIgsP/M2-MAEBL	4	0/6	0%
ACF/AIF	4	4/8	50%
rPyM2-MAEBL	4	4/6	66,67%
<i>Prime-Boost</i> heterólogo	4	6/7	85,72%
Experimento 3	Doses	Animais: vivos/total	Proteção (%)
Grupo PIgsP	4	0/10	0%
PIgsP/M2-MAEBL	4	2/10	20%
ACF/AIF	4	3/10	30%
rPyM2-MAEBL	4	9/10	90%
<i>Prime-Boost</i> heterólogo	4	10/10	100%

Para determinar se a resposta imune induzida pela imunização com rPyM2-MAEBL ou no sistema *Prime-Boost* heterólogo poderia ser mantida em altos níveis e por um longo tempo, soro dos animais imunizados após a 4^a dose e que sobreviveram ao desafio letal foram coletados e avaliados por ELISA após seis meses. Como demonstrado na figura 18, observamos altos e robustos níveis de anticorpos de longa duração em animais dos grupos rPyM2-MAEBL e *prime-boost* heterólogo ($\log_{10} = 5,6$), mostrando que os títulos de anticorpos persistiram sem drásticas variações durante os últimos 6 meses. Em contraste, soros dos grupos controles que sobreviveram ao desafio apresentaram baixos níveis de anticorpos contra proteína recombinante PyM2-MAEBL após seis meses, mesmo tendo entrando em contato com o parasita durante a infecção. Estes resultados corroboram com a ideia de que uma resposta imune de longa duração específica ao antígeno pode refletir na geração e manutenção de células de longa duração no plasma que podem sobreviver por anos (Manz et al., 1997; Slifka&Ahmed, 1998).

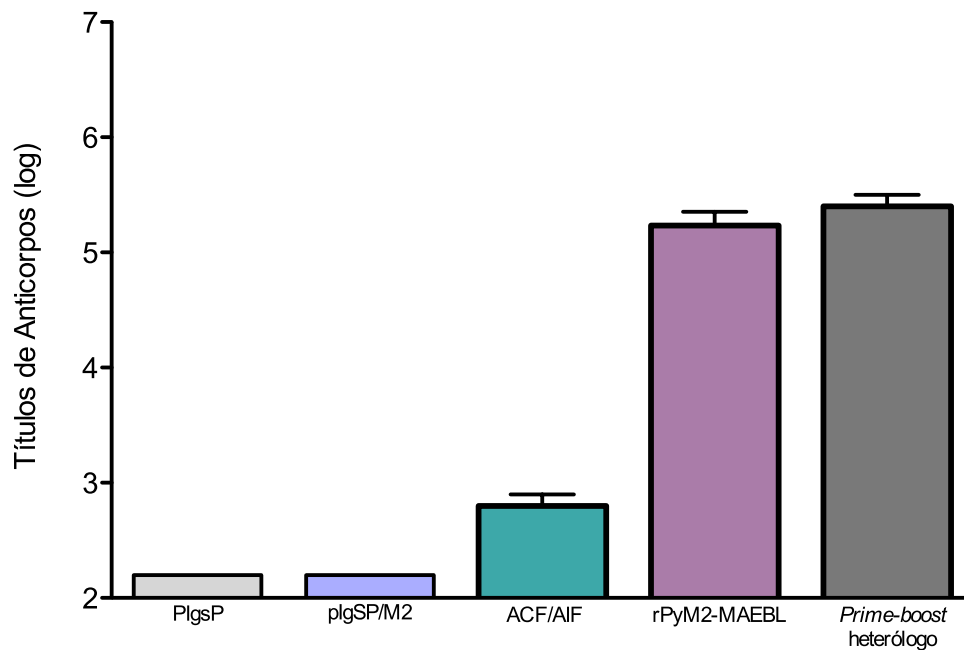


FIGURA 18. Imunização com rPyM2-MAEBL ou sistema *prime-boost* heterólogo geram anticorpos de longa duração. *Pool* de soros de camundongos imunizados, seis meses após sobreviver ao desafio letal com *P. yoelii* YM foram quantificados por ELISA, mostrando altos títulos de anticorpos. Os resultados são expressos como a média logarítmica do título de anticorpos de triplicatas $\pm$ DVP.

Acredita-se que proteção contra formas sanguíneas do parasita seja predominantemente mediada por anticorpos e células T CD4⁺ (Good et al., 1998; Miller et al., 1998). Neste sentido, investigamos a participação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ na proteção dos animais imunizados diante do desafio com *P. yoelii*. Com esta finalidade, 15 camundongos C57BL/6 foram imunizados com a proteína rPyM2-MAEBL respeitando o mesmo protocolo demonstrado na figura 5. Três semanas após a quarta dose, cinco animais imunizados com rPyM2-MAEBL foram injetados com anticorpos monoclonais anti-CD4⁺ ou anti-CD8⁺ para depleção destas populações e no dia seguinte foram infectados

com 10^6 Els de *P. yoelii*. Como controle animais foram injetados com IgG controle na mesma concentração dos outros anticorpos. A mortalidade dos animais foi observada e demonstrada na figura 19. 100% dos animais depletados para $CD4^+$ morreram entre os dias 5 e 6 pós infecção. Em contrapartida, os animais depletados para $CD8^+$ e os sem depleção de nenhuma das populações mantiveram os mesmos níveis de proteção já observados nos experimentos anteriores para este grupo vacinal (rPyM2-MAEBL) de 80% e 90%, respectivamente. Estes resultados corroboram com outros estudos de fase sanguínea da infecção em modelos murinos de malária que demonstraram que células Th1 e Th2 $CD4^+$ são essenciais para o controle primário da parasitemia (Taylor-Robinson&Phillips, 1994). Infelizmente os demais grupos não puderam ser avaliados devido a limitações no volume de anticorpos monoclonais. Entretanto, já obtivemos os hibridomas para produção própria destes anticorpos e pretendemos repetir este ensaio na presença dos demais grupos vacinais.

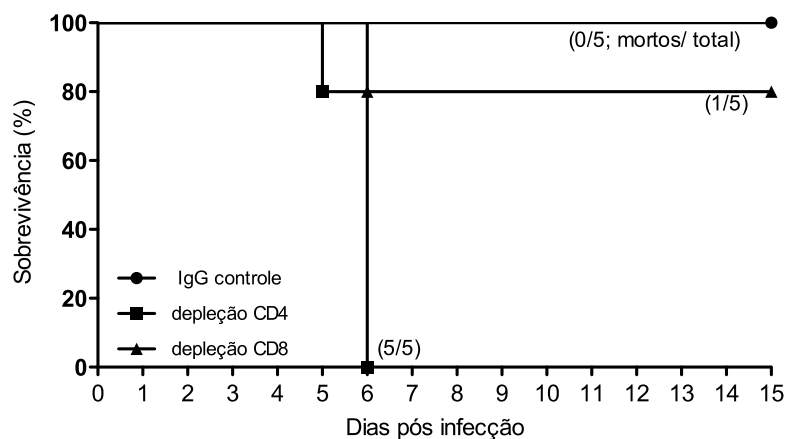


FIGURA 19. Linfócitos T CD4⁺ são essenciais na proteção contra desafio letal. Índices de sobrevivência de animais imunizados após depleção de linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ após desafio com *P. yoelii* YM. Camundongos foram imunizados com rPyM2-MAEBL de acordo com protocolo previamente detalhado. Três semanas após a quarta e última dose de imunização, os animais foram injetados com anticorpos monoclonais anti-CD4⁺ ou anti-CD8⁺ para depleção destas populações e no dia seguinte foram infectados com 10⁶ EI de *P. yoelii*. Como controle animais foram injetados com IgG controle na mesma concentração dos outros anticorpos.

Para determinar se a imunização com o rPyM2-MAEBL ou sistema *prime-boost* heterólogo teria a capacidade de gerar anticorpos opsonizantes, foram utilizados soros dos animais imunizados coletados antes do desafio. Foi testada a habilidade do soro pré-desafio em promover a opsonização em eritrócitos infectados de *P. yoelii* YM por macrófagos obtidos de camundongos BALB/c. Com esta finalidade, Els de *P. yoelii* YM foram concentrados utilizando o protocolo MACS e incubados com saponina 0,1% para permeabilizar a membrana dos Els e possibilitar que anticorpos anti-MAEBL tivessem acesso aos merozoítas no esquizonte. Os parasitas opsonizados com soro dos grupos rPyM2-MAEBL, *prime-boost* heterólogo e ACF/AIF foram adicionados a macrófagos e o número de macrófagos fagocitando Els foi acessado. Como pode ser observado na figura

20A, não houve diferença na porcentagem de EIs ingeridos após a opsonização entre os grupos testados. Entretanto, nos grupos rPyM2-MAEBL, *prime-boost* heterólogo o processo fagocítico ocorreu mais rapidamente, pois após 1h de incubação observamos parasitas em estágio mais avançado de processamento (figura 20C e 20D) quando comparado ao grupo ACF/AIF (figura 20B) em que encontramos merozoítas dentro dos macrófagos (figura 20A). Acreditamos que a hemozoína liberada com o rompimento dos esquizontes durante a permeabilização com saponina foi responsável pelos níveis de fagocitose encontrados no grupo controle ACF/AIF. Pretendemos eliminar a hemozoína submetendo o parasita permeabilizado a colunas MACS LS como descrito por Hill et al., 2012.

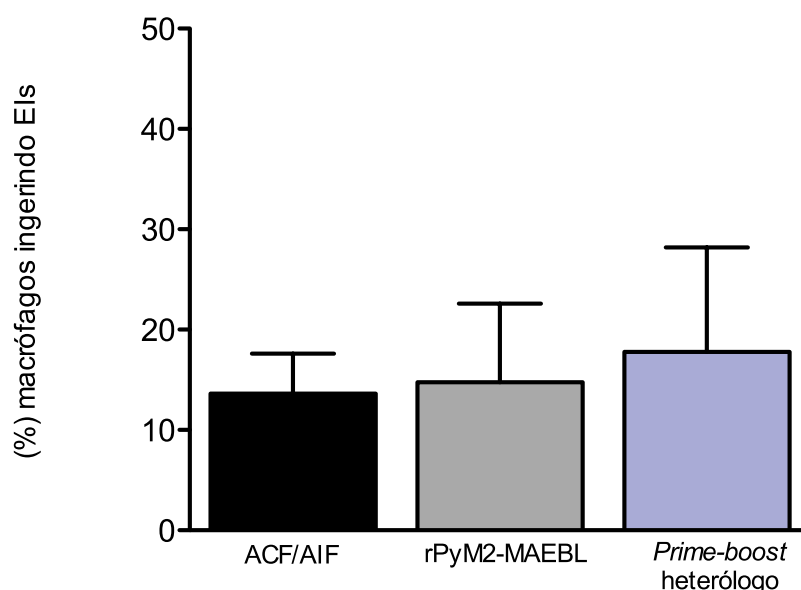


FIGURA 20. Fagocitose de EI de *P. yoelii* YM por macrófagos. Esquizontes permeabilizados com saponina e merozoítas livres foram incubados na presença de *pool* de soros da quarta dose dos grupos rPyM2-MAEBL, *prime-boost* heterólogo e ACF/AIF na diluição de 1:50 para promover opsonização. Parasitas opsonizados foram adicionados aos macrófagos e incubados por 1h para possibilitar a fagocitose. As lâminas foram coradas com auxílio do Kit Panótico Rápido (Laborclin). **(A)** O número de EIs ingeridos por 500 macrófagos totais foi contado por microscopia para cada amostra individual. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ DVP de triplicatas. Fotos representativas de macrófagos ingerindo parasitas como resultado da opsonização com soros dos grupos ACF/AIF **(B)** rPyM2-MAEBL **(C)** e *prime-boost* heterólogo **(D)**.

Reconhecimento heterólogo de anticorpos anti-rPyM2-MAEBL em *P. falciparum* e *P. vivax*.

O alinhamento das sequências proteicas de MAEBL em *P. yoelii* e *P. falciparum* demonstraram 53% de similaridade. Os domínios M1 e M2 e MAEBL apresentam uma significativa similaridade de aminoácidos com seus correspondentes murinos. A similaridade entre os domínios M2 de *P. yoelii* e *P. berghei* é de 85% e a média de similaridade deles com *P. falciparum* é de 63% (Ghai et al., 2002). Ainda, quando comparamos os alinhamentos entre o domínio M2 de *P. yoelii* e *P. vivax* encontramos 57% de similaridade. Estes dados indicam que o domínio M2 é relativamente conservado entre as espécies, e nos conduziram a investigar o reconhecimento heterólogo por anticorpos anti-PyM2-MAEBL em *P. falciparum* e *P. vivax*.

Com esta finalidade, verificamos a presença de anticorpos nos soros dos animais imunizados capazes de reconhecer o domínio M2 por meio de ensaios de imunofluorescência em lâminas de esfregaços contendo esquizontes maduros de *P. vivax* e *P. falciparum*. Como observamos nas figuras 21 e 22, o *pool* dos soros da 4^a dose dos camundongos imunizados com o recombinante PyM2-MAEBL e sistema *prime-boost* heterólogo na diluição 1:50 reagiram com ambas as espécies de parasitas testadas. Como controle negativo do ensaio foi usado *pool* da 4^a dose do soro de animais do grupo adjuvante (ACF/AIF) na mesma diluição.

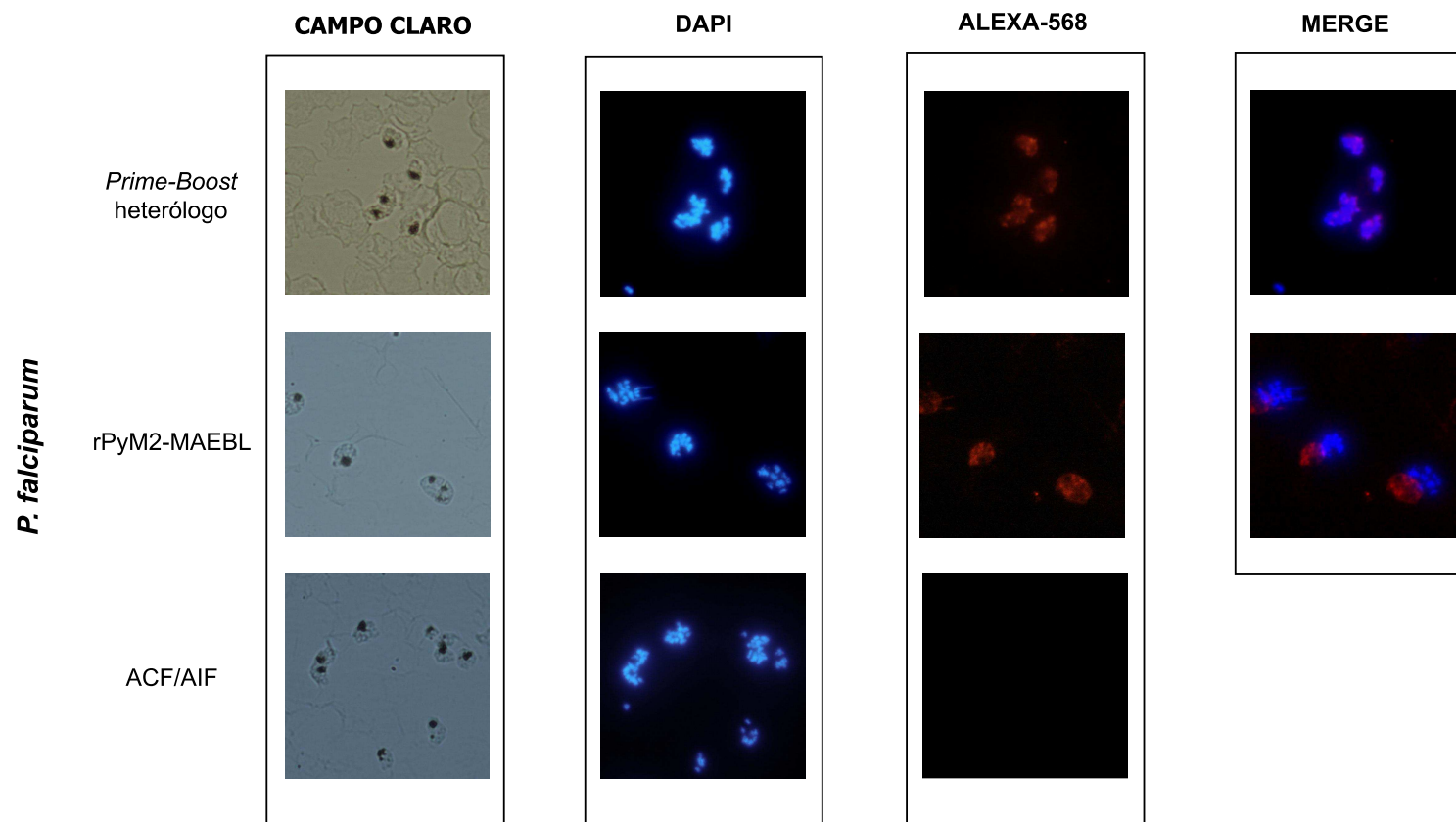


FIGURA 21. Anticorpos anti-rPyM2MAEBL reconhece esquizontes de *Plasmodium falciparum*. Pool do soro da 4^a dose de animais imunizados com rPyM2MAEBL e no sistema *prime-boost* heterólogo foram utilizados na diluição de 1:50 em ensaios de Imunofluorescência indireta contra esquizontes de *P. falciparum*. Um pool do soro da 4^a dose de camundongos injetados apenas com adjuvante foi usado como controle negativo.

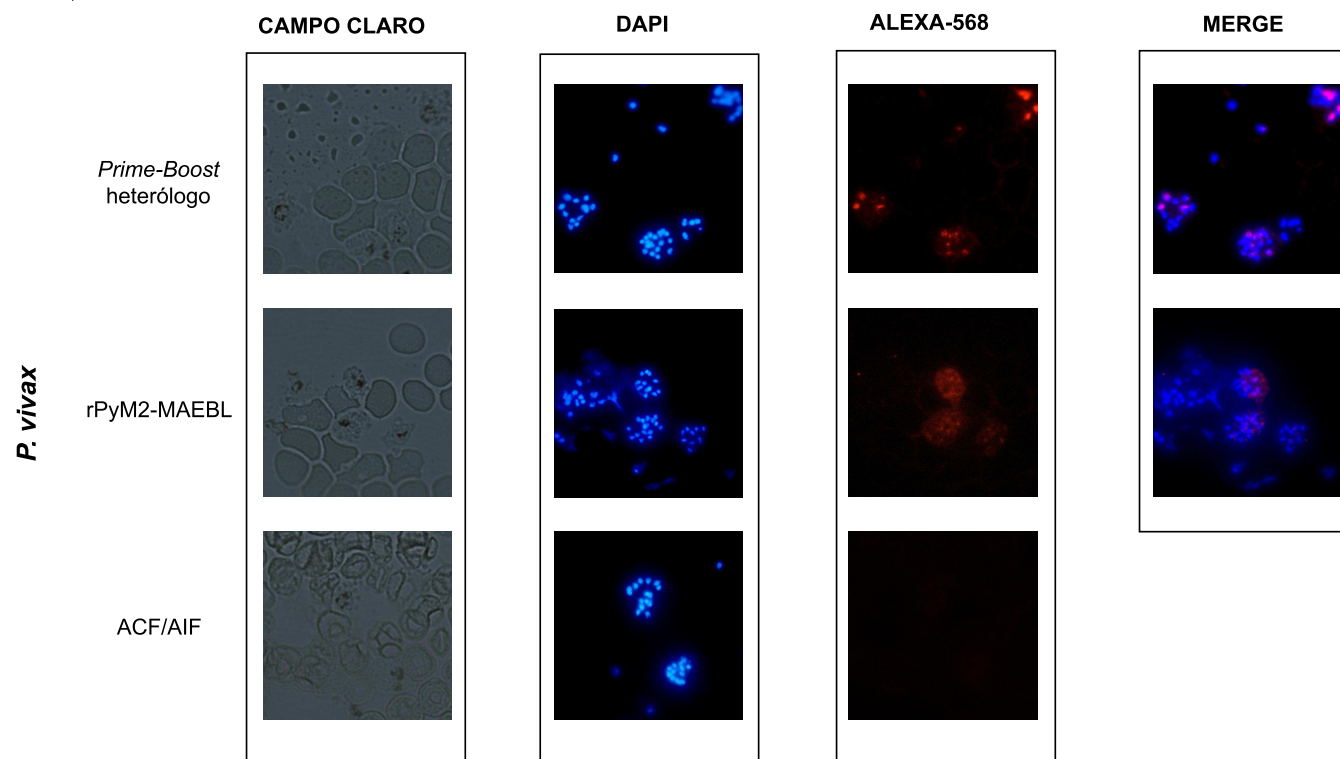


FIGURA 22. Anticorpos anti-rPyM2MAEBL reconhecem esquizontes de *Plasmodium vivax*. Pool do soro da 4ª dose de animais imunizados com rPyM2MAEBL e no sistema *prime-boost* heterólogo foram utilizados na diluição de 1:50 em ensaios de Imunofluorescência indireta contra esquizontes de *P. vivax*. Um pool do soro da 4ª dose de camundongos injetados apenas com adjuvante foi usado como controle negativo.

Algumas vacinas experimentais apesar de serem seguras e altamente imunogênicas, são incapazes de induzir elevados níveis de proteção. Contudo, anticorpos neutralizantes podem inativar merozoítas antes da invasão e inibir o desenvolvimento do parasita. Já foi sugerido que AMA1 participa na ligação do parasita com os eritrócitos em *P. falciparum* e modelos murinos (Fraser et al., 2001). Esta ligação é crucial para a invasão dos eritrócitos. Levando em consideração a similaridade estrutural dos subdomínios I e II de AMA1 com os domínios M1 e M2 de MAEBL, sugere que MAEBL possua um envolvimento direto na interação parasita-eritrócito (Ghai et al., 2002).

Com bases nestas evidências, se fez importante avaliar o potencial do soro anti-PyM2-MAEBL em inibir a invasão de formas sanguíneas de *Plasmodium*. Entretanto, esbarramos com a falta de um ensaio de invasão *ex-vivo* confiável para *Plasmodium yoelii*. Portanto, primeiramente realizamos testes em *P. falciparum*, pela facilidade de uma cultura *in vitro* bem estabelecida em laboratório.

Em cooperação com o grupo de pesquisa do Dr. Laurent Renia (A-STAR - *Agency of Science Research and Technology* - Cingapura), tivemos acesso a técnicas de domínio exclusivo de nossos colaboradores (Russell et al., 2011) que possibilitaram a realização de ensaios de inibição da invasão em isolados frescos de *P. vivax* e *P. falciparum*. Todo trabalho de campo foi realizado na cidade de Mae Sot na Tailândia. Os ensaios de invasão foram conduzidos na presença de *pool* de soros da quarta dose dos animais imunizados na diluição 1:50.

Para *P. falciparum* foram testados além da cepa de cultura 3D7, dois isolados de campo (FVT 402 e MKK 183). Como podemos observar na figura 23A, na cepa de *P. falciparum* de cultura (3D7), houve inibição da invasão em 15,79% na presença de soro rPyM2-MAEBL e 11,36% do soro *prime-boost* heterólogo.

Para o isolado FVT 402, houve uma inibição na invasão de 50,54% e 38,5% na presença de soro do grupo rPyM2-MAEBL e *prime-boost* heterólogo, respectivamente. Contudo, no isolado MKK 183, não foi observada inibição na presença de nenhum dos soros. Como controle negativo dos ensaios foi utilizado pool da quarta dose do grupo adjuvante, que não inibiu a invasão em nenhum dos isolados testados. Foi utilizado um inibidor de protease (E64) para evitar a ruptura dos esquizontes e prevenir a liberação dos merozoítas e desta forma ser validado como controle positivo da inibição (100%).

Foram testados 4 isolados de *P. vivax* (figura 23B) . No isolado WPP2805, soros dos grupos rPyM2-MAEBL foram capazes de inibir a invasão em 50,2% e 35,4%, respectivamente. Inibições de aproximadamente 96% foram observadas na presença de soro rPyM2-MAEBL e *prime-boost* heterólogo no isolado WPP3100; já no isolado WPP3099, as inibições foram de 20,95% e 94,6%. Entretanto, em um dos isolados testados (PID101408) não foi observada inibição na presença de nenhum dos soros. Como controle positivo da inibição foi utilizado soro anti-*Duffy*. Como controle negativo dos ensaios, novamente foi utilizado pool da quarta dose do grupo adjuvante, que não inibiu a invasão em nenhum dos isolados testados.

Esta alta capacidade dos soros anti-PyM2-MAEBL em inibir a invasão de formas sanguíneas em isolados de *P. vivax* e de *P. falciparum* em menores taxas, comprova mais uma vez que o domínio M2 é relativamente conservado entre as espécies. Entretanto, como o antígeno MAEBL não é o único responsável no processo de invasão do merozoíta no eritrócito questionamos que esta inibição observada possa ser resultado de reatividade cruzada do antígeno MAEBL com outros antígenos também envolvidos na infectividade do parasita no eritrócito. Desta forma, sugerimos que os anticorpos anti-MAEBL possam reconhecer e inibir em algum grau a ligação destes outros ligantes homólogos como AMA1 e EBA-175.

Os diferentes níveis de inibição variaram dependendo da cepa testada, possivelmente tendo relação com a variabilidade na sequência proteica de M2-MAEBL dos isolados e a proximidade com o mesmo domínio em *P. yoelii*. Entretanto, seriam necessárias análises moleculares para comparar a sequência do antígeno M2-MAEBL em cada isolado utilizado nos ensaios com o recombinante gerado, para chegar a uma correlação da similaridade entre as sequências com o nível de inibição da invasão de formas sanguíneas pela presença do soro anti-rM2MAEBL.

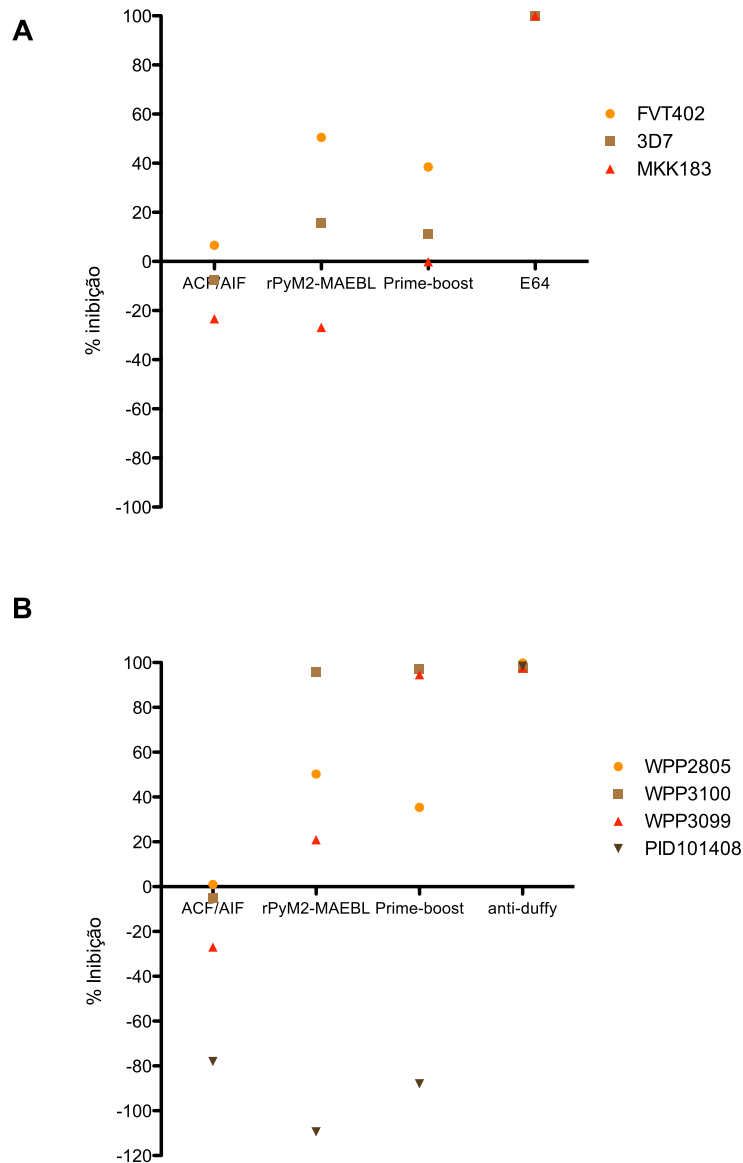


FIGURA 23. Soro de camundongos imunizados com rPyM2-MAEBL ou sistema *prime-boost* heterólogo inibem a invasão de eritrócitos de *P. falciparum* (**A**) e *P. vivax*. (**B**). Esquizontes e células alvo foram cultivados *in vitro* na presença *pool* de soro da quarta dose de camundongos imunizados diluídos 1:50. Como controle positivo de inibição nos ensaios de *P. vivax* foi utilizado soro anti-Duffy na diluição 1:50. Em *P. falciparum*, E64 foi usado como controle positivo de inibição. A parasitemia foi determinada por meio de esfregaços sanguíneos contando-se pelo menos 1000 eritrócitos. Os resultados estão expressos como a porcentagem de inibição em relação a cultura sem adição de soro.

Padronização e ensaios de invasão em *P. yoelii* YM

P. vivax e *P. yoelii* usam o antígeno/receptor *Duffy* para quimiocinas (DARC) como um receptor para a invasão e ambos invadem preferencialmente reticulócitos. Baseado nestas particularidades semelhantes entre estas espécies e com o conhecimento adquirido em técnicas de cultivo ex-vivo de *P. vivax* nos propusemos a estabelecer uma metodologia de cultura ex-vivo de curta duração para *P. yoelii*. Desta maneira nos possibilitaria testar o potencial inibitório do soro anti-PyM2-MAEBL em ensaios de invasão de formas sanguíneas no próprio *P. yoelii*.

Foi demonstrado que cepas virulentas (letais) e não-virulentas (não-letais) de *P. yoelii* preferem reticulócitos como células alvo para a invasão (revisto por Culleton & Kaneko, 2010). A fim de obter elevados níveis de reticulócitos para usar no ensaio de invasão *P. yoelii* YM, grupos de 4-6 camundongos *naive* foram sangrados diariamente para induzir a anemia e, assim, aumentar a população de reticulócitos. A maior porcentagem de reticulócitos ($46 \pm 10\%$) foi obtida após 6 dias de sangramento (Figura 24C). Animais sangrados após este período de pico não mostraram aumento da porcentagem de reticulócitos (dados não mostrados). Assim, reticulócitos e normócitos para o ensaio de invasão foram obtidos através da coleta de sangue de camundongos ricos em reticulócitos (figura 24A) ou animais *naive* (figura 24B). A remoção de leucócitos do sangue utilizado no ensaio de invasão foi conseguida após dois ciclos de filtração por CF11 (Sriprawat et al., 2009), já que a depleção de leucócitos parece ser um passo importante para minimizar a fagocitose dos merozoítas ou eritrócitos infectados durante o ensaio (Russell et al., 2011).

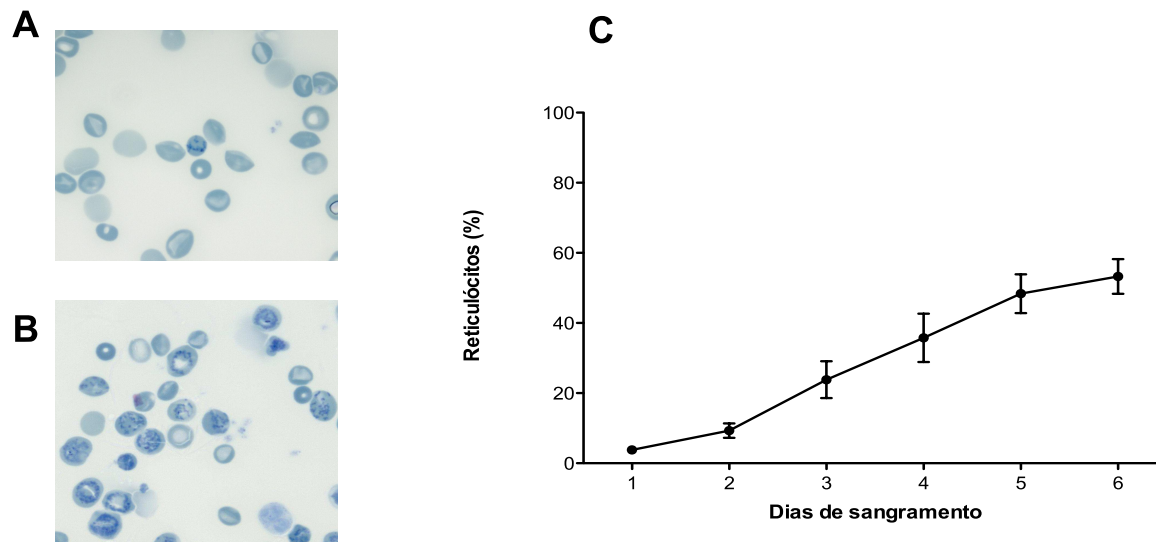


FIGURA 24. Obtenção de sangue rico em reticulócitos para ser utilizados como células alvo em cultura ex-vivo de *P. yoelii*. Grupos de 4-6 camundongos *naive* foram sangrados durante seis dias para induzir a anemia e, assim, aumentar a população de reticulócitos. As porcentagens de reticulócitos no sangue dos animais foi acessada diariamente em esfregaços corados com *Accustain Reticulocyte Stain* (Sigma) **(C)**. No dia anterior ao início do sangramento, animais *naive* apresentavam de 1-3% de reticulócitos **(A)**, após os seis dias de sangramento foi observada porcentagem de reticulócitos de 46-50% **(B)**.

Dado que as infecções por *P. yoelii* são assíncronas (figura 26A) (Gautret et al., 1994), enriquecemos e amadurecemos eritrócitos infectados com parasitas para restringir as formas do parasita para uma janela estreita da fase do desenvolvimento. Em primeiro lugar, 5-6 camundongos infectados com *P. yoelii* YM foram sangrados e parasitas maduros foram isolados por concentração magnética, como descrito anteriormente (Trang et al., 2004). Como a concentração magnética retém eritrócitos contendo grandes quantidades de hemozoína, ambos os trofozoítos maduros e esquizontes são obtidos por esta metodologia. Então, para obter grandes quantidades de esquizontes para este

ensaio de invasão, trofozoítos e esquizontes maduros de *P. yoelii* foram cultivados durante 3-6 horas até a maior parte (> 80%) atingir a fase esquizonte (Figura 26B).

Para os ensaios de invasão, foram testadas diferentes condições: tipo de células alvo (normócitos ou sangue rico em reticulócitos), razão esquizontes: células alvo (1:20, 1:10, 1:6), meios (RPMI e McCoy 5A) e suplementos (SFB, albumax (Invitrogen) e plasma humano AB adsorvido em hemácias murinas).

Neste sentido, formas maduras de *P. yoelii* YM e reticulócitos ou normócitos foram incubados em conjunto durante 20 horas em todas as condições e combinações detalhadas na figura 25. Os eritrócitos recém-infectados foram determinados por microscopia. Apenas anel e trofozoítos jovens foram contados porque apenas essas formas foram consideradas como resultado dos eventos da invasão que ocorreram durante a incubação. Quaisquer esquizontes maduros, parasitas degenerados ou formas com evidência de divisão nuclear ocasionalmente observados foram excluídos para o cálculo da eficiência invasão.

A melhor condição para invasão de *P. yoelii* YM foi observada em meio McCoy 5A suplementado com 20% plasma humano AB adsorvido em hemácias murinas, assim como foi descrito para *P. vivax* por Russell et al., 2011.

Em ensaios preliminares não observamos invasões bem sucedidas em parasitemias menores (dados não mostrados) às demonstradas, inferindo como já foi relatado, que a eficiência da invasão é influenciada pela razão de esquizontes e células alvo em *P. vivax* (Russell et al., 2011) e *P. falciparum* (Boyle et al., 2010). Entretanto, não houve diferença significativa na invasão entre as razões de esquizontes/células alvo 1:20, 1:10 e 1:6 (figura 26E). Contudo, analisando as lâminas podemos afirmar que na razão 1:20 os parasitas resultantes da invasão (formas jovens) se apresentaram intactos e com aspecto saudável (figura 26C e D), enquanto nas condições 1:10 e 1:6 observamos além

de parasitas com aspecto sofrido, muitos merozoítas livres e parasitas degenerados foram vistos nestas condições.

Além disso, não foi observada nenhuma diferença na eficiência da invasão usando células alvo diferentes na invasão de *P. yoelii* YM nas razões 1:6 e 1:10 (Figura 26E). Só na proporção 1:20, observamos um aumento na eficiência da invasão de *P. yoelii* YM usando reticulócitos como alvo.

Adotamos como condição ideal a utilização de sangue rico em reticulócitos como célula alvo para o ensaio e a razão 1:20 de esquizontes e células alvo. A solução foi diluída em 4% hematócrito usando meio McCoy 5A suplementado com 2,4g/litro de glicose, 40mg/mL de Gentamicina Sulfatada e 20% soro humano AB (inativado e adsorvido em hemácias murinas) e cultivado em microplacas num volume de 100 µl a 37°C durante 20-24h em “*candle jars*” de acordo com protocolo previamente descrito (Trager&Jensen, 2005). A metodologia padronizada para os ensaios de invasão em *P. yoelii* se encontra esquematizada na figura 27.

Estudos associados à biologia de *P. vivax*, sua patogênese e infectividade ainda são incipientes devido, principalmente, dificuldade de cultivo contínuo desse parasita. Ainda que Russel et al., 2011 tenha estabelecido um ensaio de invasão ex-vivo, a metodologia apresenta limitações como a necessidade de processar as amostras de sangue infectado no dia da coleta, a eficiência da invasão para alguns isolados é baixa, o número de condições testadas é pequeno e restringe os estudos a laboratórios de centros hospitalares localizados em áreas endêmicas de malária e que apresentem uma infraestrutura instalada adequada.

Muitos antígenos recombinantes de *P. vivax* vem sendo considerados como moléculas vacinais, embora ainda seja desconhecida a capacidade dos respectivos anti-soros em inibir o processo infeccioso deste parasita e, em consequência, induzir uma

proteção contra o desenvolvimento das formas sanguíneas.

Desta maneira, devido a estas limitações para se cultivar *P. vivax*, a padronização de ensaios de invasão em *P. yoelii* poderia ser utilizada como modelo para *P. vivax*. Assim, seria possível em laboratórios não situados em zonas endêmicas avaliar a função de diferentes antígenos de *P. vivax*.

MEIO	SUPLEMENTO		INVASÃO
RPMI	SFB	10%	Não
		20%	Não
	albumax	10%	Não
		20%	Não
	Plasma humano	10%	Não
		20%	Não
McCoy	SFB	10%	Não
		20%	Não
	albumax	10%	Não
		20%	Não
	Plasma humano	10%	Sim
		20%	Sim

FIGURA 25. Condições testadas para obtenção de uma invasão bem sucedida de formas sanguíneas de *P. yoelii* YM em eritrócitos.

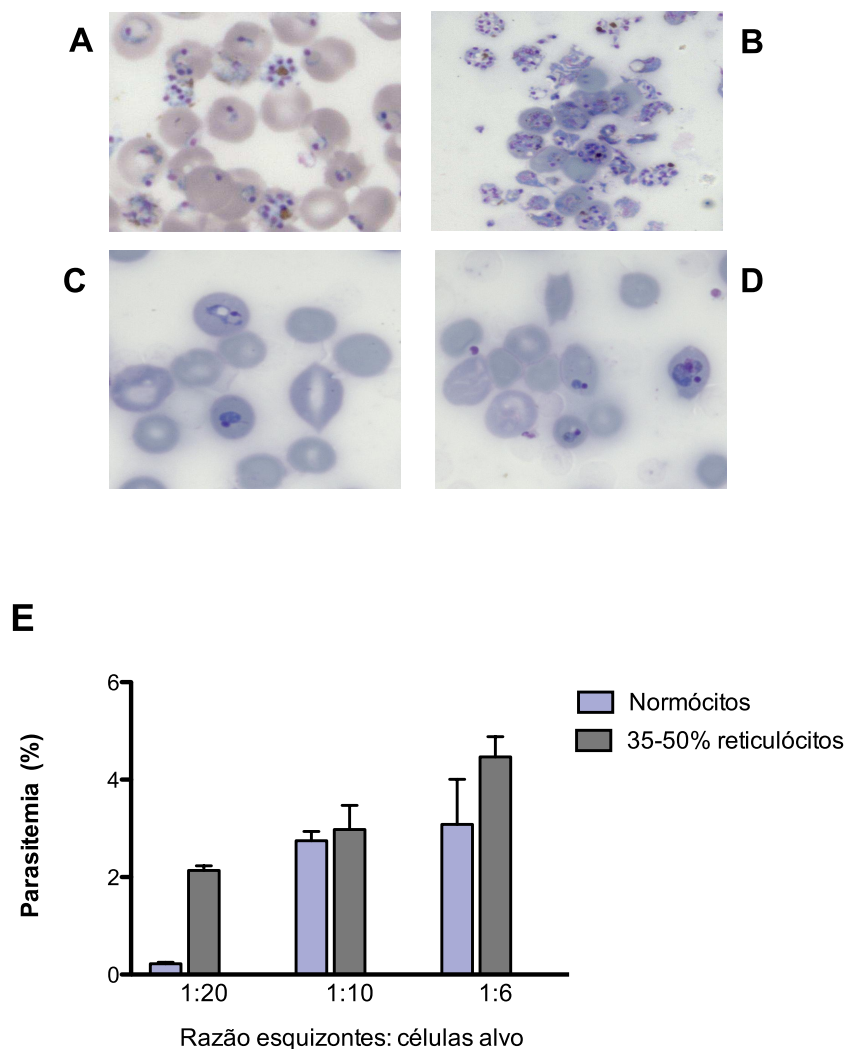
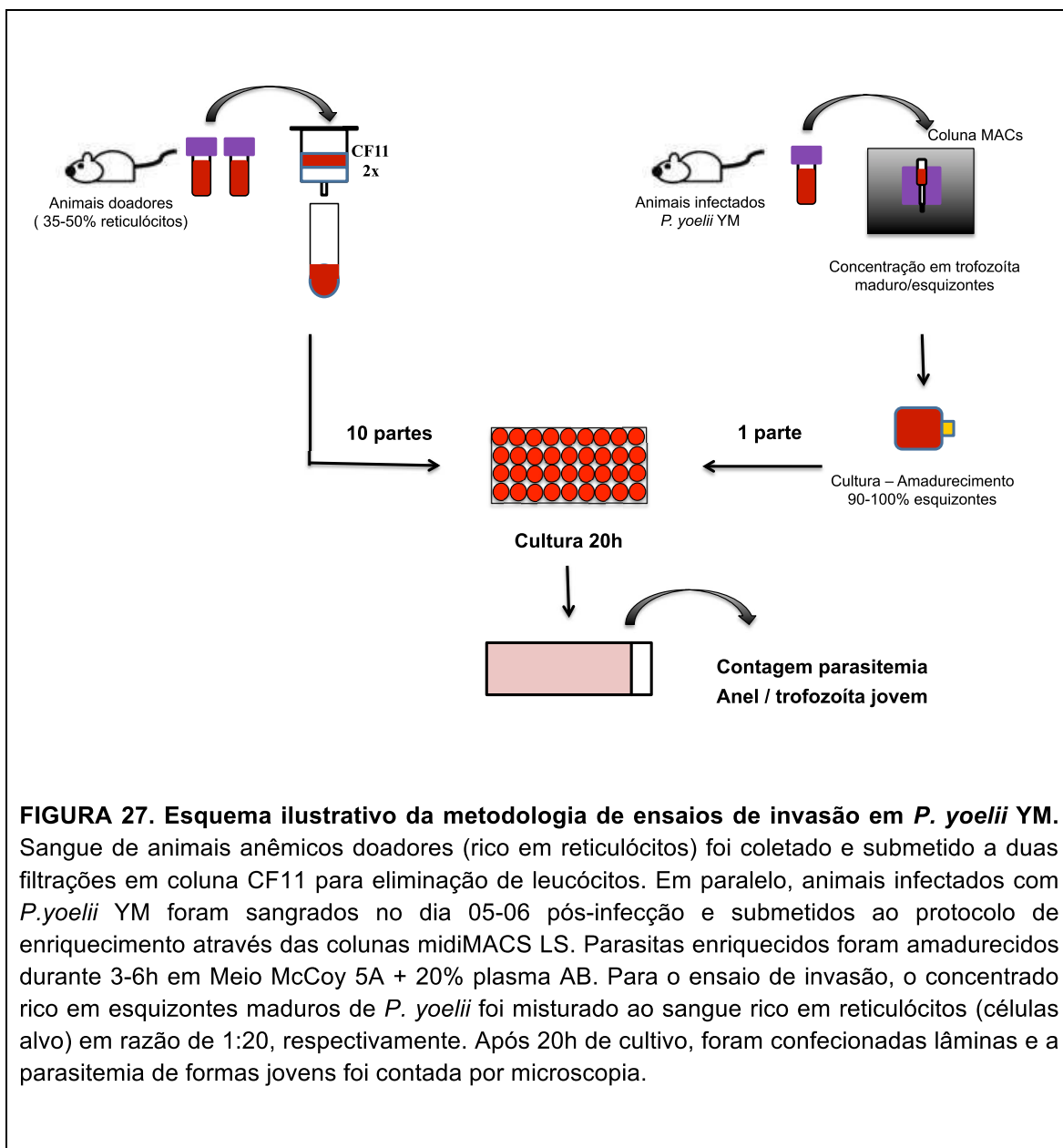


FIGURA 26. Padronização de cultura ex-vivo de *P. yoelii* YM. Animais infectados com *P. yoelii* YM foram sangrados no dia 05-06 pós infecção (pico). Dado que as infecções por *P. yoelii* são assíncronas (A), parasitas foram enriquecidos através das colunas midiMACS LS. Parasitas enriquecidos foram amadurecidos durante 3-6h em Meio McCoy 5A + 20% plasma AB adsorvido em hemácias murinas. Desta maneira, as formas do parasita foram restringidas para uma janela estreita de fase de desenvolvimento compreendendo apenas trofozoítas maduros e esquizontes (B). As células foram lavadas em meio McCoy 5A e ajustadas a 4% hematócrito e diferentes razões esquizontes: células alvo foram testadas. As culturas foram incubadas por 20h e a parasitemia foi determinada por meio de esfregaços sanguíneos contando-se pelo menos 1000 eritrócitos. Apenas anel e trofozoítas jovens foram contados porque apenas essas formas foram consideradas como resultado dos eventos da invasão que ocorreram durante a incubação (C, D). Os resultados estão expressos como a média $\pm$ DVP de três culturas (E).



Com o domínio deste ensaio, realizamos um experimento preliminar para acessar o potencial inibitório de anticorpos anti-rPyM2-MAEBL. *Pool* da 4ª dose do soro de animais imunizados com a proteína rPyM2-MAEBL diluído 1:100 foi adicionado à mistura final do ensaio de invasão. Como controle foi utilizado pool do soro da 4ª dose de animais

do grupo ACF/AIF na mesma diluição. E64 100 μ M (Sigma) foi utilizado como controle positivo de inibição para assegurar a não ruptura dos esquizontes. De acordo com a figura 28, soro de animais imunizados com a proteína rPyM2-MAEBL diluído 1:100 foi capaz de inibir em 39,55% a invasão de formas sanguíneas de *P. yoelii* YM. Esta inibição foi significativa quando comparada ao grupo ACF/AIF.

No momento estamos realizando novos ensaios na presença de soros de todos os grupos vacinais na diluição 1:50. Esperamos observar altos níveis de inibição nos grupos rPyM2-MAEBL e *prime-boost* heterólogo.

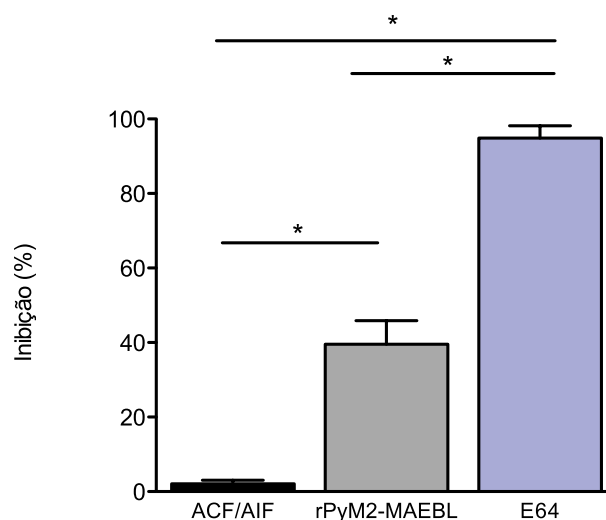


FIGURA 28 - Soro de camundongos imunizados com rPyM2-MAEBL inibem a invasão de *P. yoelii* YM. Os parasitas foram cultivados in vitro na presença do soro (*pool* da quarta dose) de camundongos imunizados com rPyM2-MAEBL diluídos 1:100. Após 20h horas de incubação a parasitemia foi determinada por meio de esfregaços sanguíneos contando-se pelo menos 1000 eritrócitos. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ DVP de três culturas. (* $P < 0.05$).

Considerações finais

Com base nos dados aqui apresentados pudemos comprovar o potencial do antígeno M2-MAEBL como um promissor candidato vacinal. Apesar do antígeno MAEBL não ser o único responsável no processo de invasão do merozoíta; conseguimos total proteção na imunização com este antígeno, além de inibir o desenvolvimento do parasita em ensaios *in vitro*.

Finalizando esta tese é importante salientar alguns pontos críticos no desenvolvimento desta. O projeto, que foi muito inovador e audacioso, contou com dificuldades na expressão da proteína recombinante PyM2-MAEBL. Inúmeras tentativas foram realizadas até a obtenção da proteína de forma satisfatória. Ainda assim, o rendimento obtido é baixo. Este fato acarreta em limitações no número de ensaios de imunização a serem realizados. Outra dificuldade encontrada foi a padronização dos ensaios de invasão ex-vivo com *P. yoelii*. Embora ainda sejam necessários alguns experimentos adicionais acreditamos que conseguimos alcançar o maior objetivo que foi demonstrar o potencial vacinal do antígeno MAEBL.

Em paralelo, vários projetos foram conduzidos e seus resultados podem ser conferidos nos artigos anexados no capítulo Artigos Publicados.

Os resultados apresentados nesta tese abrem perspectivas para novos projetos. Como por exemplo continuar avaliando os níveis de imunidade em camundongos injetados com uma vacina experimental baseada neste domínio; porem testando adjuvantes aprovados para uso no homem e também novos regimes de imunização utilizando estratégias com adenovírus recombinantes.

CONCLUSÕES

1. Foi possível expressar a proteína rPyM2-MAEBL em sistema bacteriano.
2. Apesar de insolúvel, com a adição de ureia conseguimos extrair um recombinante imunogênico e reconhecido pelo soro hiperimune de camundongos multi-infectados com *P. yoelii*.
3. Imunização com rPyM2-MAEBL apenas, ou em sistema *prime-boost* heterólogo induziu altos níveis de anticorpos capazes de reconhecer o antígeno recombinante (ELISA) e nativo em IFA com esquizontes de *P. yoelii*.
4. A resposta imune gerada protegeu animais imunizados infectados com formas letais de *P. yoelii* em 90% no grupo rPyM2-MAEBL e 100% no grupo *prime-boost* heterólogo.
5. Linfócitos T CD4+ foram essenciais na proteção de animais imunizados com rPyM2-MAEBL contra desafio letal.
6. Foi padronizada uma metodologia para ensaios ex-vivo de inibição da invasão de *P. yoelii* em eritrócitos.
7. Os soros de camundongos imunizados apenas com rPyM2-MAEBL ou do sistema *prime-boost* heterólogo foram capazes de inibir a invasão dos eritrócitos por *P. yoelii*.
8. Os anti-soros PyM2-MAEBL foram capazes de reconhecer *P. vivax* e *P. falciparum* em IFA e também inibiram a invasão dos eritrócitos em isolados de campo de ambas as espécies.
9. Os resultados obtidos destacam o potencial do antígeno M2-MAEBL como um promissor candidato vacinal e abrem perspectivas para se continuar a avaliar os níveis de imunidade de vacina experimental M2-MAEBL explorando diferentes adjuvantes e também novas estratégias de imunização como outros protocolos *prime-boost* heterólogo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, J.H., Blair, P.L., Kaneko, O., and Peterson, D.S. (2001). An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* 17, 297-299.

Agnandji, S.T., Lell, B., Fernandes, J.F., Abossolo, B.P., Methogo, B.G., Kabwende, A.L., Adegnika, A.A., Mordmuller, B., Issifou, S., Kremsner, P.G., *et al.* (2012). A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *The New England journal of medicine* 367, 2284-2295.

Agnandji, S.T., Lell, B., Soulanoudjingar, S.S., Fernandes, J.F., Abossolo, B.P., Conzelmann, C., Methogo, B.G., Doucka, Y., Flamen, A., Mordmuller, B., *et al.* (2011). First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *The New England journal of medicine* 365, 1863-1875.

Amara, R.R., Villinger, F., Altman, J.D., Lydy, S.L., O'Neil, S.P., Staprans, S.I., Montefiori, D.C., Xu, Y., Herndon, J.G., Wyatt, L.S., *et al.* (2001). Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292, 69-74.

Aponte, J.J., Menendez, C., Schellenberg, D., Kahigwa, E., Mshinda, H., Vountasou, P., Tanner, M., and Alonso, P.L. (2007). Age interactions in the development of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* and its clinical presentation. *PLoS medicine* 4, e242.

Arevalo-Herrera, M., and Herrera, S. (2001). *Plasmodium vivax* malaria vaccine development. *Molecular immunology* 38, 443-455.

Asante, K.P., Abdulla, S., Agnandji, S., Lyimo, J., Vekemans, J., Soulanoudjingar, S., Owusu, R., Shomari, M., Leach, A., Jongert, E., *et al.* (2011). Safety and efficacy of the RTS,S/AS01E candidate malaria vaccine given with expanded-programme-on-immunisation vaccines: 19 month follow-up of a randomised, open-label, phase 2 trial. *The Lancet infectious diseases* 11, 741-749.

Baird, J.K., Jones, T.R., Danudirgo, E.W., Annis, B.A., Bangs, M.J., Basri, H., Purnomo, and Masbar, S. (1991). Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg* 45, 65-76.

Barnwell, J.W., Nichols, M.E., and Rubinstein, P. (1989). In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J Exp Med* 169, 1795-1802.

Beeson, J.G., and Crabb, B.S. (2007). Towards a vaccine against *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS medicine* 4, e350.

Belnoue, E., Costa, F.T., Frankenberg, T., Vigario, A.M., Voza, T., Leroy, N., Rodrigues, M.M., Landau, I., Snounou, G., and Renia, L. (2004). Protective T cell immunity against malaria liver stage after vaccination with live sporozoites under chloroquine treatment. *J Immunol* 172, 2487-2495.

Blackman, M.J., and Bannister, L.H. (2001). Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol* 117, 11-25.

Bojang, K.A., Milligan, P.J., Pinder, M., Vigneron, L., Allouche, A., Kester, K.E., Ballou, W.R., Conway, D.J., Reece, W.H., Gothard, P., *et al.* (2001). Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *Lancet* 358, 1927-1934.

Boscardin, S.B., Kinoshita, S.S., Fujimura, A.E., and Rodrigues, M.M. (2003). Immunization with cDNA expressed by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. *Infect Immun* 71, 2744-2757.

Bouharoun-Tayoun, H., Attanath, P., Sabchareon, A., Chongsuphajaisiddhi, T., and Druilhe, P. (1990). Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med* 172, 1633-1641.

Boyle, M.J., Wilson, D.W., Richards, J.S., Riglar, D.T., Tetteh, K.K., Conway, D.J., Ralph, S.A., Baum, J., and Beeson, J.G. (2010). Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14378-14383.

Bull, P.C., Lowe, B.S., Kortok, M., Molyneux, C.S., Newbold, C.I., and Marsh, K. (1998). Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nature medicine* 4, 358-360.

Bunger, W. (1979). [Malaria plasmodia in the mouse. Parasitization of mature and immature erythrocytes by *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii* and *Plasmodium chabaudi* (author's transl)]. *Tropenmedizin und Parasitologie* 30, 198-205.

Burns, J.M., Jr., Dunn, P.D., and Russo, D.M. (1997). Protective immunity against *Plasmodium yoelii* malaria induced by immunization with particulate blood-stage antigens. *Infect Immun* 65, 3138-3145.

Butler, D. (2012). Malaria vaccine gives disappointing results. In *Nature News* (<http://www.nature.com/news/malaria-vaccine-gives-disappointing-results-1.11785>).

Camus, D., and Hadley, T.J. (1985). A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science* 230, 553-556.

Carter, R., and Mendis, K.N. (2002). Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clinical microbiology reviews* 15, 564-594.

Carvalho, B.O., Lopes, S.C., Nogueira, P.A., Orlandi, P.P., Bargieri, D.Y., Blanco, Y.C., Mamoni, R., Leite, J.A., Rodrigues, M.M., Soares, I.S., *et al.* (2010). On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis* 202, 638-647.

Cavasini, C.E., de Mattos, L.C., Couto, A.A., Couto, V.S., Gollino, Y., Moretti, L.J., Bonini-Domingos, C.R., Rossit, A.R., Castilho, L., and Machado, R.L. (2007a). Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malaria journal* 6, 167.

Cavasini, C.E., Mattos, L.C., Couto, A.A., Bonini-Domingos, C.R., Valencia, S.H., Neiras, W.C., Alves, R.T., Rossit, A.R., Castilho, L., and Machado, R.L. (2007b). *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101, 1042-1044.

Chakravarty, S., Cockburn, I.A., Kuk, S., Overstreet, M.G., Sacchi, J.B., and Zavala, F. (2007). CD8⁺ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nature medicine* 13, 1035-1041.

Chitnis, C.E., and Miller, L.H. (1994). Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med* 180, 497-506.

Chuang, I., Sedegah, M., Cicutelli, S., Spring, M., Polhemus, M., Tamminga, C., Patterson, N., Guerrero, M., Bennett, J.W., McGrath, S., *et al.* (2013). DNA prime/Adenovirus boost malaria vaccine encoding *P. falciparum* CSP and AMA1 induces sterile protection associated with cell-mediated immunity. *PLoS One* 8, e55571.

Clyde, D.F., Most, H., McCarthy, V.C., and Vanderberg, J.P. (1973). Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria. *The American journal of the medical sciences* 266, 169-177.

Coetzee, M., Craig, M., and le Sueur, D. (2000). Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol Today* 16, 74-77.

Coler, R.N., Carter, D., Friede, M., and Reed, S.G. (2009). Adjuvants for malaria vaccines. *Parasite immunology* 31, 520-528.

Collins, W.E., and Contacos, P.G. (1972). Immunization of monkeys against *Plasmodium cynomolgi* by X-irradiated sporozoites. *Nat New Biol* 236, 176-177.

Cowman, A.F., and Crabb, B.S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 124, 755-766.

Craig, A., and Scherf, A. (2000). Transcriptional analysis in *Plasmodium falciparum*. *Trends Microbiol* 8, 350-351.

Crompton, P.D., Pierce, S.K., and Miller, L.H. (2010). Advances and challenges in malaria vaccine development. *J Clin Invest* 120, 4168-4178.

Culleton, R., and Kaneko, O. (2010). Erythrocyte binding ligands in malaria parasites: intracellular trafficking and parasite virulence. *Acta tropica* 114, 131-137.

Dabire, K.R., Diabate, A., Djogbenou, L., Ouari, A., N'Guessan, R., Ouedraogo, J.B., Hougard, J.M., Chandre, F., and Baldet, T. (2008). Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malaria journal* 7, 188.

de Arruda, M., Carvalho, M.B., Nussenzweig, R.S., Maracic, M., Ferreira, A.W., and

Cochrane, A.H. (1986). Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *Am J Trop Med Hyg* 35, 873-881.

Ellis, R.D., Sagara, I., Doumbo, O., and Wu, Y. (2010). Blood stage vaccines for *Plasmodium falciparum*: current status and the way forward. *Human vaccines* 6, 627-634.

Epstein, J.E., Tewari, K., Lyke, K.E., Sim, B.K., Billingsley, P.F., Laurens, M.B., Gunasekera, A., Chakravarty, S., James, E.R., Sedegah, M., *et al.* (2011). Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic CD8(+) T cell immunity. *Science* 334, 475-480.

Fahey, J.R., and Spitalny, G.L. (1984). Virulent and nonvirulent forms of *Plasmodium yoelii* are not restricted to growth within a single erythrocyte type. *Infect Immun* 44, 151-156.

Florens, L., Washburn, M.P., Raine, J.D., Anthony, R.M., Grainger, M., Haynes, J.D., Moch, J.K., Muster, N., Sacci, J.B., Tabb, D.L., *et al.* (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 419, 520-526.

Fraser, T., Michon, P., Barnwell, J.W., Noe, A.R., Al-Yaman, F., Kaslow, D.C., and Adams, J.H. (1997). Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun* 65, 2772-2777.

Fraser, T.S., Kappe, S.H., Narum, D.L., VanBuskirk, K.M., and Adams, J.H. (2001). Erythrocyte-binding activity of *Plasmodium yoelii* apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. *Mol Biochem Parasitol* 117, 49-59.

Freeman, R.R., Trejdosiewicz, A.J., and Cross, G.A. (1980). Protective monoclonal antibodies recognising stage-specific merozoite antigens of a rodent malaria parasite. *Nature* 284, 366-368.

Garcia-Basteiro, A.L., Bassat, Q., and Alonso, P.L. (2012). Approaching the target: the path towards an effective malaria vaccine. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* 4, e2012015.

Gaur, D., Mayer, D.C., and Miller, L.H. (2004). Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *International journal for parasitology* 34, 1413-1429.

Gautret, P., Deharo, E., Chabaud, A.G., Ginsburg, H., and Landau, I. (1994). *Plasmodium vinckei vinckei*, *P. v. lentum* and *P. yoelii yoelii*: chronobiology of the asexual cycle in the blood. *Parasite* 1, 235-239.

Ghai, M., Dutta, S., Hall, T., Freilich, D., and Ockenhouse, C.F. (2002). Identification, expression, and functional characterization of MAEBL, a sporozoite and asexual blood stage chimeric erythrocyte-binding protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 123, 35-45.

Gilson, P.R., Nebl, T., Vukcevic, D., Moritz, R.L., Sargeant, T., Speed, T.P., Schofield, L., and Crabb, B.S. (2006). Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, 1286-1299.

Gnankine, O., Bassole, I.H., Chandre, F., Glitho, I., Akogbeto, M., Dabire, R.K., and Martin, T. (2013). Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) and *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae) could compromise the sustainability of malaria vector control strategies in West Africa. *Acta tropica*.

Good, M.F., Kaslow, D.C., and Miller, L.H. (1998). Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annual review of immunology* 16, 57-87.

Guerra, C.A., Howes, R.E., Patil, A.P., Gething, P.W., Van Boeckel, T.P., Temperley, W.H., Kabaria, C.W., Tatem, A.J., Manh, B.H., Elyazar, I.R., *et al.* (2010). The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e774.

Guilbride, D.L., Gawlinski, P., and Guilbride, P.D. (2010). Why functional pre-erythrocytic and bloodstage malaria vaccines fail: a meta-analysis of fully protective immunizations and novel immunological model. *PLoS One* 5, e10685.

Gupta, R.K., Relyveld, E.H., Lindblad, E.B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S., and Gupta, C.K. (1993). Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 11, 293-306.

Haynes, J.D., Dalton, J.P., Klotz, F.W., McGinniss, M.H., Hadley, T.J., Hudson, D.E., and Miller, L.H. (1988). Receptor-like specificity of a *Plasmodium knowlesi* malarial protein that binds to Duffy antigen ligands on erythrocytes. *J Exp Med* 167, 1873-1881.

Herrera, S., Corradin, G., and Arevalo-Herrera, M. (2007). An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends Parasitol* 23, 122-128.

Hill, A.V. (2011). Vaccines against malaria. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 366, 2806-2814.

Hoffman, S.L., Billingsley, P.F., James, E., Richman, A., Loyevsky, M., Li, T., Chakravarty, S., Gunasekera, A., Chattopadhyay, R., Li, M., *et al.* (2010). Development of a metabolically active, non-replicating sporozoite vaccine to prevent *Plasmodium falciparum* malaria. *Human vaccines* 6, 97-106.

Hoffman, S.L., and Doolan, D.L. (2000). Malaria vaccines-targeting infected hepatocytes. *Nature medicine* 6, 1218-1219.

Hoffman, S.L., Goh, L.M., Luke, T.C., Schneider, I., Le, T.P., Doolan, D.L., Sacci, J., de la Vega, P., Dowler, M., Paul, C., *et al.* (2002). Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis* 185, 1155-1164.

Holder, A.A., Guevara Patino, J.A., Uthapibull, C., Syed, S.E., Ling, I.T., Scott-Finnigan, T., and Blackman, M.J. (1999). Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria. *Parassitologia* 41, 409-414.

Jeamwattanalert, P., Mahakunkijcharoen, Y., Kittigul, L., Mahannop, P., Pichyangkul, S., and Hirunpetcharat, C. (2007). Long-lasting protective immune response to the 19-kilodalton carboxy-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 1 in mice. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 14, 342-347.

Kantele, A., and Jokiranta, T.S. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clin Infect Dis* 52, 1356-1362.

Kappe, S.H., Curley, G.P., Noe, A.R., Dalton, J.P., and Adams, J.H. (1997). Erythrocyte binding protein homologues of rodent malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol* 89, 137-148.

Kappe, S.H., Gardner, M.J., Brown, S.M., Ross, J., Matuschewski, K., Ribeiro, J.M., Adams, J.H., Quackenbush, J., Cho, J., Carucci, D.J., *et al.* (2001). Exploring the transcriptome of the malaria sporozoite stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9895-9900.

Kappe, S.H., Noe, A.R., Fraser, T.S., Blair, P.L., and Adams, J.H. (1998). A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1230-1235.

Kappe, S.H., Vaughan, A.M., Boddey, J.A., and Cowman, A.F. (2010). That was then but this is now: malaria research in the time of an eradication agenda. *Science* 328, 862-866.

Kariu, T., Yuda, M., Yano, K., and Chinzei, Y. (2002). MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. *J Exp Med* 195, 1317-1323.

Kester, K.E., Cummings, J.F., Ofori-Anyinam, O., Ockenhouse, C.F., Krzych, U., Moris, P., Schwenk, R., Nielsen, R.A., Debebe, Z., Pinelis, E., *et al.* (2009). Randomized, double-blind, phase 2a trial of falciparum malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naïve adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. *J Infect Dis* 200, 337-346.

Kim, P.S., and Ahmed, R. (2010). Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Curr Opin Immunol* 22, 223-230.

Kokwaro, G. (2009). Ongoing challenges in the management of malaria. *Malaria journal* 8 *Suppl 1*, S2.

Langhorne, J., Ndungu, F.M., Sponaas, A.M., and Marsh, K. (2008). Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature immunology* 9, 725-732.

Le Bras, J., and Durand, R. (2003). The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundamental & clinical pharmacology* 17, 147-153.

Leroux-Roels, G. (2010). Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine* 28 *Suppl 3*, C25-36.

Li, S., Rodrigues, M., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Esteban, M., Palese, P., Nussenzweig, R.S., and Zavala, F. (1993). Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8⁺ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5214-5218.

Lysenko, A.J., and Beljaev, A.E. (1969). An analysis of the geographical distribution of *Plasmodium ovale*. *Bull World Health Organ* 40, 383-394.

Marsh, K., and Howard, R.J. (1986). Antigens induced on erythrocytes by *P. falciparum*: expression of diverse and conserved determinants. *Science* 231, 150-153.

Marsh, K., and Kinyanjui, S. (2006). Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite immunology* 28, 51-60.

Marsh, K., and Snow, R.W. (1997). Host-parasite interaction and morbidity in malaria endemic areas. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 352, 1385-1394.

McConkey, S.J., Reece, W.H., Moorthy, V.S., Webster, D., Dunachie, S., Butcher, G., Vuola, J.M., Blanchard, T.J., Gothard, P., Watkins, K., *et al.* (2003). Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nature medicine* 9, 729-735.

McGregor, I.A. (1964). The Passive Transfer of Human Malarial Immunity. *Am J Trop Med Hyg* 13, SUPPL 237-239.

Menard, D., Barnadas, C., Bouchier, C., Henry-Halldin, C., Gray, L.R., Ratsimbao, A., Thonier, V., Carod, J.F., Domarle, O., Colin, Y., *et al.* (2010). *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5967-5971.

Mendes, C., Dias, F., Figueiredo, J., Mora, V.G., Cano, J., de Sousa, B., do Rosario, V.E., Benito, A., Berzosa, P., and Arez, A.P. (2011). Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax*--molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1192.

Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., and Doumbo, O.K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415, 673-679.

Miller, L.H., Good, M.F., and Kaslow, D.C. (1998). Vaccines against the blood stages of *falciparum* malaria. *Advances in experimental medicine and biology* 452, 193-205.

Miller, L.H., Mason, S.J., Dvorak, J.A., McGinniss, M.H., and Rothman, I.K. (1975). Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science* 189, 561-563.

Miller, L.H., McAuliffe, F.M., and Johnson, J.G. (1979). Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Prog Clin Biol Res* 30, 497-502.

Mitchell, G.H., and Bannister, L.H. (1988). Malaria parasite invasion: interactions with the red cell membrane. *Crit Rev Oncol Hematol* 8, 225-310.

Moir, S., and Fauci, A.S. (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nature reviews Immunology* 9, 235-245.

Moll, K., Ljungström, I., Perlmann, H., Scherf, A., and Wahlgren, M. (2008). *Methods in Malaria Research* (American Type Culture Collection: Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4)).

Moorthy, V.S., Good, M.F., and Hill, A.V. (2004). Malaria vaccine developments. *Lancet* 363, 150-156.

Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V., and Rodriguez, A. (2001). Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science* 291, 141-144.

Noe, A.R., and Adams, J.H. (1998). Plasmodium yoelii YM MAEBL protein is coexpressed and colocalizes with rhoptry proteins. *Mol Biochem Parasitol* 96, 27-35.

Nussenzweig, R.S., Vanderberg, J., Most, H., and Orton, C. (1967). Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. *Nature* 216, 160-162.

Ocampo, M., Curtidor, H., Vera, R., Valbuena, J.J., Rodriguez, L.E., Puentes, A., Lopez, R., Garcia, J.E., Tovar, D., Pacheco, P., *et al.* (2004). MAEBL Plasmodium falciparum protein peptides bind specifically to erythrocytes and inhibit in vitro merozoite invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 319-329.

Patarroyo, M.E., Amador, R., Clavijo, P., Moreno, A., Guzman, F., Romero, P., Tascon, R., Franco, A., Murillo, L.A., Ponton, G., *et al.* (1988). A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of Plasmodium falciparum malaria. *Nature* 332, 158-161.

Peiperl, L., Morgan, C., Moodie, Z., Li, H., Russell, N., Graham, B.S., Tomaras, G.D., De Rosa, S.C., and McElrath, M.J. (2010). Safety and immunogenicity of a replication-defective adenovirus type 5 HIV vaccine in Ad5-seronegative persons: a randomized clinical trial (HVTN 054). *PLoS One* 5, e13579.

Perlmann, H., and Troye-Blomberg, M. (2002). *Malaria Immunology*, Vol 80.

Preiser, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannister, L., and Jarra, W. (2000). The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect* 2, 1461-1477.

Preiser, P., Renia, L., Singh, N., Balu, B., Jarra, W., Voza, T., Kaneko, O., Blair, P., Torii, M., Landau, I., *et al.* (2004). Antibodies against MAEBL ligand domains M1 and M2 inhibit sporozoite development in vitro. *Infect Immun* 72, 3604-3608.

Reed, S.G., Bertholet, S., Coler, R.N., and Friede, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in immunology* 30, 23-32.

Rieckmann, K.H., Beaudoin, R.L., Cassells, J.S., and Sell, K.W. (1979). Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. *Bull World Health Organ* 57 Suppl 1, 261-265.

Rieckmann, K.H., Carson, P.E., Beaudoin, R.L., Cassells, J.S., and Sell, K.W. (1974). Letter: Sporozoite induced immunity in man against an Ethiopian strain of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68, 258-259.

Riley, E.M., and Stewart, V.A. (2013). Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nature medicine* 19, 168-178.

ROLL BACK MALARIA. Key malaria facts: (<http://www.rollbackmalaria.org/keyfacts.html>). Acesso em: 10 de Abril de 2013.

Rosenberg, R., Wirtz, R.A., Schneider, I., and Burge, R. (1990). An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84, 209-212.

Russell, B., Suwanarusk, R., Borlon, C., Costa, F.T., Chu, C.S., Rijken, M.J., Sriprawat, K., Warter, L., Koh, E.G., Malleret, B., *et al.* (2011). A reliable ex vivo invasion assay of human reticulocytes by *Plasmodium vivax*. *Blood* 118, e74-81.

Ryan, J.R., Stoute, J.A., Amon, J., Dunton, R.F., Mtalib, R., Koros, J., Owour, B., Luckhart, S., Wirtz, R.A., Barnwell, J.W., *et al.* (2006). Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 75, 575-581.

Sabchareon, A., Burnouf, T., Ouattara, D., Attanath, P., Bouharoun-Tayoun, H., Chantavanich, P., Foucault, C., Chongsuphajaisiddhi, T., and Druilhe, P. (1991). Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 45, 297-308.

Sagara, I., Dicko, A., Ellis, R.D., Fay, M.P., Diawara, S.I., Assadou, M.H., Sissoko, M.S., Kone, M., Diallo, A.I., Saye, R., *et al.* (2009). A randomized controlled phase 2 trial of the blood stage AMA1-C1/Alhydrogel malaria vaccine in children in Mali. *Vaccine* 27, 3090-3098.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning - A laboratory Manual*, 3rd. edn (Cold Spring Harbour Laboratory Press).

Schneider, J., Gilbert, S.C., Hannan, C.M., Degano, P., Prieur, E., Sheu, E.G., Plebanski, M., and Hill, A.V. (1999). Induction of CD8⁺ T cells using heterologous prime-boost immunisation strategies. *Immunological reviews* 170, 29-38.

Seder, R.A., Chang, L.J., Enama, M.E., Zephir, K.L., Sarwar, U.N., Gordon, I.J., Holman, L.A., James, E.R., Billingsley, P.F., Gunasekera, A., *et al.* (2013). Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science* 341, 1359-1365.

Sim, B.K., Chitnis, C.E., Wasniowska, K., Hadley, T.J., and Miller, L.H. (1994). Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science* 264, 1941-1944.

Sivep-Malária/SVS/MS: Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica - Malária/ Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde.

Slifka, M.K., and Ahmed, R. (1998). Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol* 10, 252-258.

Smith, J.D., Chitnis, C.E., Craig, A.G., Roberts, D.J., Hudson-Taylor, D.E., Peterson, D.S., Pinches, R., Newbold, C.I., and Miller, L.H. (1995). Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 82, 101-110.

Sripawat, K., Kaewpongsri, S., Suwanarusk, R., Leimanis, M.L., Lek-Uthai, U., Phyto, A.P., Snounou, G., Russell, B., Renia, L., and Nosten, F. (2009). Effective and cheap removal of leukocytes and platelets from *Plasmodium vivax* infected blood. *Malaria journal* 8, 115.

Srivastava, I.K., and Liu, M.A. (2003). Gene vaccines. *Annals of internal medicine* 138, 550-559.

Sullivan, N.J., Sanchez, A., Rollin, P.E., Yang, Z.Y., and Nabel, G.J. (2000). Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* 408, 605-609.

SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico da malária 2013. Situação Epidemiológica da malária no Brasil, 2000-2011:

(http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Abr/12/boletim_1_de_2013_malaria.pdf). Acessado em 02 de maio de 2013.

Swardson-Oliver, C.J., Dawson, T.C., Burnett, R.C., Peiper, S.C., Maeda, N., and Avery, A.C. (2002). *Plasmodium yoelii* uses the murine Duffy antigen receptor for chemokines as a receptor for normocyte invasion and an alternative receptor for reticulocyte invasion. *Blood* 99, 2677-2684.

Taylor-Robinson, A.W., and Phillips, R.S. (1994). B cells are required for the switch from Th1- to Th2-regulated immune responses to *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. *Infect Immun* 62, 2490-2498.

Trager, W., and Jensen, J.B. (2005). Human malaria parasites in continuous culture. 1976. *J Parasitol* 91, 484-486.

Trang, D.T., Huy, N.T., Kariu, T., Tajima, K., and Kamei, K. (2004). One-step concentration of malarial parasite-infected red blood cells and removal of contaminating white blood cells. *Malaria journal* 3, 7.

Tuteja, R. (2007). Malaria - an overview. *FEBS J* 274, 4670-4679.

Ulmer, J.B., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., Donnelly, J.J., and Liu, M.A. (1994). Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccines. *Vaccine* 12, 1541-1544.

Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., *et al.* (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259, 1745-1749.

Vasconcelos, J.R., Hiyane, M.I., Marinho, C.R., Claser, C., Machado, A.M., Gazzinelli, R.T., Bruna-Romero, O., Alvarez, J.M., Boscardin, S.B., and Rodrigues, M.M. (2004). Protective immunity against *trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Human gene therapy* 15, 878-886.

W. Ripley Ballou, J.C. (2013). malaria Vaccines. In *Vaccines*, W.A.O. Stanley A. Plotkin, Paul A. Offit, ed. (Elsevier).

Webster, D., and Hill, A.V. (2003). Progress with new malaria vaccines. *Bull World Health Organ* 81, 902-909.

Wernsdorfer, W.H., and Payne, D. (1991). The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacology & therapeutics* 50, 95-121.

Wertheimer, S.P., and Barnwell, J.W. (1989). *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. *Exp Parasitol* 69, 340-350.

Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nature immunology* 12, 492-499.

WHO (2000). Severe *falciparum* malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94 *Suppl* 1, S1-90.

Williams, T.N. (2006). Red blood cell defects and malaria. *Mol Biochem Parasitol* 149, 121-127.

Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465-1468.

World Health Organization. (2010a). Guidelines for the treatment of malaria, 2nd edn (Geneva: World Health Organization).

World Health Organization. (2010b). World malaria report: 2010 (Geneva: World Health Organization).

World Health Organization. (2012a). Management of severe malaria : a practical handbook, 3rd edn (Geneva: World Health Organization).

World Health Organization. (2012b). World malaria report 2012 (Geneva: World Health Organization).

ANEXOS



CEEAA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1437-1, sobre "Desenvolvimento de vacina experimental contra infecção por *Plasmodium yoelii* baseada no antígeno eritrocítico M2-MAEBL sistema de prime-boost heterólogo (DNA - proteína)", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa / Juliana Almeida Leite, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em 11 de fevereiro de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1437-1, entitled "Development of an experimental vaccine against *Plasmodium yoelii* infection based on the erythrocytic antigen M2-MAEBL in a heterologue prime-boost system (DNA - protein)", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on February 11, 2008.

Campinas, 10 de junho de 2013.

2ª. VIA

Profa. Dra. Ana Maria Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

ARTIGOS PUBLICADOS



Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of *Salmonella* Typhimurium

Daniel Y. Bargieri^{a,b}, Juliana A. Leite^c, Stefanie C.P. Lopes^c, Maria Elisabete Sbrogio-Almeida^d, Catarina J.M. Braga^e, Luis C.S. Ferreira^e, Irene S. Soares^f, Fabio T.M. Costa^c, Mauricio M. Rodrigues^{a,b,*}

^a Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica (CINTERGEN), Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Brazil

^b Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Rua Mirassol, 207, São Paulo 04044-010, SP, Brazil

^c Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato, 255, Campinas 13083-970, SP, Brazil

^d Instituto Butantan, Lab. Centro de Biotecnologia, Av. Vital Brazil, 1500, São Paulo 05503-900, SP, Brazil

^e Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo 05508-900, SP, Brazil

^f Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, São Paulo 05508-900, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2009

Received in revised form 30 January 2010

Accepted 3 February 2010

Available online 17 February 2010

Keywords:

P. falciparum

Vaccine

Flagellin

TLR5

ABSTRACT

In a recent study, we demonstrated the immunogenic properties of a new malaria vaccine polypeptide based on a 19 kDa C-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1₁₉) from *Plasmodium vivax* and an innate immunity agonist, the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium flagellin (FliC). Herein, we tested whether the same strategy, based on the MSP1₁₉ component of the deadly malaria parasite *Plasmodium falciparum*, could also generate a fusion polypeptide with enhanced immunogenicity. The His₆FliC-MSP1₁₉ fusion protein was expressed from a recombinant *Escherichia coli* and showed preserved *in vitro* TLR5-binding activity. In contrast to animals injected with His₆MSP1₁₉, mice subcutaneously immunised with the recombinant His₆FliC-MSP1₁₉ developed strong MSP1₁₉-specific systemic antibody responses with a prevailing IgG1 subclass. Incorporation of other adjuvants, such as CpG ODN 1826, complete and incomplete Freund's adjuvants or Quil-A, improved the IgG responses after the second, but not the third, immunising dose. It also resulted in a more balanced IgG subclass response, as evaluated by the IgG1/IgG2c ratio, and higher cell-mediated immune response, as determined by the detection of antigen-specific interferon- γ secretion by immune spleen cells. MSP1₁₉-specific antibodies recognised not only the recombinant protein, but also the native protein expressed on the surface of *P. falciparum* parasites. Finally, sera from rabbits immunised with the fusion protein alone inhibited the *in vitro* growth of three different *P. falciparum* strains. In summary, these results extend our previous observations and further demonstrate that fusion of the innate immunity agonist FliC to *Plasmodium* antigens is a promising alternative to improve their immunogenicity.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Plasmodium falciparum is estimated to cause around 250 million malaria cases every year, leading to 1 million deaths, mostly of children under 5 years of age [1]. Drug resistance to this parasite has emerged, reducing the efficacy of conventional treatment

and often contributing to malaria-related mortality [2]. Therefore, prophylactic alternatives, such as effective vaccines, are urgently needed.

Immunity to malaria is a multi-factorial process that involves various components of the adaptive immune system. Antibody and T-cell mediated mechanisms cooperate to establish resistance to pre- and erythrocytic forms of the parasite. A number of target antigens have been described and are being pursued for the development of a recombinant subunit malaria vaccine, as extensively reviewed [3–6]. Recent phase II clinical trials were performed in African children using a recombinant malaria vaccine that is based on a pre-erythrocytic antigen, the circumsporozoite (CS) protein, in the presence of the adjuvant AS01E or AS02D. Children immunised

* Corresponding author at: CINTERGEN, UNIFESP, Escola Paulista de Medicina, Rua Mirassol, 207, São Paulo 04044-010, SP, Brazil. Tel.: +55 11 5571 1095; fax: +55 11 5571 1095.

E-mail addresses: mrodrigues@unifesp.br, mrodrigues@ecb.epm.br (M.M. Rodrigues).

with the vaccine formulations RTS,S/AS01E or RTS,S/AS02D displayed a significant reduction in the incidence of naturally acquired infection, indicating that a certain degree of protective immunity was indeed achieved. In spite of the success, immunity was not ideal because a significant part of the RTS,S/AS01E or RTS,S/AS02D vaccinated children still contracted the infection during the trials [7,8].

Considering the fact that the RTS,S/AS01E and RTS,S/AS02D vaccines did not provide an optimal degree of protective immunity against malaria, a search for new vaccines with improved efficacy is required. One possible approach to achieve this goal is the identification of additional target antigens. Merozoite surface protein 1 (MSP-1) is expressed by the pre- and erythrocytic stages of *P. falciparum* and represents a promising malaria vaccine candidate [9]. The protein is synthesised in a precursor form with a high molecular weight during schizogony and, during the invasion process, a proteolytic cleavage releases most of the molecule from the merozoite membrane, leaving a membrane-anchored 19 kDa fragment (MSP1₁₉) on the parasite surface [10]. Genetic modification studies with malaria parasites demonstrated that the essential role of MSP1₁₉ in parasite survival during *in vivo* replication is similar among even distantly related *Plasmodium* species [11]. More recently, studies using clonal conditional mutagenesis showed that silencing MSP-1 in sporozoites impaired subsequent merozoite formation in the liver, implicating this molecule in the life cycle of the parasite in the liver as well as in the blood [12].

Over the past 20 years, many studies have been performed that support the use of MSP1₁₉ as a component of subunit-based malaria vaccine formulations. Monoclonal antibodies against MSP1₁₉ and polyclonal antibodies against MSP1₄₂ inhibit the *in vitro* growth of *P. falciparum* [10,13]. In addition, non-human primates injected with recombinant proteins containing the C-terminal region of the *P. falciparum* MSP-1 expressed in baculovirus [14–16], *Saccharomyces cerevisiae* [17], *Escherichia coli* [16,18,19] and mammalian cells [20] are protected against homologous challenge with the parasite. Nonetheless, the lack of an effective malaria vaccine formulation, either based on MSP-1 or other antigens, is often explained by the lack of adequate adjuvants that could be used in humans to promote high and long-lasting antibody responses to the target recombinant proteins.

Recent advances in the field of innate immunity have disclosed the cellular and molecular mechanisms behind the adjuvant effects of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). The recognition of PAMPs in mammalian cells is mediated by innate immune receptors such as TLR5 (specific for bacterial flagellins) and TLR9 (specific for unmethylated CpG DNA), which are expressed by antigen-presenting cells (APC). Following the binding of the specific agonists, the intracellular domain of the TLR receptor activates molecular signalling cascades and promotes the recruitment of adaptor proteins, such as the myeloid differentiation factor 88 (MyD88), and the activation of transcription factors, such as NF- κ B and mitogen-activated kinases. These signalling events result in the activation of inflammatory responses and APC maturation, which mediate the activation of T and B cell-dependent adaptive immune responses [21,22].

Flagellins, the structural subunit of flagellar filaments, contribute both to the virulence of bacterial pathogens and to the activation of inflammatory responses in mammalian hosts [21,22]. Bacterial flagellins have been shown to bind extracellular TLR5 as well as intracellular receptors, leading to strong inflammatory responses [23–30]. Flagellins, such as those expressed by *Salmonella* species, have shown strong adjuvant effects when delivered via parenteral or mucosal routes and either admixed or genetically linked to target antigens in mice [31–42] and in non-human primates [43–45]. In a recent work, we generated a recombinant protein consisting of the flagellin FliC of *Salmonella*

enterica Typhimurium fused to the MSP1₁₉ of *Plasmodium vivax*. Mice immunised with the fusion protein in the absence of adjuvant elicited high and long-lasting antibody titres that recognised the parasite in the blood of infected patients [46]. We also showed that the fusion process did not change the antigenic properties of the malaria antigen or the capacity of flagellin to signals through the innate immunity receptor TLR5.

Here we investigated the immunogenicity of a fusion polypeptide containing the *P. falciparum* MSP1₁₉ and an innate immunity agonist, the *Salmonella* Typhimurium FliC flagellin. The immunogenicity of the recombinant fusion protein was assessed by immunisation of mice and rabbits with the recombinant protein alone or in the presence of different adjuvants, such as the TLR9 agonist CpG ODN 1826, Quil-A or complete and incomplete Freund's adjuvants. Additionally, we investigated whether the anti-MSP1₁₉ antibodies recognised the malaria parasites and impaired *in vitro* parasite growth. The reported results demonstrate that the incorporation of TLR agonists into MSP1₁₉-based formulations represents an alternative for the development of new, simple and inexpensive malaria vaccine candidates.

2. Methods

2.1. Generation of recombinant MSP1₁₉-derived proteins

The *S. Typhimurium* FliC and MSP1₁₉ gene sequences were obtained by PCR amplification using Platinum Taq High Fidelity DNA polymerase (Invitrogen). Template DNA for the amplifications were obtained from *S. Typhimurium* and *P. falciparum* 3D7 blood stages. Specific oligonucleotides for the amplification of the FliC gene, containing EcoRI and HindIII restriction sites (GGGGAATTCATGGCACAAGTCATTAATACA and GGCAAGCTTGACGCAGTAAAGAGAGGAC), and the MSP1₁₉ nucleotide sequence, containing HindIII and XhoI restriction sites (GGCAAGCTTCGGGAAAATCCAAGATATG and GGGCTCGAGTT-TAACTGCAGAAAATACCATC), were purchased from Integrated DNA Technologies, Inc. Amplified fragments were cloned in frame in the pET28a vector (Novagen). The recombinant protein was expressed and purified as described previously [47]. Briefly, recombinant *E. coli* BL21 DE3 (Novagen) was cultivated at 37 °C in flasks containing Luria broth (LB) and kanamycin (30 µg/ml). Protein expression was induced at an OD₆₀₀ of 0.6 with 0.1 mM IPTG (Invitrogen) for 4 h. After centrifugation, bacteria were lysed on ice with the aid of an ultrasonic processor (Sonics and Materials INC Vibra Cell VCX 750) in a phosphate buffer with 1.0 mg/ml of lysozyme (Sigma) and 1 mM PMSF (Sigma). Bacterial lysate was centrifuged, and the supernatant was applied to a column with Ni²⁺-NTA-agarose resin (Qiagen). After several washes, bound proteins were eluted with 0.5 M imidazole (Sigma). The eluted protein was dialysed against 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), and the recombinant proteins were purified by ion-exchange chromatography using a Resource Q column (GE Healthcare) coupled to an FPLC system (GE Healthcare). Fractions containing the recombinant proteins with a high degree of purity were pooled and extensively dialysed against phosphate-buffered saline (PBS). Protein concentration was determined with the Bradford assay and by SDS-PAGE analyses.

2.2. FliC purification

Native *S. Typhimurium* FliC was purified from the attenuated *S. Typhimurium* SL3201 strain, which expresses FliC, but not FljB [48]. Briefly, bacteria were grown in LB supplemented with kanamycin (30 µg/ml) overnight at 37 °C under aeration (80 rpm). Cells were washed once with PBS and submitted to mechanical shearing for

four, 2 min cycles in a bench vortex mixer. The cell suspensions were centrifuged to remove the cellular debris, and following acetone precipitation, the flagellar filaments were collected from the supernatant and suspended in PBS. The purity of the preparations was monitored by SDS-PAGE. The recombinant FLiC (rFLiC) was obtained after cloning the corresponding gene into the pET28a expression vector as previously reported [46]. The recombinant vector was introduced into the *E. coli* BL21 DE3 strain, and the encoded peptide was subsequently purified by affinity chromatography based on standard procedures [46].

2.3. Immunisation regimens

Six- to eight-week-old female C57BL/6 (H-2^b) mice were purchased from the Federal University of São Paulo, Brazil. C57BL/6 TLR4 knock-out mice were kindly provided by Dr. Shizuo Akira at Osaka University, Japan. Experiments were performed in accordance with the guidelines of the Ethics Committee for Animal Handling of the Federal University of São Paulo. Mice were immunised three times, 3 weeks apart, subcutaneously in the two hind footpads, using a final volume of 50 µl in each footpad (first dose) and a final volume of 100 µl at the base of the tail (second and third doses). For each dose, 5 µg of His₆MSP1₁₉ or 25 µg of the fusion protein was used. CpG ODN 1826 (TCCATGACGTTCTGACGTT) was synthesised with a nuclease-resistant phosphorothioate backbone (Coley Pharmaceutical Group); a dose of 10 µg per mouse was admixed with the antigen just before injection. A dose of 2.5 µg of Quil-A (Superfos Biosector a/s) per mouse was alternatively admixed with the antigen just before injection. Complete (CFA) and incomplete (IFA) Freund's adjuvants (Sigma) were emulsified extensively with the proteins (1:1, v/v) prior to injection. For CFA/IFA immunisation regimens, CFA was used for the first dose, and IFA was used for the subsequent doses. Rabbits were immunised four times s.c. in the back skin with 200 µg of His₆FLiC-MSP1₁₉ or 50 µg of FLiC.

2.4. Immunological assays

Serum anti-MSP1₁₉ antibodies were detected by ELISA essentially as described previously [47]. The recombinant His₆MSP1₁₉ (200 ng/well) antigen was employed as the solid phase bound antigen. A peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma) or goat anti-rabbit IgG (Sigma) was applied at a final dilution of 1:2000, while the mice or rabbit sera were tested at serial dilutions starting from 1:200. Specific anti-MSP1₁₉ titres were determined as the highest dilution yielding an OD₄₉₂ higher than 0.1. Detection of IgG subclass responses was performed as described above, except that the secondary antibody was specific for mouse IgG1, IgG2b and IgG2c (Southern Technologies). The results are presented as mean ± SD.

The amount of IFN-γ secreted into cell culture supernatants was determined with 10⁶ spleen cells collected from different immunisation groups and cultivated in flat-bottom 96-well plates in a final volume of 200 µl. The His₆MSP1₁₉ protein was added to the culture at a final concentration of 1 or 10 µg/ml. After 120 h, the supernatants were collected for cytokine determination. Cytokine concentration was estimated by capture ELISA using antibodies and recombinant cytokines purchased from Pharmingen (San Diego, CA) as previously described [49]. The cytokine concentration in each sample was determined with standard curves created with known concentrations of recombinant mouse IFN-γ. The detection limit of the assay was 0.2 ng/ml.

Determination of TLR5 bioactivity with native or recombinant flagellins, as well as with His₆MSP1₁₉ or His₆FLiC-MSP1₁₉, was performed with a HEK293 cell line expressing mouse TLR5 (Invivogen). This cell line does not display TLR-expression and is irresponsive

to stimulation with TLR agonists unless the receptors are transfected. The cells were maintained in DMEM media supplemented with 10% FBS and 10 µg/ml of blasticidin. Non-transfected or TLR5-transfected HEK293 cells (5 × 10⁴ cells/well) were grown overnight in 96-well plates and stimulated with the recombinant proteins for 5 h. The culture supernatants were collected, and the concentration of secreted human HuIL-8 was measured using a Human IL-8 ELISA Kit (BD Biosciences) following the protocol recommended by the manufacturer.

2.5. Cultivation of *P. falciparum*-infected erythrocytes

P. falciparum 3D7, FCR3 [50] and S20 [51] strains were cultured in candle jars as described elsewhere [52]. Briefly, *P. falciparum*-infected erythrocytes were cultivated in fresh type O⁺ human erythrocytes (Blood Center - UNICAMP) suspended at a 4% final hematocrit in complete medium (RPMI 1640; Sigma) supplemented with 10% of homologous human plasma and adjusted to pH 7.2. In some experiments, parasites were synchronised (±6 h) by repeated 5% sorbitol treatment as described elsewhere [53].

2.6. *P. falciparum* slide preparation and indirect immunofluorescence assay (IIA)

Assays were performed with 10-well IIA slides containing late stage forms of *P. falciparum* enriched in a Voluven® (Fresenius) gradient as described elsewhere [53]. The infected erythrocytes were diluted 1:1 in fetal bovine serum (FBS), spread on IIA slides (20 µl/well), fixed in acetone for 10 min and air dried. Pooled sera from different immunisation groups were diluted 1:100 in PBS, applied to the slides and kept for 30 min in a humid chamber at 37 °C. The slides were extensively washed with PBS and incubated with 20 µg/ml of Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) and 100 µg/ml of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Molecular Probes) for 30 min in a humid chamber at 37 °C. After several washes with PBS, the slides were sealed with coverslips and viewed under an immunofluorescence microscope. For liquid phase IIA, the infected erythrocytes were fixed in 2% paraformaldehyde and then diluted in FBS. Pooled sera from rabbits were added in a final dilution of 1:20 and kept for 60 min at 37 °C. After two washes with FBS, the cells were incubated with 100 µg/ml of Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) and 200 µg/ml of DAPI (Molecular Probes) for 30 min at 37 °C. The cells were washed twice with FBS and viewed under an immunofluorescence microscope on slides sealed with coverslips.

2.7. Growth inhibition assay (GIA)

The merozoite invasion inhibition assay using the sera from the rabbits was essentially performed as previously described [54]. Briefly, trophozoite synchronised *P. falciparum* 3D7, S20 and FCR3 cultures with a parasitemia of 4.0% and a hematocrit of 4.0% were cultured in micro-plates (50 µl) in the presence of increasing concentrations of rabbit sera at 37 °C for 24–30 h. As positive control, we used a pool of 4 human sera collected from malaria immune adults from Ghana kindly provided by Dr. Marcelo U. Ferreira (University of São Paulo). In order to quantify the parasitemia, blood smears from each well were stained with Giemsa and then analysed by counting the number of rings in at least 500 erythrocytes.

2.8. Statistical analyses

One-way ANOVA, Student's *t*-test, Tukey's HSD test and Kruskal–Wallis one-way analysis of variance were used to compare

the differences between the mean values of the tested immunisation groups.

3. Results

3.1. Production, purification and TLR5 bioactivity of flagellin-related peptides

In the present study, we generated two recombinant proteins: the *P. falciparum* MSP1₁₉ peptide linked to a hexa-histidine tag (His₆MSP1₁₉) and a fusion protein consisting of the MSP1₁₉ peptide linked to the C-terminal end of FliC (His₆FliC-MSP1₁₉). The schematic representation of each of the recombinant polypeptides and purified proteins separated by SDS-PAGE are presented in Fig. 1A and B, respectively. The native FliC protein purified from the monophasic *S. Typhimurium* SL3201 strain was used as control in the immunologic assays.

To determine whether the fusion polypeptide retained the ability to bind to TLR5, HEK293 cells transfected with the mouse TLR5 receptor gene were cultured in the presence of increasing concentrations of the recombinant protein and recombinant or native FliC (positive controls). Exposure to both the native and recombinant *S. Typhimurium* FliC and to the hybrid His₆FliC-MSP1₁₉ protein induced the production of HuIL-8 by TLR5-transfected HEK293 cells (Fig. 1C). On a molar basis, all proteins showed similar HuIL-8 induction. In contrast, TLR5-transfected HEK293 cells exposed to His₆MSP1₁₉ protein did not secrete significant levels of HuIL-8. We also used as control non-transfected HEK293 cells. After exposure to the recombinant proteins these cells did not produce HuIL-8 (Fig. 1C). These results clearly demonstrate that the MSP1₁₉ C-terminal fusion did not impair the TLR5-specific bioactivity of the FliC in the *E. coli* recombinant protein.

3.2. Induction of MSP1₁₉-specific antibody responses in mice immunised with MSP1₁₉-derived peptides genetically fused to FliC

The serum IgG responses to *P. falciparum* MSP1₁₉ were determined in C57BL/6 mice immunised subcutaneously with the purified His₆MSP1₁₉ protein (5 µg/dose) emulsified in complete or incomplete Freund's adjuvant (CFA/IFA). Mice parenterally immunised with the recombinant protein in the presence of CFA/IFA developed significantly higher MSP1₁₉-specific IgG titres than mice immunised with the His₆MSP1₁₉ protein alone ($p < 0.01$). Maximal IgG antibody titres were achieved after the second dose (Fig. 2A). Mice immunised with the recombinant fusion protein His₆FliC-MSP1₁₉ alone developed significantly higher MSP1₁₉-specific IgG titres than mice immunised with the His₆MSP1₁₉ protein alone ($p < 0.01$). Mice immunised twice with the recombinant His₆FliC-MSP1₁₉ protein or with His₆MSP1₁₉ emulsified in CFA/IFA showed a statistically significant difference in their MSP1₁₉-specific antibody titres in favour of the latter group ($p < 0.01$). Nevertheless, after a third immunising dose, no difference was observed between the specific IgG titres from these two mouse groups ($p > 0.05$), indicating that, after three doses, the fusion to FliC conferred the same immunogenicity to the hybrid MSP1₁₉ protein as the non-fused antigen emulsified in CFA/IFA, as measured by the serum antigen-specific IgG levels (Fig. 2A). The adjuvant effect of His₆FliC-MSP1₁₉ cannot be attributed to contaminating LPS since immunisation of C57BL/6 TLR4 knock-out mice (non-responsive to LPS) with His₆FliC-MSP1₁₉ elicited MSP1₁₉-specific IgG responses similar to those found in wild type mice (data not shown).

Addition of other adjuvants to His₆FliC-MSP1₁₉, specifically CpG ODN 1826, CFA, IFA and Quil-A, increased the antigen-specific antibody responses when compared to mice immunised only with

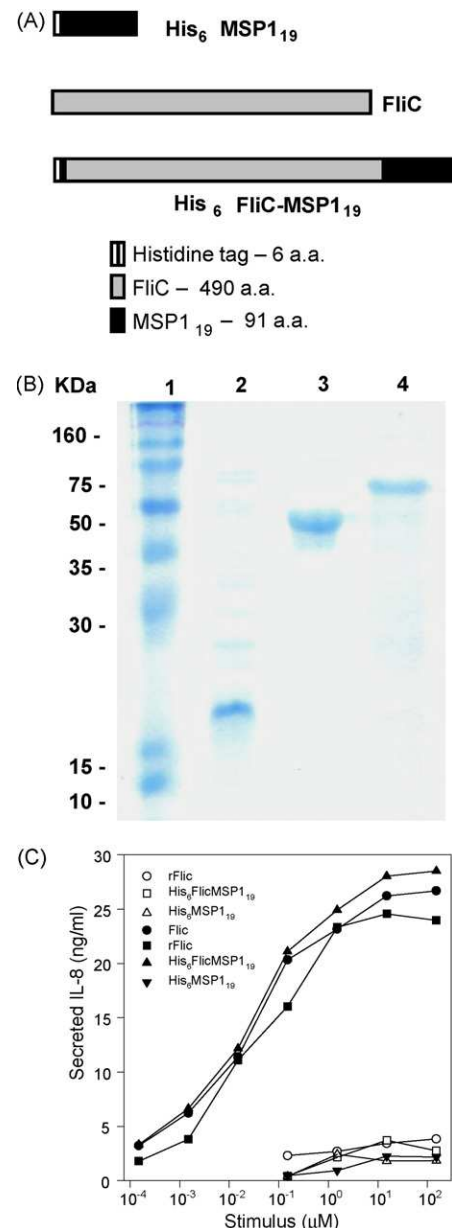


Fig. 1. Generation and characterisation of recombinant *P. falciparum* MSP1₁₉-derived peptides. (A) Schematic representation of the recombinant proteins used in the present study. (B) SDS-PAGE analysis of the recombinant proteins. Lanes: 1, molecular weight markers; 2, purified His₆MSP1₁₉ protein; 3, purified *S. Typhimurium* FliC flagellin; 4, purified recombinant His₆FliC-MSP1₁₉ protein. Each lane was loaded with approximately 1 µg of protein, separated on a 15% polyacrylamide gel and stained with Coomassie Blue. (C) HuIL-8 secretion by TLR5-transfected HEK293 cells. Non-transfected HEK293 cells (white symbols) and TLR5-transfected HEK293 cells (black symbols) were stimulated for 5 h with different concentrations of native FliC, recombinant FliC (rFliC), His₆MSP1₁₉ or His₆FliC-MSP1₁₉ antigens as indicated. The amount of secreted HuIL-8 in culture supernatant was determined by capture ELISA. Data are representative of two experiments with similar results.

the His₆FliC-MSP1₁₉ antigen ($p < 0.05$), as observed by comparison of the specific IgG titres following the two immunising doses. However, after three doses, the presence of adjuvants did not significantly change the magnitude of the MSP1₁₉-specific IgG responses (Fig. 2A). These results clearly show that immunisation with the MSP1₁₉-peptide fused to FliC was capable of inducing high IgG antibody titres even in the absence of other admixed adjuvants.

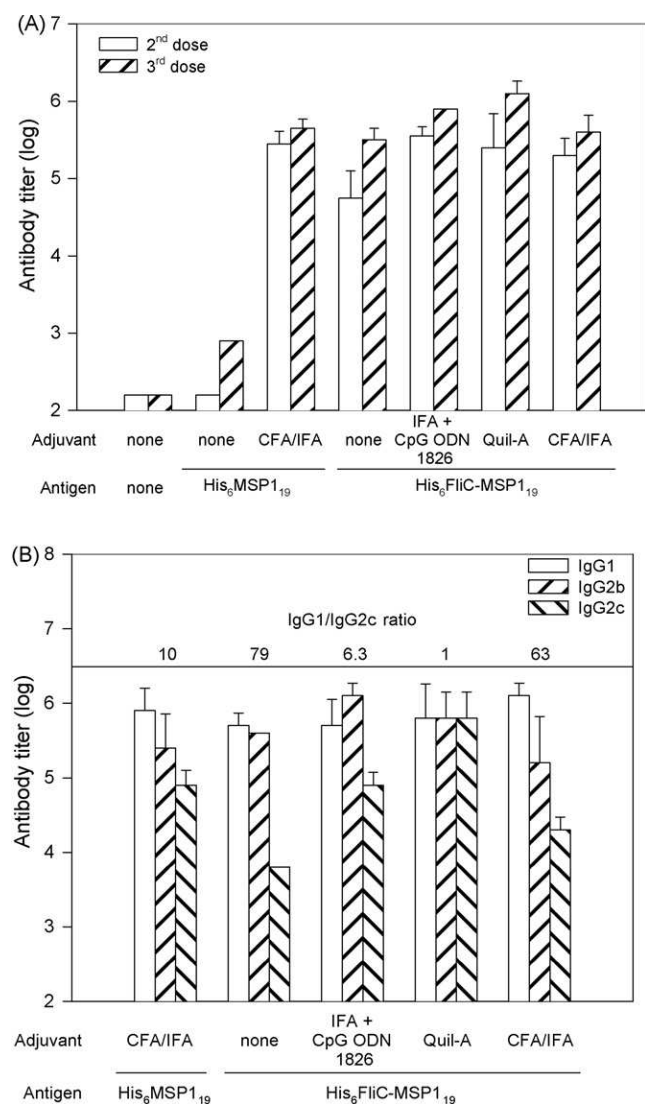


Fig. 2. Induction of total IgG responses to MSP1₁₉ and Ig subclass determination in serum samples of mice immunised with the malarial recombinant proteins. Female C57BL/6 mice were immunised three times, either with 5 µg of the recombinant protein His₆MSP1₁₉ alone or emulsified in CFA/IFA (1:1, v/v), or with 25 µg of the recombinant fusion protein His₆FliC-MSP1₁₉ alone or admixed with the following adjuvant formulations: (i) 10 µg of CpG ODN 1826 emulsified in IFA (1:1, v/v), (ii) 2.5 µg Quil-A and (iii) CFA/IFA (1:1, v/v). (A) MSP1₁₉-specific total IgG titres after the second and third doses. All mice immunised with His₆MSP1₁₉ in CFA/IFA or with His₆FliC-MSP1₁₉ had higher IgG titres than the control groups ($p < 0.01$). (B) IgG subclass responses and IgG1/IgG2c ratios in mice submitted to the different immunisation regimens. Data are representative of two experiments using six mice per group.

In order to determine the quality of the humoral immune responses, we measured the IgG subclasses of the MSP1₁₉-specific antibody responses elicited in mice parenterally immunised with the recombinant proteins. Mice immunised with His₆MSP1₁₉ emulsified in CFA/IFA developed high MSP1₁₉-specific IgG1, IgG2b and IgG2c titres, with an IgG1/IgG2c ratio equal to 10 (Fig. 2B). The recombinant fusion protein His₆FliC-MSP1₁₉ alone induced a less balanced subclass response, with low IgG2c and high IgG1 and IgG2b MSP1₁₉-specific titres and an IgG1/IgG2c ratio equal to 79 (Fig. 2B). The addition of other adjuvants to the His₆FliC-MSP1₁₉ immunisation regimen was not capable of changing the MSP1₁₉-specific IgG1 or IgG2b responses, but addition of IFA plus CpG ODN 1826, or Quil-A increased the MSP1₁₉-specific IgG2c subclass

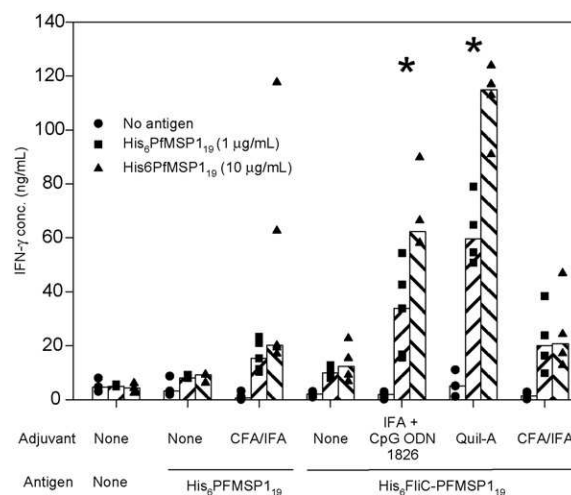


Fig. 3. IFN-γ secretion by *in vitro*-cultured spleen cells harvested from vaccinated mice. Splenocytes collected from different mouse groups immunised as described in Fig. 2 were cultured in medium alone or in the presence of the His₆MSP1₁₉ protein (1 or 10 µg/ml) for 120 h. The IFN-γ concentration in the culture supernatants was monitored by ELISA. Results are expressed as individual values for each animal and bars represent the median. Data are representative of two experiments using four or five mice per group. Asterisks denote that values obtained from mice immunised with the recombinant fusion protein His₆FliC-MSP1₁₉ in the presence of adjuvants CpG ODN 1826 emulsified in IFA or Quil-A were significantly higher than the values obtained from mice immunised only with His₆FliC-MSP1₁₉ ($p < 0.01$ for both antigen concentrations, Kruskal–Wallis).

response, leading to a more balanced IgG1/IgG2c ratio (6.3 and 1.0, respectively) (Fig. 2B).

3.3. Incorporation of CpG ODN 1826 and IFA, or Quil-A to the fusion protein induced more IFN-γ secretion by immune spleen cells in response to His₆MSP1₁₉ *in vitro*

To further characterise the cellular-mediated immune responses (CMI) induced by vaccination with the recombinant proteins, we determined the secreted IFN-γ produced by spleen cells of mice immunised with the different vaccine formulations. As shown in Fig. 3, spleen cells from mice immunised with His₆MSP1₁₉ secreted IFN-γ in response to the antigen only when administered with the CFA/IFA emulsion. On the other hand, spleen cells from mice immunised with His₆FliC-MSP1₁₉, even when administered in the absence of other adjuvants, secreted modest, but significant, amounts of IFN-γ following incubation with the recombinant protein. Nevertheless, addition of IFA/CpG ODN 1826 or Quil-A to the formulations containing His₆FliC-MSP1₁₉ improved the cellular immunogenicity of the antigen, as measured by the amount of IFN-γ secreted by spleen cells upon *in vitro* stimulation (Fig. 3). Together, these results indicate that the addition of the TLR9 agonist CpG ODN 1826 or Quil-A balanced the immune response pattern and improved the activation of specific cell-dependent immune responses, as evaluated by the IFN-γ secretion from spleen cells.

3.4. Antibodies generated in mice immunised with His₆FliC-MSP1₁₉ recognised *in vitro*-cultured *P. falciparum* 3D7 parasites

Sera from mice immunised with His₆FliC-MSP1₁₉ were used in immunofluorescence assays with *P. falciparum* 3D7 parasites cultured under *in vitro* conditions. The MSP1₁₉-specific antibodies bound to epitopes exposed on the surface of the parasites, clearly show that the antibody immune responses raised after immunisation

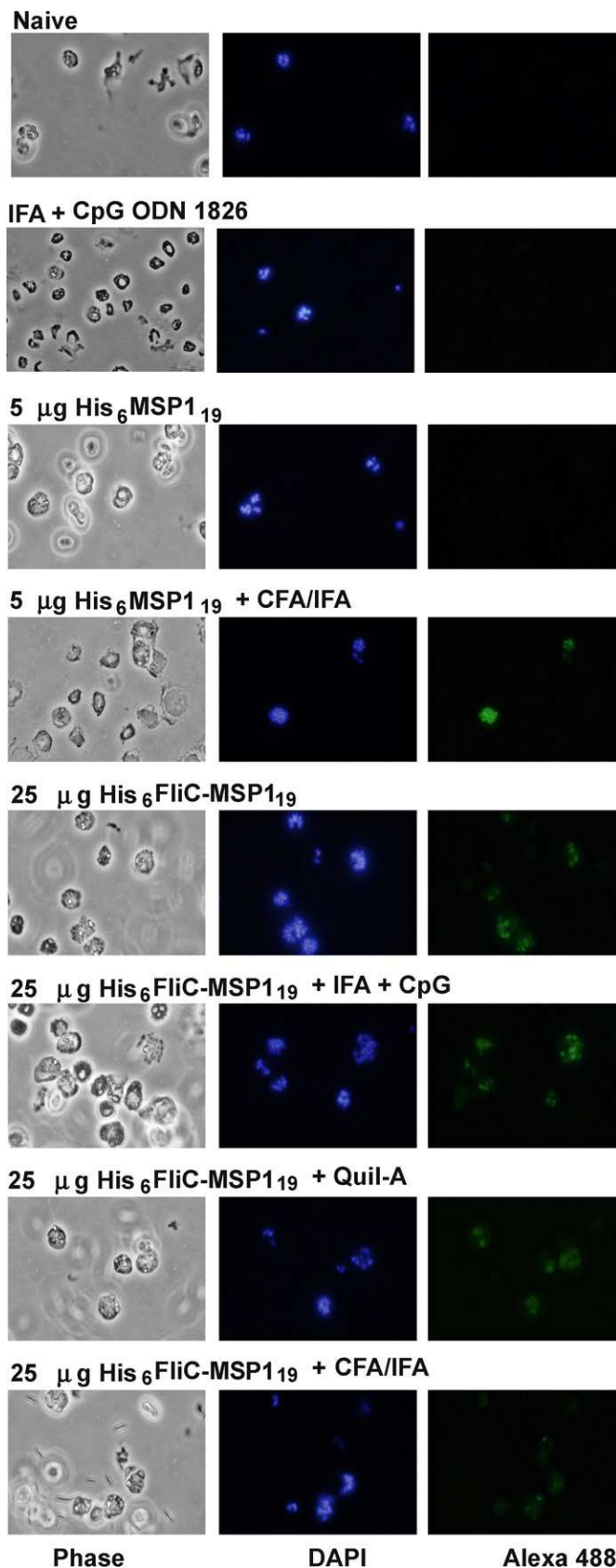


Fig. 4. MSP1₉-specific antibodies generated in vaccinated mice recognise the native protein expressed by *P. falciparum* 3D7 parasites. Glass slides containing infected cells were incubated with pooled sera, diluted 1:100 in PBS, from mice immunised as indicated. IIA were carried out with bound IgG stained with Alexa Fluor 488. Parasite nuclei were stained with DAPI. Data are representative of two experiments with similar results.

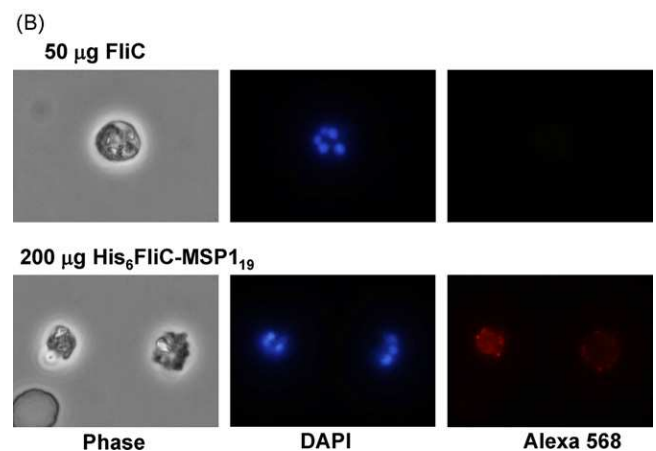
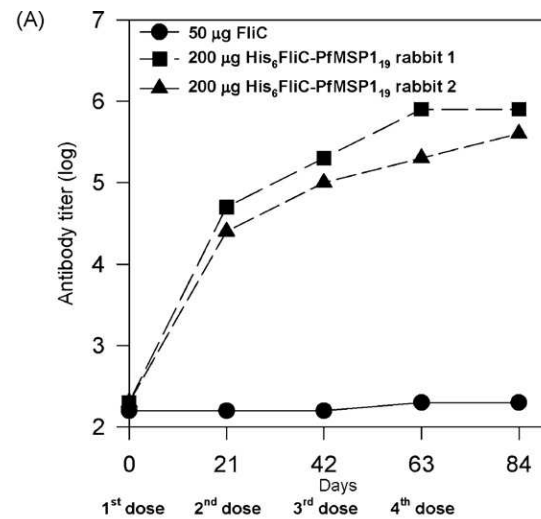


Fig. 5. Rabbits immunised with His₆FliC-MSP1₉ induced specific anti-MSP1₉ antibodies that recognise *P. falciparum* parasites. Two rabbits were immunised with four, 200 µg doses of His₆FliC-MSP1₉, and one rabbit received four, 50 µg doses of FliC. (A) MSP1₉-specific total IgG titres after each dose. The rabbits immunised with His₆FliC-MSP1₉ had higher IgG titres than the rabbit immunised with FliC ($p < 0.01$). (B) After four immunising doses, serum samples were tested in liquid phase IIA with *P. falciparum* 3D7 parasites. Surface bound IgG was stained with Alexa Fluor 568, while parasite nuclei were detected with DAPI.

tion with the recombinant proteins are specific against the epitopes that are naturally expressed by the parasite (Fig. 4).

3.5. Immunisation of rabbits with His₆FliC-MSP1₉ induced antibodies that inhibited invasion of parasites of distinct strains in vitro

Two rabbits were immunised with His₆FliC-MSP1₉, and a third rabbit was immunised with FliC as a control. The two rabbits injected subcutaneously with His₆FliC-MSP1₉ raised higher specific anti-MSP1₉ IgG titres as compared to the animal injected with FliC ($p < 0.01$), which had undetectable anti-MSP1₉ titres (Fig. 5A). The anti-MSP1₉ IgG titres in the immunised rabbits achieved maximal values following the third dose (Fig. 5A). Additionally, pooled sera from the two rabbits immunised with His₆FliC-MSP1₉ labelled surface-exposed epitopes of the *P. falciparum* 3D7 strain, in contrast to the serum harvested from the rabbit immunised with FliC (Fig. 5B).

After four immunising doses, the sera of the three rabbits were used to perform growth inhibition assays (GIAs) with the parasites of three *P. falciparum* strains. The *P. falciparum* 3D7, S20 and

FCR3 strains were grown *in vitro*, and serum samples of the immunised rabbits were added to the cultures at three different dilutions. Serum samples of the two rabbits immunised with His₆FliC-MSP1₁₉ efficiently inhibited invasion of erythrocytes by the parasites of the different *P. falciparum* strains (inhibition values ranged from 66% to 89% of normal invasion), whereas serum samples of the rabbit immunised with FliC did not efficiently inhibit parasite invasion (inhibition values ranged from 11 to 21%) (Fig. 6). Analyses of the MSP1₁₉ nucleotide sequences of these three *P. falciparum* strains showed identity of at least 97.7% (data not shown). These results clearly show that antibodies raised in rabbits following immunisation with His₆FliC-MSP1₁₉, in the absence of admixed adjuvants, can specifically inhibit erythrocyte invasion by different *P. falciparum* strains, an essential step of the parasitic life cycle.

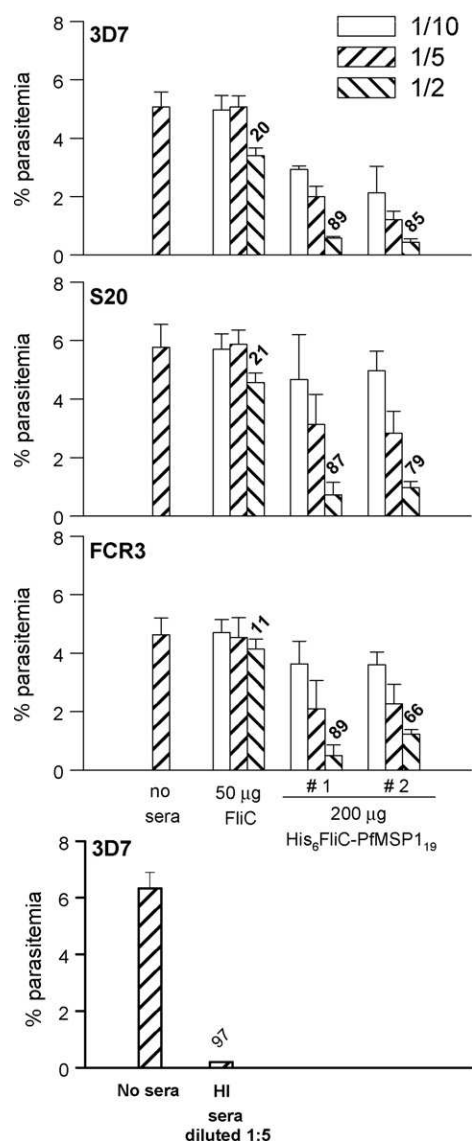


Fig. 6. Sera from rabbits immunised with His₆FliC-MSP1₁₉ inhibited erythrocyte invasion by *P. falciparum* 3D7, S20 and FCR3 strains. The parasites were cultured *in vitro* in the presence of sera from rabbits at different dilutions (1:2, 1:5 or 1:10). After 24–30 h of incubation, parasitemia was determined in blood smears by counting the number of rings in at least 500 erythrocytes. Results are shown as mean $\pm$ SD of three cultures from each strain and serum sample dilution. Erythrocyte invasion inhibition values were determined in relation to the control, a parasite sample prepared with no added sera. Percentages of erythrocyte invasion mediated by the different tested sera are shown only for the 1:2 serum dilutions. In the lower panel, pooled human serum from malaria immune individuals (HI) was used to inhibit the erythrocyte invasion by *P. falciparum* 3D7 strain. Data are representative of two experiments.

4. Discussion

In the present study, we tested whether the proteic innate immunity activator (*Salmonella* FliC) acts both as an adjuvant for specific humoral and cellular immune responses and an antigen molecular carrier to be used as a simple and inexpensive strategy to improve the immunogenicity of *P. falciparum* MSP1₁₉, one of the best studied malaria vaccine candidates. Parenteral immunisation with the fusion protein His₆FliC-MSP1₁₉ elicited strong adaptive immune responses in vaccinated mice. The immunogenicity of the malaria vaccine formulation could be further modulated with the use of additional TLR agonists, such as CpG ODN 1826, as well as with commercially available adjuvants, such as Quil-A. In our previous study, we described the adjuvant potential of FliC independent of the molecular carrier effect. The magnitude of the antibody immune response was similar using FliC admixed or genetically fused to *P. vivax* His₆MSP1₁₉. Nevertheless, upon stimulation with *P. vivax* His₆MSP1₁₉, IFN- γ secretion by immune spleen cells from mice immunised with FliC genetically fused to His₆MSP1₁₉ was significantly higher than the secretion from cells of mice immunised with His₆MSP1₁₉ admixed to FliC [46]. Therefore, we concluded that if there is a carrier effect, it is not related to the antibody production but rather to the expansion of IFN- γ producing cells. We did not consider important to repeat these same experiments with *P. falciparum* MSP1₁₉ because we see no reason why it would be significantly different.

The present study reproduces and extends recent reports on the use of *Salmonella* flagellin as an adjuvant and antigen carrier, allowing additional plasticity to the design and production of vaccine antigens endowed with enhanced immunogenicity [31–42]. Indeed, recent studies in non-human primates extend the knowledge obtained for murine hosts, strongly arguing in favour of future clinical trials [43–45].

The protective nature of antibodies targeting the C-terminal domain of the *P. falciparum* MSP-1 protein has been thoroughly documented in a number of *in vitro* and *in vivo* studies. *In vitro*, antibodies directed against *P. falciparum* MSP1₁₉, which were obtained from immune individuals, were highly inhibitory for parasite growth [55]. *In vivo*, studies on non-human primates confirmed that protective immunity elicited by vaccination with recombinant proteins correlates with the antibody titres to this specific region of the MSP-1 protein [16,18,19]. In spite of these promising results in some non-human primate models, the observed protective immunity is strain-specific and requires the use of specific adjuvants, some of them endowed with high toxicity and, thus, can not be used in humans [16].

Based on the promising results in the experimental models of malaria infection, a recent phase IIb vaccine trial was performed in Africa [56]. In this clinical trial, children were vaccinated with a formulation containing a recombinant His-tagged fusion protein encompassing the MSP-1 42 kDa C-terminal fragment of the *P. falciparum* 3D7 strain (FMP1) formulated with the adjuvant AS02 [56]. This vaccine formulation was shown to be safe and immunogenic, as demonstrated by detection of specific antibody titres by ELISA. Unfortunately, the trial failed, and no significant reduction in the incidence of malaria infection could be observed in children receiving the FMP1/AS02 formulation [56]. The precise reason why the vaccination failed should be investigated. It might be attributed to the polymorphism of the MSP-1 protein. This fact may be relevant for the interpretation of the results, considering that protective immunity to the C-terminal region of *P. falciparum* MSP-1 can be strain-specific and antibodies targeting this antigen may not show parasite inhibitory activity [16,57]. Furthermore, some of the MSP-1-specific antibodies are endowed with the ability to block the parasite activity of inhibitory antibodies [58]. Although negative, these results do not completely refute that the C-terminal region

of *P. falciparum* MSP-1 could still be part of a subunit malaria vaccine in a new recombinant form or formulation. Currently, the immunogenic properties of distinct recombinant proteins are being compared in experimental animals to select possible candidates for human trials [59]. In that scenario, our approach may help in the search for an ideal malarial vaccine formulation containing blood stage antigens with increased immunogenicity and improved potency, which will generate antibodies that proficiently inhibit the late steps of parasite development.

Although it was described that flagellin is a natural agonist of at least three innate immune receptors, TLR5 [24,30], Ipaf (ICE protease-activating factor) [23,25] and Naip5/Birc1e (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein) [26–29], it is very likely that the mechanism that mediates the adjuvant properties of flagellin involves the activation of TLR5 in antigen-presenting cells. A recent work showed that a conserved region in both human and mouse TLR5 is responsible for the recognition of flagellin, and another recent study showed that the direct stimulation of TLR5⁺ CD11c⁺ dendritic cells (myeloid DCs) via TLR5 is necessary for flagellin adjuvant activity [60], which would act mainly by upregulating CD80, CD83, CD86 and MHC class II in these cells. Nevertheless, one laboratory suggests that murine DCs do not express TLR5 [61] and another showed that, in the absence of the TLR5, flagellin is capable of inducing a humoral immune response despite a lack in DC maturation [62]. Additionally, flagellin has been shown to activate APC through inhibition of IL-10 secretion, an immunosuppressive cytokine [63], resulting in a higher adaptive immune response. Therefore, the exact mechanism(s) by which flagellin acts as an adjuvant in these models remains to be elucidated. It is possible that another unknown receptor might be playing a relevant role in this scenario. Despite these unanswered questions, it seems that human myeloid DCs express higher levels of TLR5 than murine DCs [61], which would be an advantage for the development of a vaccine for humans using the strategy of antigen fusion to flagellin.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Millennium Institute for Vaccine Development and Technology (CNPq - 420067/2005-1), the National Institute for Vaccine Development and Technology (CNPq - INCTV), and Rede de Malária (CNPq). DYB, JAL, SCPL and CJMB were supported by fellowships from FAPESP. MES-A, LCSF, ISS, FTMC and MMR were supported by fellowships from CNPq.

References

- Aregawi M, Cibulskis R, Otten M, Williams R, Dye C. World malaria report 2008. World Health Organization (WHO); 2008.
- White NJ. Antimalarial drug resistance. J Clin Invest 2004;113(April (8)):1084–92.
- Beeson JG, Osier FH, Engwerda CR. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. Trends Parasitol 2008;24(December (12)):578–84.
- Yazdani SS, Mukherjee P, Chauhan VS, Chitnis CE. Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. Curr Mol Med 2006;6(March (2)):187–203.
- Doolan DL, Martinez-Alier N. Immune response to pre-erythrocytic stages of malaria parasites. Curr Mol Med 2006;6(March (2)):169–85.
- Renia L. Protective immunity against malaria liver stage after vaccination with live parasites. Parasite (Paris, France) 2008;15(September (3)):379–83.
- Bejon P, Lusingu J, Olotu A, Leach A, Lievens M, Vekemans J, et al. Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. N Engl J Med 2008;359(December (24)):2521–32.
- Abdulla S, Oberholzer R, Juma O, Kubhoja S, Machera F, Membi C, et al. Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02D malaria vaccine in infants. N Engl J Med 2008;359(December (24)):2533–44.
- Diggs CL, Ballou WR, Miller LH. The major merozoite surface protein as a malaria vaccine target. Parasitol Today 1993;9(August (8)):300–2 [Personal ed].
- Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. J Exp Med 1990;172(July (1)):379–82.
- O'Donnell RA, Saul A, Cowman AF, Crabb BS. Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-119 across distantly related *Plasmodium* species. Nat Med 2000;6(January (1)):91–5.
- Combe A, Giovannini D, Carvalho TG, Spath S, Boisson B, Loussert C, et al. Clonal conditional mutagenesis in malaria parasites. Cell Host Microbe 2009;5(April (4)):386–96.
- Bergmann-Leitner ES, Duncan EH, Angov E. MSP-1p42-specific antibodies impact growth and development of intra-erythrocytic parasites of *Plasmodium falciparum*. Malar J 2009;8(August (1)):183.
- Chang SP, Case SE, Gosnell WL, Hashimoto A, Kramer KJ, Tam LQ, et al. A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 protects *Aotus* monkeys against malaria. Infect Immun 1996;64(January (1)):253–61.
- Stowers AW, Cioce V, Shimp RL, Lawson M, Hui G, Muratova O, et al. Efficacy of two alternate vaccines based on *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in an *Aotus* challenge trial. Infect Immun 2001;69(March (3)):1536–46.
- Lyon JA, Angov E, Fay MP, Sullivan JS, Girourd AS, Robinson SJ, et al. Protection induced by *Plasmodium falciparum* MSP1(42) is strain-specific, antigen and adjuvant dependent, and correlates with antibody responses. PLoS One 2008;3(7):e2830.
- Kumar S, Yadava A, Keister DB, Tian JH, Ohl M, Perdue-Greenfield KA, et al. Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in *Aotus* monkeys. Mol Med (Cambridge, MA) 1995;1(March (3)):325–32.
- Singh S, Miura K, Zhou H, Muratova O, Keegan B, Miles A, et al. Immunity to recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP1): protection in *Aotus nancymai* monkeys strongly correlates with anti-MSP1 antibody titer and in vitro parasite-inhibitory activity. Infect Immun 2006;74(August (8)):4573–80.
- Darko CA, Angov E, Collins WE, Bergmann-Leitner ES, Girourd AS, Hitt SL, et al. The clinical-grade 42-kilodalton fragment of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* strain FVO expressed in *Escherichia coli* protects *Aotus nancymai* against challenge with homologous erythrocytic-stage parasites. Infect Immun 2005;73(January (1)):287–97.
- Stowers AW, Chen LH, Zhang Y, Kennedy MC, Zou L, Lambert L, et al. A recombinant vaccine expressed in the milk of transgenic mice protects *Aotus* monkeys from a lethal challenge with *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99(January (1)):339–44.
- Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 2002;20:197–216.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell 2006;124(February (4)):783–801.
- Miao EA, Alpujch-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. Nat Immunol 2006;7(June (6)):569–75.
- Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. Nat Immunol 2003;4(December (12)):1247–53.
- Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. Nat Immunol 2006;7(June (6)):576–82.
- Lamkanfi M, Amer A, Kanneganti TD, Munoz-Planillo R, Chen G, Vandenabeele P, et al. The Nod-like receptor family member Naip5/Birc1e restricts *Legionella pneumophila* growth independently of caspase-1 activation. J Immunol 2007;178(June (12)):8022–7.
- Zamboni DS, Kobayashi KS, Kohlsdorf T, Ogura Y, Long EM, Vance RE, et al. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. Nat Immunol 2006;7(March (3)):318–25.
- Vinzing M, Eitel J, Lippmann J, Hocke AC, Zahlten J, Slevogt H, et al. NAIP and Ipaf control *Legionella pneumophila* replication in human cells. J Immunol 2008;180(May (10)):6808–15.
- Ren T, Zamboni DS, Roy CR, Dietrich WF, Vance RE. Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. PLoS Pathog 2006;2(March (3)):e18.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature 2001;410(April (6832)):1099–103.
- McDonald WF, Huleatt JW, Foellmer HG, Hewitt D, Tang J, Desai P, et al. A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. J Infect Dis 2007;195(June (11)):1607–17.
- Ben-Yedidia T, Tarrab-Hazdai R, Schechtman D, Arnon R. Intranasal administration of synthetic recombinant peptide-based vaccine protects mice from infection by *Schistosoma mansoni*. Infect Immun 1999;67(September (9)):4360–6.
- Cuadros C, Lopez-Hernandez FJ, Dominguez AL, McClelland M, Lustgarten J. Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. Infect Immun 2004;72(May (5)):2810–6.
- Chauhan N, Kumar R, Badhai J, Preet A, Yadava PK. Immunogenicity of cholera toxin B epitope inserted in *Salmonella* flagellin expressed on bacteria and administered as DNA vaccine. Mol Cell Biochem 2005;276(August (1–2)):1–6.
- Huleatt JW, Jacobs AR, Tang J, Desai P, Kopp EB, Huang Y, et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands

- induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine* 2007;25(January (4)):763–75.
- [36] Huleatt JW, Nakaar V, Desai P, Huang Y, Hewitt D, Jacobs A, et al. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine* 2008;26(January (2)):201–14.
- [37] Song L, Nakaar V, Kavita U, Price A, Huleatt J, Tang J, et al. Efficacious recombinant influenza vaccines produced by high yield bacterial expression: a solution to global pandemic and seasonal needs. *PLoS One* 2008;3(5):e2257.
- [38] Adar Y, Singer Y, Levi R, Tzehoval E, Perk S, Banet-Noach C, et al. A universal epitope-based influenza vaccine and its efficacy against H5N1. *Vaccine* 2009;27(March (15)):2099–107.
- [39] Le Moigne V, Robreau G, Mahana W. Flagellin as a good carrier and potent adjuvant for Th1 response: study of mice immune response to the p27 (Rv2108) *Mycobacterium tuberculosis* antigen. *Mol Immunol* 2008;45(May (9)):2499–507.
- [40] Braga CJ, Rittner GM, Munoz Henao JE, Teixeira AF, Massis LM, Sbrógio-Almeida ME, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FljC flagellin. *Infect Immun* 2009;77(April (4)):1700–7.
- [41] Lee SE, Kim SY, Jeong BC, Kim YR, Bae SJ, Ahn OS, et al. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. *Infect Immun* 2006;74(January (1)):694–702.
- [42] Pino O, Martin M, Michalek SM. Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. *Infect Immun* 2005;73(October (10)):6763–70.
- [43] Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ, Mizel SB. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 2006;74(February (2)):1113–20.
- [44] Mizel SB, Graff AH, Sriranganathan N, Ervin S, Lees CJ, Lively MO, et al. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol* 2009 Jan;16(1):21–8.
- [45] Weimer ET, Lu H, Kock ND, Wozniak DJ, Mizel SB. A fusion protein vaccine containing OprF epitope 8, OprI, and type A and B flagellins promotes enhanced clearance of nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 2009;77(June (6)):2356–66.
- [46] Bargieri DY, Rosa DS, Braga CJ, Carvalho BO, Costa FT, Espindola NM, et al. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella* Typhimurium FljC flagellin. *Vaccine* 2008;26(November (48)):6132–42.
- [47] Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine* 2001;20(November (3–4)):385–96.
- [48] Schmitt CK, Darnell SC, O'Brien AD. The attenuated phenotype of a *Salmonella typhimurium* flgM mutant is related to expression of FljC flagellin. *J Bacteriol* 1996;178(May (10)):2911–5.
- [49] Rodrigues MM, Ribeiro M, Pereira-Chiocola V, Renia L, Costa F. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect Immun* 1999;67(August (8)):3855–63.
- [50] Lekana Douki JB, Traore B, Costa FT, Fusai T, Pouvelle B, Sterkers Y, et al. Sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A, a receptor for maternal malaria: monoclonal antibodies against the native parasite ligand reveal pan-reactive epitopes in placental isolates. *Blood* 2002;100(August (4)):1478–83.
- [51] di Santi SM, Boulos M, Vasconcelos MA, Oliveira S, Couto A, Rosario VE. Characterization of *Plasmodium falciparum* strains of the State of Rondonia, Brazil, using microtests of sensitivity to antimalarials, enzyme typing and monoclonal antibodies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1987;29(May–June (3)):142–7.
- [52] Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* (New York, NY) 1976;193(August (4254)):673–5.
- [53] Ljungström I, Perlmann H, Schlichterle M, Scherf A, Wahlgren M. Methods in malaria research. 4th ed; 2004 [Manassas, Virginia, USA: MR4/ATCC].
- [54] Kulane A, Ekre HP, Perlmann P, Rombo L, Wahlgren M, Wahlin B. Effect of different fractions of heparin on *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells in vitro. *Am J Trop Med Hygiene* 1992;46(May (5)):589–94.
- [55] O'Donnell RA, de Koning-Ward TF, Burt RA, Bockarie M, Reeder JC, Cowman AF, et al. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *J Exp Med* 2001;193(June (12)):1403–12.
- [56] Ogutu BR, Apollo OJ, McKinney D, Okoth W, Siangla J, Dubovsky F, et al. Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. *PLoS One* 2009;4(3):e4708.
- [57] Guevara Patino JA, Holder AA, McBride JS, Blackman MJ. Antibodies that inhibit malaria merozoite surface protein-1 processing and erythrocyte invasion are blocked by naturally acquired human antibodies. *J Exp Med* 1997;186(November (10)):1689–99.
- [58] Holder AA. The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria. *Parasitology* 2009;136(October (12)):1445–56.
- [59] Reed ZH, Kienny MP, Engers H, Friede M, Chang S, Longacre S, et al. Comparison of immunogenicity of five MSP1-based malaria vaccine candidate antigens in rabbits. *Vaccine* 2009;27(March (10)):1651–60.
- [60] Bates JT, Uematsu S, Akira S, Mizel SB. Direct stimulation of TLR5/+ CD11c+ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. *J Immunol* 2009;182(June (12)):7539–47.
- [61] Means TK, Hayashi F, Smith KD, Aderem A, Luster AD. The toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol* 2003;170(May (10)):5165–75.
- [62] Sanders CJ, Franchi L, Yarovsky F, Uematsu S, Akira S, Nunez G, et al. Induction of adaptive immunity by flagellin does not require robust activation of innate immunity. *Eur J Immunol* 2009;39(February (2)):359–71.
- [63] Vicente-Suarez I, Takahashi Y, Cheng F, Horna P, Wang HW, Wang HG, et al. Identification of a novel negative role of flagellin in regulating IL-10 production. *Eur J Immunol* 2007;37(November (11)):3164–75.



A recombinant vaccine based on domain II of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice

Fernanda Gentil^a, Daniel Y. Bargieri^b, Juliana A. Leite^c, Kátia S. Françoso^a, Mariana B.M. Patricio^a, Noeli M. Espíndola^a, Adelaide J. Vaz^a, Clarisa B. Palatnik-de-Sousa^d, Mauricio M. Rodrigues^b, Fabio T.M. Costa^c, Irene S. Soares^{a,*}

^a Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

^b CINTERGEN, Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, 04044-010 São Paulo, SP, Brazil

^c Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-862 Campinas, SP, Brazil

^d Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 February 2010

Received in revised form 2 July 2010

Accepted 7 July 2010

Available online 21 July 2010

Keywords:

Malaria

Plasmodium vivax

Recombinant vaccine

ABSTRACT

The Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1) is considered a promising candidate for development of a malaria vaccine against asexual stages of *Plasmodium*. We recently identified domain II (DII) of *Plasmodium vivax* AMA-1 (PvAMA-1) as a highly immunogenic region recognised by IgG antibodies present in many individuals during patent infection with *P. vivax*. The present study was designed to evaluate the immunogenic properties of a bacterial recombinant protein containing PvAMA-1 DII. To accomplish this, the recombinant protein was administered to mice in the presence of each of the following six adjuvants: Complete/Incomplete Freund's Adjuvant (CFA/IFA), aluminium hydroxide (Alum), Quil A, QS21 saponin, CpG-ODN 1826 and TiterMax. We found that recombinant DII was highly immunogenic in BALB/c mice when administered in the presence of any of the tested adjuvants. Importantly, we show that DII-specific antibodies recognised the native AMA-1 protein expressed on the surface of *P. vivax* merozoites isolated from the blood of infected patients. These results demonstrate that a recombinant protein containing PvAMA-1 DII is immunogenic when administered in different adjuvant formulations, and indicate that this region of the AMA-1 protein should continue to be evaluated as part of a subunit vaccine against *vivax* malaria.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In contrast to reports from the last decade that characterised *Plasmodium vivax* malaria as a benign infection, *P. vivax* is now recognised as a cause of severe disease and death [1–3]. Recent data indicate that 130–435 million infections occur annually, and an estimated 2.6 billion people live in areas at risk of infection [4]. *P. vivax* is responsible for more than 70% of malaria cases in South and Central America, and is considered the most prevalent *Plasmodium* species in the Americas [1]. In Brazil, 270,000 *P. vivax* infections were reported in 2008, accounting for 85% of all malarial infections that year (SIVEP/Malaria, Ministry of Health, Brazil). The relatively low efficacy of the measures currently used to control

P. vivax infection demands the development of new strategies to prevent infection, such as vaccines, new drugs and insecticides [5].

Research aiming to characterise target antigens of *P. vivax* for vaccine development has been limited by both the difficulty of obtaining large amounts of parasites (at the present time there is no efficient culture system for *P. vivax*), and the low levels of parasitemia in infected individuals. In the last 20 years, however, rapid advances have been made in the isolation, cloning and sequencing of genes encoding immunologically important antigens of this species of *Plasmodium*. These advances have allowed the generation of recombinant proteins corresponding to different antigenic regions, which are being used in immuno-epidemiologic and pre-clinical immunisation studies that aim to improve our understanding of the human immune response, and to develop an efficient vaccine against *P. vivax* [6–10].

Among the antigens already characterised in blood stage parasites, one of the main candidates for the development of a vaccine against *Plasmodium* is the Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1). *Plasmodium* AMA-1 is a highly conserved type I integral membrane protein [11] with orthologues in at least two species of the Phy-

* Corresponding author at: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil.
Tel.: +55 11 3091 3641; fax: +55 11 3813 2197.

E-mail address: isoares@usp.br (I.S. Soares).

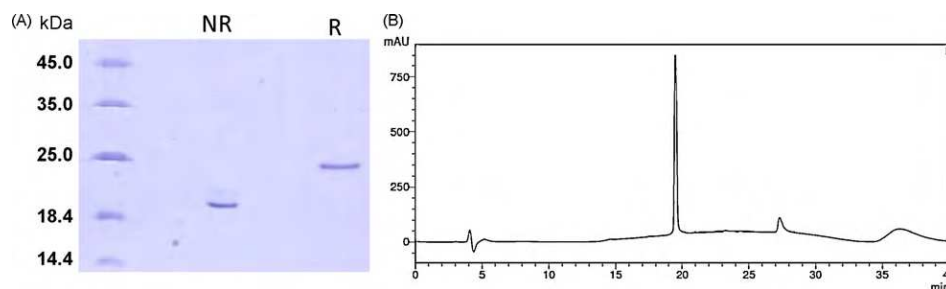


Fig. 1. SDS-PAGE analysis and RP-HPLC profile of purified recombinant protein containing PvAMA-1 domain II. The recombinant protein containing PvAMA-1 domain II (DII) was expressed in *Escherichia coli* using the pET28a vector, which contains an oligonucleotide sequence encoding a histidine tag. The DII protein was purified from the supernatant of the bacterial lysate using Ni^{2+} -NTA-Agarose resin (Qiagen). Eluted fractions were subjected to 12% SDS-PAGE under reducing (R) and non-reducing (NR) conditions, and stained with Coomassie Blue (A). Purified PvAMA-1 DII was analysed by RP-HPLC using a C4 column. The gradient used for elution was developed using Buffer A (0.1% TFA in water) and Buffer B (0.1% TFA in 90% acetonitrile); temperature, 24 °C at 1 ml/min for 40 min (B).

lum Apicomplexa, *Babesia bovis* [12] and *Toxoplasma gondii* [13]. In *Plasmodium* blood stage parasites, AMA-1 is initially present in the micronemes, and is later present on the surface of mature merozoites [14]. This protein contains a pro-sequence, a cysteine-rich ectodomain, a transmembrane domain and a cytoplasmic region. The disulphide bonds formed by the cysteine residues promote the separation of the ectodomain into three domains designated I, II and III [11]. The three-dimensional structure of *P. vivax* AMA-1 (PvAMA-1) was elucidated by Pizarro et al. [15] using a recombinant protein, produced in *P. pastoris*, that contains the entire protein ectodomain [16]. The resolution of this structure confirmed a conformation similar to that initially suggested by the protein primary structure, consisting of three domains with 16 cysteine residues forming eight disulphide bonds. Two domains (I and II) formed “PAN” modules, which are frequently associated with protein–protein and protein–carbohydrate interactions [15].

The precise biological role of AMA-1 is unknown; however, several lines of evidence suggest its involvement in the invasion of erythrocytes by *Plasmodium*, during which it forms a complex with other proteins to create a moving junction between the parasite and the host cell membranes [17–19]. Moreover, the expression of AMA-1 has also been detected in micronemes of *P. falciparum* sporozoites, and specific antibodies against PfAMA-1 inhibit the invasion of hepatocytes by *P. falciparum* [20]. These findings have important implications for the prospective use of this antigen in a subunit vaccine. It is worth noting that attempts to “knock-down” the *ama-1* gene in *P. falciparum* blood stage parasites or *Toxoplasma gondii* have failed, suggesting that the presence of the AMA-1 protein is critical for the survival of these parasites [21,22].

Kocken et al. [23] described a monoclonal antibody (MAb 4G2) to AMA-1 capable of inhibiting the invasion of *P. falciparum* *in vitro*. This monoclonal antibody recognises a conformational epitope within the base of a loop, in domain II of the PfAMA-1 ectodomain [15,24]. Recently, Collins et al. [25] data suggests that MAb 4G2 inhibits invasion by blocking the formation of a functional complex between PfAMA-1 and other components of the moving junction. These observations were an important step in the identification of functional regions of AMA-1 and may lead to the development of subunit vaccines of low molecular weight that are able to efficiently induce protective immune responses.

Several groups are currently conducting pre-clinical vaccine trials using AMA-1 to immunise mice against *P. chabaudi* and *P. yoelii*, and to immunise monkeys against *P. knowlesi*, *P. fragile*, *P. vivax*, *P. cynomolgi* and *P. falciparum*. Although other vaccine strategies, such as synthetic peptides, plasmid DNA, viral vectors and virosomes, are also being explored, most efforts have focused on recombinant AMA-1 vaccines, which require an adjuvant to improve their immunogenicity. Many adjuvant formulations have

been tested, including Freund's Adjuvant, saponin, Montanide ISA-720, AS02 and aluminium salts. In several distinct model systems, immunisation with AMA-1 has conferred significant protection against challenges with blood stage parasites of different *Plasmodium* species. Based on these promising results, Phase I and II clinical trials of PfAMA-1 vaccines are currently in progress (reviewed by Remarque et al. [9]).

In contrast to PfAMA-1, few studies have addressed the potential use of PvAMA-1 as a malaria vaccine. We conducted the first study of the human naturally acquired immune response to PvAMA-1 [26]. Recombinant AMA-1 proteins produced in bacteria or yeast were recognised by antibodies, predominantly of the IgG1 subclass, from several individuals with patent infection. Other studies characterising the naturally acquired human immune response to PvAMA-1 were carried out in different areas of Brazil in which malaria is endemic [27,28] and Sri Lanka [29]. These studies confirmed that AMA-1 is highly immunogenic during human infections. It is noteworthy that studies carried out in endemic areas of Kenya demonstrated that the presence of antibodies that recognise the ectodomain of AMA-1 of *P. falciparum* is associated with a reduced risk of clinical malaria [30].

Based on these studies, we generated five recombinant proteins corresponding to individual domains (DI, DII and DIII) or combinations of domains of PvAMA-1 (DI–II and DII–III) to identify particularly antigenic regions of this protein that could be used in future pre-clinical immunisation studies in mice and non-human primates [31]. When we evaluated the production of IgG antibodies against each of the five recombinant proteins, we observed that the three proteins that contained domain II of the ectodomain of PvAMA-1 were highly immunogenic in humans; each of these proteins was recognised by IgG from more than 50% of the individuals with patent *P. vivax* infection [31]. Our data demonstrate that DII is particularly immunogenic during natural infection, since it was recognised even when associated with domains I and III.

The determination that DII was particularly immunogenic can be important to the design of a recombinant subunit vaccine. In contrast to the bacterial recombinant protein containing the entire ectodomain of PvAMA-1, the recombinant DII is highly soluble when expressed in bacteria, a fact that may facilitate its large-scale production. Also, smaller antigenic polypeptide can facilitate the generation hybrid proteins containing multiple relevant domains of malarial antigens and/or carrier proteins.

Based on that, the present study was designed to evaluate the immunogenic properties of a bacterial recombinant PvAMA-1 DII when administered to mice in the presence of different adjuvant formulations. Our goal was to determine the immunogenicity of this recombinant protein and select formulations that can be used in future non-human primate immunisations.

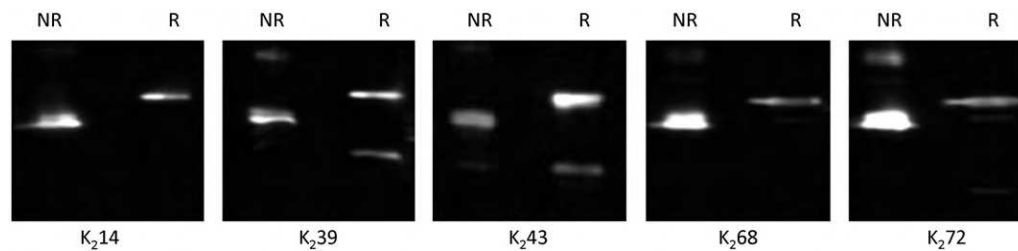


Fig. 2. Reactivity of the monoclonal antibodies with recombinant DII. Recombinant DII (1 μ g) was subjected to 12% SDS-PAGE performed under reducing (R) and non-reducing (NR) conditions. Immunoblotting was performed using the indicated monoclonal antibodies. Bands were visualised using the ECL Western blotting analysis system.

2. Methods

2.1. The expression and purification of recombinant proteins corresponding to *P. vivax* AMA-1

E. coli BL21 (DE3) cells (Novagen) were transformed with recombinant plasmids containing the nucleotide sequence encoding domain II (DII, amino acid residues 249–385) of *P. vivax* AMA-1. The proteins were expressed by inoculating 200 ml of Luria broth (Invitrogen) containing 30 μ g/ml of kanamycin with 8 ml of a culture grown overnight. The cultures were grown with continuous shaking at 37 °C to an optical density of 0.6–0.8 at 600 nm and then induced for 3 h under constant agitation at 37 °C in the presence of 0.1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG, Invitrogen). The bacteria were pelleted by centrifugation and sonicated as previously described [31]. Sonicates were centrifuged to remove bacterial debris, and the recombinant His-tagged proteins were purified by affinity chromatography in Ni-NTA-agarose (Ni Sepharose High Performance, Amersham Biosciences) as previously described [31]. The purified proteins were analysed by 12% SDS-PAGE followed by immunoblotting using a mouse monoclonal anti-histidine antibody (anti-His, GE Healthcare). Protein concentrations were determined by Bradford assay (BioRad). The recombinant protein containing the entire ectodomain (E) was obtained from the pellets of bacterial lysates. Its subsequent denaturation, purification and refolding were performed as described previously [26,31].

Purified PvAMA-1 DII was analysed by reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a Vydac C4 column (4.6 mm $\times$ 250 mm; 300 μ m particle size) in a Shimadzu LC Solution (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) HPLC system. The HPLC procedure was performed using an acetonitrile gradient from 0 to 100% in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)/90% acetonitrile at room temperature ($\approx$ 24 °C) at 1 ml/min for 40 min. The elution was monitored with a UV-visible absorbance detector (Shimadzu SPD M20A) at 214 nm.

2.2. The production of mouse monoclonal antibodies to recombinant PvAMA-1 DII

BALB/c mice were immunised twice with 20 μ g of recombinant PvAMA-1 DII emulsified in Complete/Incomplete Freund's Adjuvant (CFA/IFA, Sigma). Spleens of immunised mice were removed, and splenocytes were fused with myeloma cells (SP2/O) using polyethylene glycol 4000 (Merck, Darmstadt, Germany). Hybridomas were grown for 2 weeks, and samples of the media from these cultures were screened for DII-reactive antibodies by ELISA and immunoblotting. The positive hybridomas were cloned and recloned by limiting dilution. The monoclonal antibodies (MAbs) used in this study were K₂14, K₂39, K₂43, K₂68 and K₂72.

2.3. Immunoblotting

Recombinant PvAMA-1 DII was subjected to SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions, and the proteins were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham). Molecular mass standards (Fermentas Life Sciences) were visualised with Ponceau S staining solution, and the membranes were blocked overnight at 4 °C in PBS containing 5% dry non-fat milk and 2.5% BSA (PBS-milk-BSA). Membranes were then incubated for 1 h with anti-DII monoclonal antibodies at the final concentration of 0.1 μ g/ml. After washing membranes extensively with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-Tween), bound antibodies were detected by incubating the membranes with a 1:1000 dilution of peroxidase-coupled goat anti-mouse IgG (KPL) followed by enhanced chemiluminescence reagent (ECL, Amersham Biosciences).

2.4. Adjuvant preparation and immunisation schedule

Six to eight-week-old female BALB/c mice were purchased from University of São Paulo, Brazil. Groups of six animals were immunised subcutaneously (s.c.) in both their hind footpads with 10 μ g of recombinant PvAMA-1 DII emulsified in CFA in a volume of 50 μ l. After 15, 30 and 45 days, each animal received a booster injection of 10 μ g of the same protein emulsified in IFA injected s.c. at the base of the tail. The same protocol was used for immunisation with the DII antigen emulsified in 25 μ g of Imject® Alum (Pierce, Rockford, IL), Quil A (Superfos Biosector), QS21 saponin [32] or 10 μ g of CpG-ODN 1826 (TCCATGACGTCCT-GACGTT) synthesised with a nuclease-resistant phosphorothioate backbone (Prodinol Biotecnologia). For immunisation with Titer-Max Gold® (Sigma), each mouse was immunised once s.c. in all four footpads with 10 μ g of the protein emulsified in this adjuvant in a volume of 25 μ l as suggested by the manufacturer. The subsequent doses of 10 μ g of soluble antigen were injected s.c. at the base of the tail. Alternatively, the DII protein was emulsified in alum in combination with QS21 or CpG-ODN 1826. These adjuvants were administered at the same doses used for immunisations with single adjuvants. Controls received only PBS emulsified in adjuvant. Serum samples were collected for analysis 14 days after each dose was administered, and stored at –20 °C.

C57BL/6 (H-2^b) mice and C57BL/6 TLR4 knockout mice (TLR4 KO, non-responsive to LPS) were purchased from Federal University of São Paulo, Brazil. The immunisations schedule was the same used in BALB/c mice, except that animals were immunised with DII protein only or with the protein emulsified in Quil A.

All experiments were performed in accordance with the guidelines approved by the Ethics Committee for Animal Handling of the Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of São Paulo.

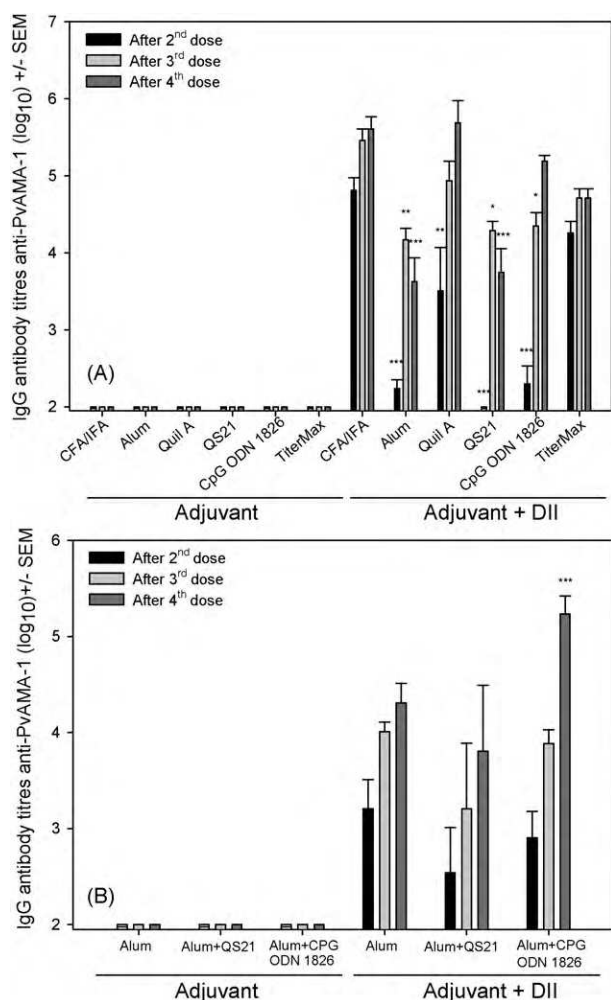


Fig. 3. Antibody responses of mice immunised with recombinant DII protein in different adjuvant formulations. BALB/c mice were immunised with 10 µg of DII protein in the presence of different adjuvant formulations [CFA/IFA, Alum, Quil A, QS-21, CpG-ODN 1826 or TiterMax] separately (A) or in combination [Alum + QS-21 or Alum + CpG-ODN 1826] (B). ELISA plates were coated with the recombinant PvAMA-1 ectodomain, and the specific anti-PvAMA-1 antibody titres were defined as the highest dilution yielding an OD₄₉₂ higher than 0.1. Serial dilutions of mouse sera ($n=6$) collected 2 weeks after each dose were tested. The results are expressed as the means of IgG titres ($\log_{10}$) $\pm$ SEM and were compared statistically using one-way ANOVA followed by the Tukey test for multiple comparisons. In panel A, significant differences between each dose of DII in CFA/IFA and other groups that received the protein are denoted on the graph: * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$. In panel B, significant difference between DII in Alum and combination of adjuvants are denoted on the graph *** $P<0.001$. Data are representatives of three independent experiments.

2.5. ELISA for detection of mouse antibodies

Serum antibodies to PvAMA-1 were detected by ELISA as described previously [31]. Recombinant PvAMA-1 proteins were used as solid phase bound antigens. High-binding 96-well plates (Costar) were coated with 200 ng PvAMA-1 protein in a volume of 50 µl per well. After overnight incubation at room temperature, the plates were washed with PBS–Tween 20 (0.05%, v/v) and blocked with PBS–milk–BSA (PBS, pH 7.4, containing 5% non-fat dry milk, 2.5% BSA) for 2 h at 37 °C. The monoclonal and polyclonal sera of mice were tested at serial dilutions in a final volume of 50 µl of the sample added to each well in duplicate, following incubation for 1 h at room temperature. After washing the plates with PBS–Tween, 50 µl of a 1:3000 dilution of the peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-mouse IgG, KPL) was added to each well. The enzymatic reactions were developed by adding 1 mg/ml σ -

phenylenediamine (Sigma) diluted in phosphate-citrate buffer, pH 5.0, containing 0.03% (v/v) hydrogen peroxide and stopped by adding 50 µl of 4N H₂SO₄. Absorbances were read at 492 nm (OD₄₉₂) with an ELISA reader (Awareness Technology, mod. Stat Fax 3200, EUA). Detection of specific IgG subclasses was performed as described above except that the secondary antibody was specific to mouse IgG1, IgG2a, IgG2b or IgG3 (purchased from Southern Technologies) when diluted to 1:8000. The specific anti-PvAMA-1 titres were defined as the highest dilution yielding an OD₄₉₂ greater than 0.1. The results are expressed as means of IgG titres ($\log_{10}$) $\pm$ SEM.

2.6. Immunofluorescence assays (IFA)

Assays were carried out in 10-well IFA slides containing late stage forms of *P. vivax* enriched using a Percoll® (Amersham) gradient as described elsewhere [33]. Blood samples (5–10 ml) from *P. vivax*-positive patients living in Manaus, AM, Brazil were collected into heparin-coated tubes. All patients provided informed consent, and the procedure was approved by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) Research Committee. In brief, after plasma separation, red blood cell pellets were washed three times and resuspended in RPMI 1640 medium (Sigma) at 10% hematocrit. The cell suspensions were aliquotted into 15 ml tubes (5 ml each) containing 5 ml of 45% Percoll. After centrifugation, floating mature infected erythrocytes, which were enriched up to 40–70%, were collected, washed and resuspended in 10% foetal calf serum. The free merozoites were obtained by mechanical lysis of infected erythrocytes and spread on IFA slides (50 µl/well). Pooled sera from each immunisation group or monoclonal anti-DII antibody (K₂43) were diluted 1:50 in PBS and applied to the slides, which were incubated 30 min in a humid chamber at 37 °C. The slides were extensively washed with PBS and then incubated with 10 µg/ml FITC-conjugated sheep anti-mouse IgG (Sigma) and 100 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Molecular Probes) for 30 min in a humid chamber at 37 °C. After several washes with PBS, the slides were sealed with coverslips and viewed under an immunofluorescence microscope.

2.7. Statistical analysis

Antibody titres were log-transformed before statistical analysis. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the mean values of the different groups. Multiple comparison were assessed by Tukey Test, with a P value of <0.05 considered significant.

3. Results

3.1. Recombinant antigen and reactivity of monoclonal anti-PvAMA-1 domain II antibodies

The recombinant protein encoding 137 amino acids (DII) of *P. vivax* AMA-1 was generated as previously described [31]. This protein migrates slowly on SDS-PAGE gels under reduced conditions. This difference between reducing (R) and non-reducing (NR) conditions indicates that disulphide linkages are present in the protein (Fig. 1A). The homogeneity of the recombinant protein was confirmed by reverse phase chromatography on a C-4 column and, as shown in Fig. 1B a single peak was observed ($\approx 90\%$ pure). For a detailed analysis of the humoral immune response, DII-specific mouse B cell hybridomas were generated. All five hybridoma clones expressed DII-specific IgG2b (data not shown). Immunoblotting showed that all monoclonal antibodies reacted with recombinant DII under reducing or non-reducing conditions, indicating that the epitopes do not depend on disulphide bonds (Fig. 2). In the specific case of MAb

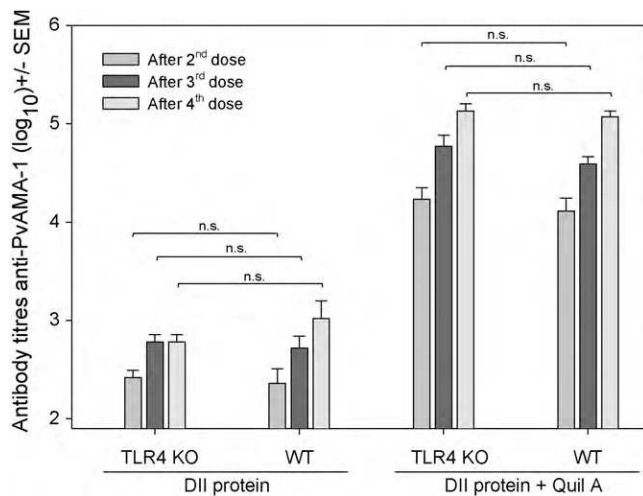


Fig. 4. Comparison of serum antibody responses of C57BL/6 wild type (WT) and TLR4 KO mice after immunisation in the presence or absence of adjuvant. Groups of five mice were immunised as described in Fig. 3 and titres of antibody to PvAMA-1 were determined after each dose. The results are expressed as the means of antibody titres ($\log_{10}$) $\pm$ SEM and were compared statistically using one-way ANOVA followed by the Tukey test for multiple comparisons. Non-significant difference between groups of immunised mice (C57BL/6 WT vs TLR4 KO) in the presence or absence of Quil A are denoted on the graph: n.s. significant differences between groups of mice immunised in the absence or presence of Quil A after each dose are not denoted on the graph (** $P < 0.001$, in all cases).

K₂68 and K₂72, they preferentially recognised the non-reduced forms.

3.2. Evaluation of the mouse antibody response elicited by immunisation with the recombinant PvAMA-1 domain II in the presence of different adjuvants

The immunogenicity of the recombinant DII protein was evaluated after immunisation of BALB/c mice with the protein in the presence of six different commercial adjuvants. The adjuvants used were CFA/IFA, Alum, Quil A, QS21, CpG-ODN 1826 and TiterMax. Immunisations were also performed using Alum combined with either QS21 or CpG-ODN 1826. Serum antibody titres were evaluated after each immunising dose. Antibody titres were determined by ELISA using plates coated with the recombinant protein containing the entire ectodomain of PvAMA-1. We also tested serum antibody titres using plates coated with DII. Overall, the titres of antibodies specific for DII were similar to those of the antibodies specific for the entire ectodomain (data not shown).

As shown in Fig. 3, the recombinant DII protein was highly immunogenic in BALB/c mice when administered in the presence of any of the adjuvants tested. After the second dose, mice immunised with DII formulated in CFA/IFA had significantly higher antibody titres than mice that were immunised with DII formulated in other adjuvants (Fig. 3A, $P < 0.001$ in all cases, except Quil A, where $P < 0.01$); however, mice immunised with DII formulated in TiterMax also had high antibody titres comparable to CFA/IFA ($P > 0.05$). No statistically significant differences in mean antibody titres were detected among mice immunised with DII in Alum, QS21 or CpG-ODN 1826 ($P > 0.05$, in all cases). Control mice immunised with adjuvant only did not express specific antibodies to PvAMA-1 during the entire experiment. After the third dose, animals immunised with the antigen in Alum, Quil A, QS21 or CpG-ODN 1826 presented significant increases in their antibody responses, but only mice immunised with DII in Quil A had antibody titres similar to those of mice immunised with DII in CFA/IFA ($P > 0.05$). A fourth dose did not improve these titres (Fig. 3A), indicating that antibody

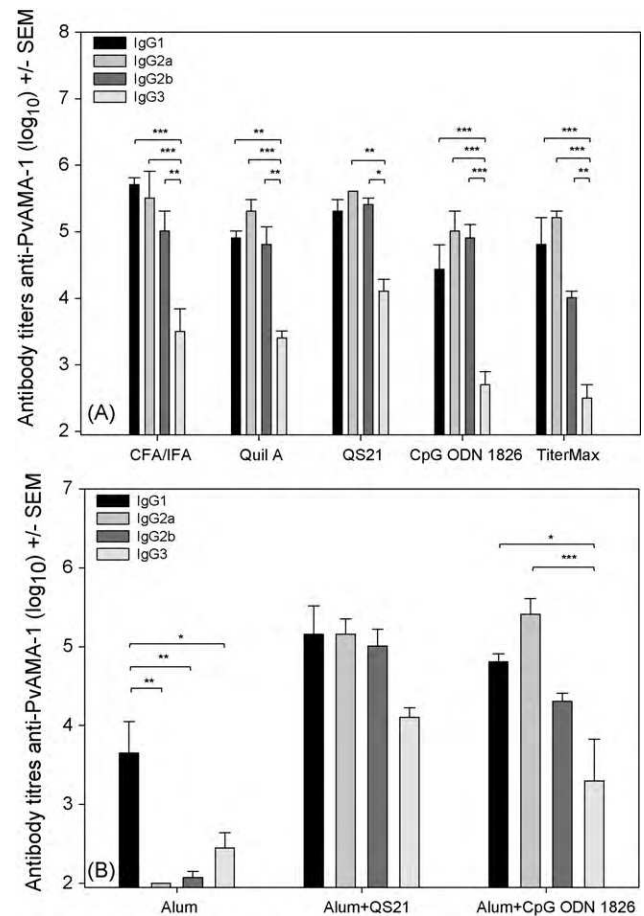


Fig. 5. Titres of IgG subclasses antibodies specific for PvAMA-1 (E) in the sera of BALB/c mice immunised with DII. BALB/c mice were immunised with DII protein as described in Fig. 3, i.e. in the presence of different adjuvant formulations [CFA/IFA, Alum, Quil A, QS-21, CpG-ODN 1826 or TiterMax] separately (A) or in combination [Alum + QS-21 or Alum + CpG-ODN 1826] (B). Serial dilutions of sera ($n = 4$ per group) collected 2 weeks after the fourth dose were tested. The PvAMA-1-specific IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3, levels are indicated. The results are expressed as the means of antibody titres ($\log_{10}$) $\pm$ SEM and were compared statistically using one-way ANOVA followed by the Tukey test for multiple comparisons. The significant differences between IgG subclasses of the same adjuvant group are denoted on the graph: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Non-significant differences are not shown ($P > 0.05$).

titres reached a plateau after three doses. We subsequently evaluated whether the addition of QS21 or CpG-ODN 1826 could improve the efficacy of immunisation with DII in Alum. We found that after three doses, the titres of anti-DII antibodies did not differ significantly among mice immunised with DII in Alum, DII in Alum and QS21 or DII in Alum and CpG-ODN 1826 ($P > 0.05$, Fig. 3B). However, after a fourth dose with DII in Alum and CpG-ODN 1826, increased antibody titres were observed ($P < 0.001$), suggesting that CpG-ODN 1826 could be used as co-adjuvants to improve antibody responses to recombinant DII.

To investigate whether contaminating LPS could account for the immunogenicity of the DII protein, C57BL/6 wild type and TLR4 KO mice were immunised with the protein DII in the presence or absence of the adjuvant Quil A. The antibody titres to PvAMA-1 in these mice were similar (Fig. 4, $P > 0.05$). Moreover, when the protein was administered in the presence of the adjuvant Quil A, antibody responses of TLR4 KO mice were also comparable to those of wild type C57BL/6 mice. In the absence of adjuvant, antibody titres elicited in both C57BL/6 TLR4 KO and wild type mice was reasonable, showing a discrete adjuvant effect of the DII protein,

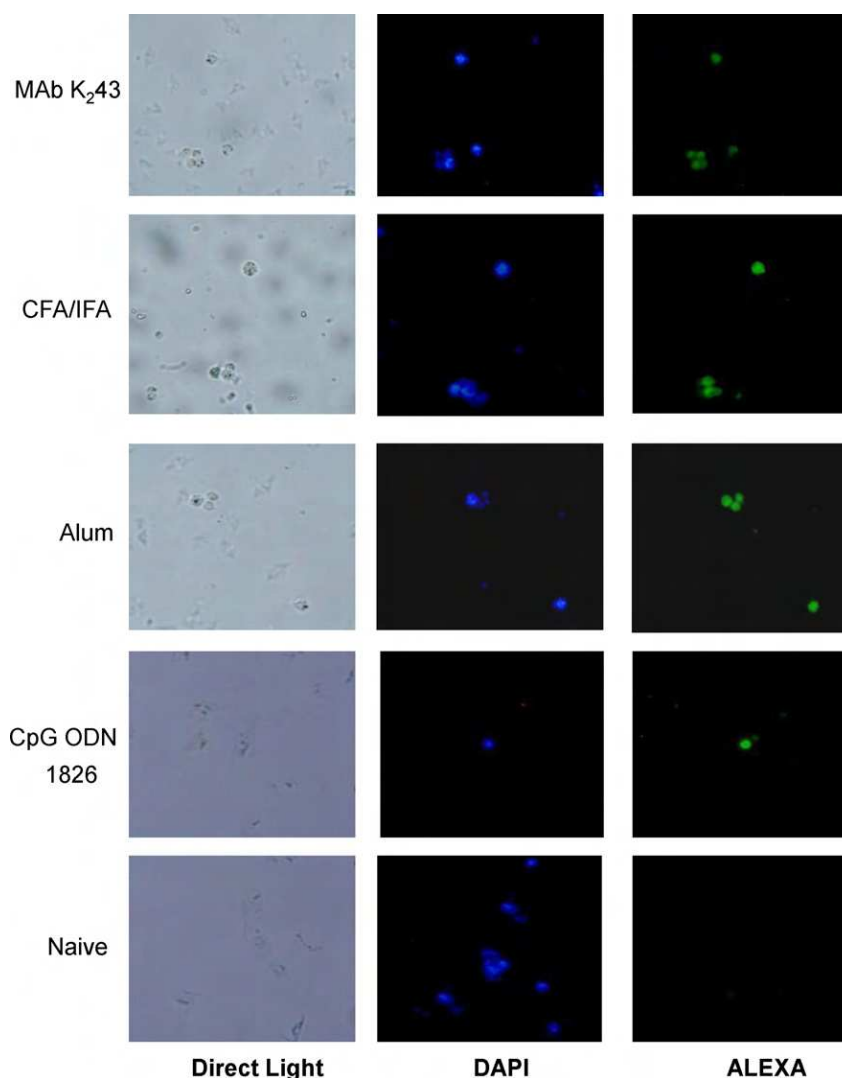


Fig. 6. PvAMA1 domain II-specific antibodies generated in vaccinated mice recognise the native protein expressed by *P. vivax* parasites. IFA slides were incubated with 1:50 dilutions of pooled sera from mice immunised four times as indicated. The bound IgG was labelled with FITC, and the parasite nuclei were stained with DAPI. Data are representative of two experiments.

which was improved in the presence of Quil A (Fig. 4, $P < 0.001$, in all cases). We concluded that DII protein has an intrinsic weak adjuvant property that is independent of TLR4 and that contaminating LPS in the purified DII protein did not play any role in our system.

Immunisation with DII in CFA/IFA, Quil A, QS21, CpG-ODN 1826 or TiterMax induced high levels of IgG1, IgG2a and IgG2b and lower levels of IgG3 (Fig. 5A). In contrast, immunisation with DII in Alum led to Th2 immune responses and high IgG1 titres. Mice immunised with DII in Alum and either QS21 or CpG-ODN 1826 had high titres of IgG1, IgG2a and IgG2b, indicating a more balanced Th1/Th2 response (Fig. 5B).

We also tested the ability of the anti-DII sera to recognise the native form of the protein PvAMA-1 by immunofluorescence assays (IFA) using free merozoites obtained as described in Section 2. Pooled sera from mice immunised four times with DII in CFA/IFA, Alum or CpG-ODN 1826 were tested. All of these sera reacted with the parasites (Fig. 6). Moreover, the MAb K243 recognised the native protein exposed on the surface of *P. vivax* parasites isolated from infected donors (Fig. 6), and did not cross-react with AMA-1 from the *P. falciparum* 3D7 strain (data not shown). Unfortunately, pooled sera from mice immunised with DII in the presence of Quil A, QS21 or TiterMax were not tested due to the limitation in the number of *P. vivax* slides.

4. Discussion

Based on the possibility that individual domains of PvAMA-1 could be used as part of a subunit vaccine against malaria, we consider the immunogenic properties of PvAMA-1 domain II an important factor. We recently demonstrated that recombinant proteins containing PvAMA-1 domain II either alone or in combination with other domains were recognised by IgG antibodies from individuals naturally exposed to *P. vivax* [31]. In this study, we extended these observations by showing that a bacterial recombinant DII protein can also elicit high titres of specific antibodies when administered to mice in the presence of a variety of adjuvants. The use of this recombinant protein can be considered a step forward in the development of a subunit vaccine because it will dramatically reduce the size of the antigenic polypeptide required by narrowing the target region of PvAMA-1. The reduction in the size of the antigenic protein provides a number of advantages for the development of a subunit vaccine. First, in contrast to the bacterial recombinant protein containing the entire ectodomain of PvAMA-1, the recombinant DII is highly soluble when expressed in bacteria. This solubility may facilitate large-scale expression and purification. Second, by reducing the size of the polypeptide we may be able to generate a hybrid protein containing multiple relevant domains of malar-

ial antigens and/or carrier proteins. We are currently expressing this region as a fusion polypeptide with flagellin FlhC of *Salmonella*, which has been shown to dramatically increase the immunogenicity of the malarial antigen MSP-1₁₉ kDa [33,34].

The DII protein that we expressed retains its conformation as evidenced by the different migration patterns observed in SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions. Importantly, recombinant DII is recognised by human antibodies from individuals exposed to the native polypeptide during infection [31], and immunisation with recombinant DII elicits polyclonal and monoclonal antibodies that can bind to the parasite.

The relevance of antibodies against PvAMA-1 and in particular, against DII, in host protection remains unknown and has not been previously addressed. Evidence in favour of a protective role for anti-PvAMA-1 and anti-DII antibodies is provided by experiments performed with other *Plasmodium* species. Several lines of evidence indicate an important role for antibodies against AMA-1 in immunity to multiple species of *Plasmodium*. Polyclonal or monoclonal antibodies specific to AMA-1 passively transfer immunity against *P. chabaudi* and *P. yoelii* infection in mice [35–37]. Additional evidence demonstrating the importance of anti-AMA-1 antibodies in immunity against blood stage parasites was obtained by means of experimental immunisations with recombinant proteins. Immunisation of rabbits with recombinant proteins derived from AMA-1 induced antibodies capable of inhibiting the invasion of merozoites or the growth of *P. falciparum* *in vitro* [38–43].

Results of the experimental trials in which *Aotus* monkeys were immunised with PfAMA-1 were recently published. Overall, these findings confirmed that high titres of cross-strain inhibitory antibodies against AMA-1 elicited in the presence of strong adjuvants (AS02A and Montanide ISA-720) are critical for protective immunity [44].

In comparison to *P. falciparum* AMA-1, few experimental pre-clinical immunisations have been performed with recombinant proteins based on *P. vivax* AMA-1. Immunisations of *Macaca mulatta* monkeys were performed with a recombinant protein produced in *Pichia pastoris*. Strong immunogenicity was observed when PvAMA-1 was injected in the presence of the adjuvant SBAS2 [16], and a DNA vaccine containing the PvAMA-1 gene was shown to be immunogenic in mice [45]. The limited data from pre-clinical immunisation studies has precluded more expensive pre-clinical vaccination trials in non-human primates and humans.

The ability of PvAMA-1 to initiate a cell-mediated immune response in immunised mice was not addressed in this study because the incubation of the recombinant protein with mouse splenocytes in culture caused a number of events that we are currently trying to detail.

An important consideration in designing an effective AMA-1-based vaccine is the understanding of the sequence diversity of PvAMA-1 [46]. Several studies have evaluated the polymorphism of the entire gene encoding PvAMA-1 in natural isolates of *P. vivax* from areas to which this parasite is endemic [46–50]. Studies of *P. falciparum* AMA-1 isolates demonstrated that the polymorphisms in domains I and III were maintained by positive selection. In initial studies of *P. vivax* AMA-1 polymorphism, a diversifying selection was observed in domain II, as an excess of non-synonymous polymorphisms was observed among the 23 Sri Lankan isolates [46]. In contrast, a more detailed study using 231 sequences from Thailand did not confirm a significant difference between synonymous and non-synonymous nucleotide diversity in domain II [50]. The high degree of amino acid sequence conservation that has been noted in the domain II loop in both *P. falciparum* and *P. vivax* AMA-1 [46,50,51] suggests that this region may be responsible for the conserved function of the protein, strengthening the rationale for its use as a component of malaria vaccines.

Due to the limited understanding of the immunogenicity and protective efficacy of recombinant proteins based on *P. vivax* AMA-1, we intend to continue pre-clinical immunisation studies in non-human primates using the *E. coli* recombinant PvAMA-1 described here. Among the tested formulations, the adjuvants Quil A, TLR9 agonist CPG-ODN and TiterMax were more immunogenic, therefore more promising for pre-clinical trials in non-human primates. This protein will be compared to recombinant PvAMA-1 ectodomain produced in the yeast *Pichia pastoris* using individual immunisation protocols and prime/boost strategies with plasmid DNA and recombinant protein (Vicentin et al., unpublished data).

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2006/02832-0), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and The National Institute for Vaccine Development and Technology (CNPq – INCTV). The authors would like to thank Dr. José Paz Parente from Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (NPPN-UFRJ) for isolation of QS21 saponin and Elaine Cristina Vicentin (FCF-USP) for help in the finalization of the experiments with TLR4 knockout mice. CBPT, MMR, FTMC and ISS are supported by fellowships from CNPq. FG was supported by fellowships from CAPES. DYB, JAL, MBMP and NME were supported by fellowships from FAPESP.

References

- [1] Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77(6 Suppl.):79–87.
- [2] Tan LK, Yacoub S, Scott S, Bhagani S, Jacobs M. Acute lung injury and other serious complications of *Plasmodium vivax* malaria. *Lancet Infect Dis* 2008;8(7):449–54.
- [3] Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol* 2009;25(5):220–7.
- [4] Baird JK. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol* 2007;23(11):533–9.
- [5] Greenwood BM. Control to elimination: implications for malaria research. *Trends Parasitol* 2008;24(10):449–54.
- [6] Polley SD, McRobert L, Sutherland CJ. Vaccination for vivax malaria: targeting the invaders. *Trends Parasitol* 2004;20(3):99–102.
- [7] Chitnis CE, Sharma A. Targeting the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *Trends Parasitol* 2008;24(1):29–34.
- [8] Herrera S, Corradin G, Arevalo-Herrera M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends Parasitol* 2007;23(3):122–8.
- [9] Remarque EJ, Faber BW, Kocken CH, Thomas AW. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitol* 2008;24(2):74–84.
- [10] Galinski MR, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*: who cares? *Malar J* 2008;7 Suppl. 1:S9.
- [11] Hodder AN, Crewther PE, Matthew ML, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, et al. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem* 1996;271(46):29446–52.
- [12] Gaffar FR, Yatsuda AP, Franssen FF, de Vries E. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect Immun* 2004;72(5):2947–55.
- [13] Donahue CG, Carruthers VB, Gilk SD, Ward GE. The *Toxoplasma* homolog of *Plasmodium* apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels. *Mol Biochem Parasitol* 2000;111(1):15–30.
- [14] Narum DL, Thomas AW. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 1994;67(1):59–68.
- [15] Pizarro JC, Vulliez-Le Normand B, Chesne-Seck ML, Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F, et al. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science* 2005;308(5720):408–11.
- [16] Kocken CH, Dubbeld MA, Van Der Wel A, Pronk JT, Waters AP, Langermans JA, et al. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. *Infect Immun* 1999;67(1):43–9.
- [17] Thomas AW, Deans JA, Mitchell GH, Alderson T, Cohen S. The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 1984;13(2):187–99.
- [18] Li F, Dluzewski A, Coley AM, Thomas A, Tilley L, Anders RF, et al. Phage-displayed peptides bind to the malarial protein apical membrane antigen-1

- and inhibit the merozoite invasion of host erythrocytes. *J Biol Chem* 2002;277(52):50303–10.
- [19] Mitchell GH, Thomas AW, Margos G, Dlugewski AR, Bannister LH. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect Immun* 2004;72(1):154–8.
 - [20] Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, et al. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem* 2004;279(10):9490–6.
 - [21] Triglia T, Healer J, Caruana SR, Hodder AN, Anders RF, Crabb BS, et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol Microbiol* 2000;38(4):706–18.
 - [22] Hehl AB, Lekutis C, Grigg ME, Bradley PJ, Dubremetz JF, Ortega-Barria E, et al. *Toxoplasma gondii* homologue of *Plasmodium* apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. *Infect Immun* 2000;68(12):7078–86.
 - [23] Kocken CH, van der Wel AM, Dubbeld MA, Narum DL, van de Rijke FM, van Gemert GJ, et al. Precise timing of expression of a *Plasmodium falciparum*-derived transgene in *Plasmodium berghei* is a critical determinant of subsequent subcellular localization. *J Biol Chem* 1998;273(24):15119–24.
 - [24] Collins CR, Withers-Martinez C, Bentley GA, Batchelor AH, Thomas AW, Blackman MJ. Fine mapping of an epitope recognized by an invasion-inhibitory monoclonal antibody on the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *J Biol Chem* 2007;282(10):7431–41.
 - [25] Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F, Blackman MJ. An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. *PLoS Pathog* 2009;5(1):e1000273.
 - [26] Rodrigues MHC, Rodrigues KM, Oliveira TR, Comodo AN, Rodrigues MM, Kocken CH, et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int J Parasitol* 2005;35(2):185–92.
 - [27] Morais CG, Soares JS, Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli AU, Braga EM. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75(4):582–7.
 - [28] Barbedo MB, Ricci R, Jimenez MC, Cunha MG, Yazdani SS, Chitnis CE, et al. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102(3):335–9.
 - [29] Wickramarachchi T, Premaratne PH, Perera KL, Bandara S, Kocken CH, Thomas AW, et al. Natural Human Antibody Responses to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. *Infect Immun* 2006;74(1):798–801.
 - [30] Polley SD, Mwangi T, Kocken CH, Thomas AW, Dutta S, Lanar DE, et al. Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. *Vaccine* 2004;23(5):718–28.
 - [31] Mufalo BC, Gentil F, Bargieri DY, Costa FT, Rodrigues MM, Soares IS. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. *Microbes Infect* 2008;10(12–13):1266–73.
 - [32] Oliveira-Freitas E, Casas CP, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Nico D, Souza LOP, et al. Acylated and deacylated saponins of *Quillaja saponaria* mixture as adjuvants for the FML-vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine* 2006;24:3909–20.
 - [33] Bargieri DY, Rosa DS, Braga CJ, Carvalho BO, Costa FT, Espindola NM, et al. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin. *Vaccine* 2008;26(48):6132–42.
 - [34] Bargieri DY, Leite JA, Lopes SCP, Sbrógio-Almeida E, Braga CJ, Ferreira LC, et al. Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of Salmonella Typhimurium. *Vaccine* 2010;28(16):2818–26.
 - [35] Crewther PE, Matthew ML, Flegg RH, Anders RF. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. *Infect Immun* 1996;64(8):3310–7.
 - [36] Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Margetts M, Matthew ML, Pollock B, et al. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine* 1998;16(2–3):240–7.
 - [37] Narum DL, Ogun SA, Thomas AW, Holder AA. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii* yoelii YM blood-stage infection. *Infect Immun* 2000;68(5):2899–906.
 - [38] Hodder AN, Crewther PE, Anders RF. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infect Immun* 2001;69(5):3286–94.
 - [39] Kocken CH, Withers-Martinez C, Dubbeld MA, van der Wel A, Hackett F, Valderrama A, et al. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infect Immun* 2002;70(8):4471–6.
 - [40] Dutta S, Lalitha PV, Ware LA, Barbosa A, Moch JK, Vassell MA, et al. Purification, characterization, and immunogenicity of the refolded ectodomain of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2002;70(6):3101–10.
 - [41] Kennedy MC, Wang J, Zhang Y, Miles AP, Chitsaz F, Saul A, et al. In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. *Infect Immun* 2002;70(12):6948–60.
 - [42] Lalitha PV, Ware LA, Barbosa A, Dutta S, Moch JK, Haynes JD, et al. Production of the subdomains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 ectodomain and analysis of the immune response. *Infect Immun* 2004;72(8):4464–70.
 - [43] Lalitha PV, Biswas S, Pillai CR, Saxena RK. Immunogenicity of a recombinant malaria vaccine candidate, domain I-II of AMA-1 ectodomain, from Indian *P. falciparum* alleles. *Vaccine* 2008;26(35):4526–35.
 - [44] Dutta S, Sullivan JS, Grady KK, Haynes JD, Komisar J, Batchelor AH, et al. High antibody titer against apical membrane antigen-1 is required to protect against malaria in the Aotus model. *PLoS One* 2009;4(12):e8138.
 - [45] Rogers WO, Gowda K, Hoffman SL. Construction and immunogenicity of DNA vaccine plasmids encoding four *Plasmodium vivax* candidate vaccine antigens. *Vaccine* 1999;17(23–24):3136–44.
 - [46] Gunasekera AM, Wickramarachchi T, Neafsey DE, Ganguli I, Perera L, Premaratne PH, et al. Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. *Mol Biol Evol* 2007;24(4):939–47.
 - [47] Figtree M, Pasay CJ, Slade R, Cheng Q, Cloonan N, Walker J, et al. *Plasmodium vivax* synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduced from diversity in AMA-1 and MSP-1 genes. *Mol Biochem Parasitol* 2000;108(1):53–66.
 - [48] Grynberg P, Fontes CJ, Hughes AL, Braga EM. Polymorphism at the apical membrane antigen I locus reflects world population history of *Plasmodium vivax*. *BMC Evol Biol* 2008;8:123.
 - [49] Rajesh V, Elamaram M, Vidya S, Gowrishankar M, Kochar D, Das A. *Plasmodium vivax*: genetic diversity of the apical membrane antigen-1 (AMA-1) in isolates from India. *Exp Parasitol* 2007;116(3):252–6.
 - [50] Putaporntip C, Jongwutiwes S, Grynberg P, Cui L, Hughes AL. Nucleotide sequence polymorphism at the apical membrane antigen-1 locus reveals population history of *Plasmodium vivax* in Thailand. *Infect Genet Evol* 2009;9(6):1295–300.
 - [51] Chesne-Seck ML, Pizarro JC, Vulliez-Le Normand B, Collins CR, Blackman MJ, Faber BW, et al. Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites. *Mol Biochem Parasitol* 2005;144(1):55–67.

On the Cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-Infected Erythrocytes

Bruna O. Carvalho,^{1,2,a} Stefanie C. P. Lopes,^{1,a} Paulo A. Nogueira,² Patricia P. Orlandi,² Daniel Y. Bargieri,^{5,6} Yara C. Blanco,¹ Ronei Mamoni,¹ Juliana A. Leite,¹ Mauricio M. Rodrigues,^{5,6} Irene S. Soares,⁷ Tatiane R. Oliveira,⁷ Gerhard Wunderlich,⁸ Marcus V. G. Lacerda,^{3,4} Hernando A. del Portillo,¹⁰ Maria O. G. Araújo,⁹ Bruce Russell,¹¹ Rossarin Suwanarusk,¹¹ Georges Snounou,^{11,12,13,14} Laurent Rénia,¹¹ and Fabio T. M. Costa¹

¹Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, ²Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz, ³Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Gerência de Malária, and ⁴Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, ⁵Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica and ⁶Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, ⁷Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, and ⁸Departamento de Parasitologia—Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, and ⁹Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ¹⁰Barcelona Center for International Health Research and Institutó Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Barcelona, Spain; ¹¹Singapore Immunology Network, Agency for Science, Technology, and Research, and ¹²Department of Microbiology, National University of Singapore, Singapore; ¹³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche S945 and ¹⁴Université Pierre et Marie Curie, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Background. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* are responsible for most of the global burden of malaria. Although the accentuated pathogenicity of *P. falciparum* occurs because of sequestration of the mature erythrocytic forms in the microvasculature, this phenomenon has not yet been noted in *P. vivax*. The increasing number of severe manifestations of *P. vivax* infections, similar to those observed for severe falciparum malaria, suggests that key pathogenic mechanisms (eg, cytoadherence) might be shared by the 2 parasites.

Methods. Mature *P. vivax*-infected erythrocytes (Pv-iEs) were isolated from blood samples collected from 34 infected patients. Pv-iEs enriched on Percoll gradients were used in cytoadhesion assays with human lung endothelial cells, *Saimiri* brain endothelial cells, and placental cryosections.

Results. Pv-iEs were able to cytoadhere under static and flow conditions to cells expressing endothelial receptors known to mediate the cytoadhesion of *P. falciparum*. Although Pv-iE cytoadhesion levels were 10-fold lower than those observed for *P. falciparum*-infected erythrocytes, the strength of the interaction was similar. Cytoadhesion of Pv-iEs was in part mediated by VIR proteins, encoded by *P. vivax* variant genes (*vir*), given that specific antisera inhibited the Pv-iE-endothelial cell interaction.

Conclusions. These observations prompt a modification of the current paradigms of the pathogenesis of malaria and clear the way to investigate the pathophysiology of *P. vivax* infections.

It has long been recognized that the directly attributable morbidity and mortality differ for the 2 most prevalent malarial parasite species, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. The higher multiplicative potential of *P. falciparum*-infected erythrocytes (Pf-iEs) no doubt contributes to their increased virulence. However, it is the withdrawal of mature Pf-iEs (parasites older than

24 h) from the peripheral circulation to that of the internal organs—a phenomenon known as *sequestration* [1]—that is considered to be the key pathogenic event. *P. falciparum* is characterized by almost total sequestration, such that few if any mature Pf-iE forms

Potential conflicts of interest: none reported.

Financial support: This work received financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grant 04/00638-6) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grants—Instituto do Milênio de Desenvolvimento e Tecnologia em Vacinas, Instituto Nacional de Tecnologia em Vacinas (CNPq-FAPEMIG), and Doenças Negligenciadas (576128/2008-2). B.O.C. and J.A.L. were sponsored by FAPESP fellowships (grants 05/60569-0 and 09/52013-3). S.C.P.L. and R.M. were supported by CNPq, and Y.C.B. received a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior fellowship. M.M.R., I.S.S., G.W., and F.T.M.C. are CNPq fellows. L.R. was supported by the Agency for Science, Technology, and Research, Singapore, and G.S. was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France.

^a B.O.C. and S.C.P.L. contributed equally to this work.

Received 28 December 2009; accepted 8 March 2010; electronically published 9 July 2010.

Reprints or correspondence: Dr Fabio T. M. Costa, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), PO Box 6109, 13083-970, Campinas-SP, Brazil (costaftm@unicamp.br or fabiotmc72@gmail.com).

The Journal of Infectious Diseases 2010;202(4):638–647

© 2010 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.
0022-1899/2010/20204-0017\$15.00
DOI: 10.1093/infdis/jiq215

are observed in peripheral blood samples during infection. Given that mature *P. vivax*-infected erythrocytes (Pv-iEs) are frequently observed in peripheral blood samples, it was concluded that sequestration did not occur with this parasite. As a consequence, the paradigm was formulated that sequestration of Pf-iEs in specific organs is the principal initial cause of pathology and that, when sequestration occurs in the brain or placenta, the likelihood of cerebral malaria and pregnancy-associated malaria increases. Indeed, most forms of severe malaria and nearly all mortality have been almost exclusively recorded for falciparum cases.

P. vivax, the most prevalent malarial species outside sub-Saharan Africa, imposes a substantial global public health burden [2], with recent estimates of 130–435 million infected persons per year among the 2.6 billion people at risk. Of equal importance was the observation that many types of severe malaria—long considered to be specific to *P. falciparum*—also commonly occur in *P. vivax*-infected persons. For instance, infection with *P. vivax* during pregnancy was found to be associated with a substantial reduction in birth weight [3]. Furthermore, in some areas of endemicity progression of vivax malaria to clinically severe forms, including cerebral malaria and acute respiratory distress syndrome, was found to occur as frequently as for falciparum infections, with similar levels of fatality [4–7]. This raises the possibility that pathological processes linked to cytoadhesion might also operate in *P. vivax*.

In *P. falciparum* infection, cytoadhesion of Pf-iEs to endothelial cells is mediated by interactions between members of the *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP-1) family, polymorphic proteins encoded by the *var* multigene family [8, 9], and defined host receptors on endothelial cells. Of the 10 or so receptors identified to date [10, 11], 3 have been extensively investigated: CD36, intercellular adhesion mol-

ecule 1 (ICAM-1), and chondroitin sulfate A (CSA). The last has been specifically associated with the binding of Pf-iEs to the placenta [12].

We wished to establish whether *P. vivax* parasites are able to cytoadhere under static or flow conditions to endothelial cells and placental cryosections and whether the receptors for Pf-iEs were also implicated. Furthermore, we assessed the involvement of VIR proteins as a potential Pv-iE ligand.

METHODS

Ethical approval. Informed consent was sought and granted from all patients attending the Tropical Medicine Foundation of Amazonas (FMT-AM), Amazonas, in northern Brazil. The procedures were approved by the Ethics Committee Board of the FMT-AM (process 2758/2008-FMT-AM; approval no. 1943).

Parasite isolation and enrichment. Once microscopic diagnosis of uncomplicated vivax or falciparum malaria was made and before the treatment was initiated, 5–10 mL of blood were collected into citrate-coated Vacutainer tubes (BD). Parasitemia levels rarely exceeded 5000 parasites/ μ L of blood. The blood was immediately processed to obtain enriched Pv-iEs. On average, a total of $\sim 1 \times 10^6$ Pv-iEs could be obtained, allowing only a limited number of cytoadhesion assays to be conducted. Patients who had received antimalarial treatment 3–4 weeks before the test were excluded. Immediately after collection, the red blood cells containing trophozoites and schizonts were separated from the younger forms on a 45% Percoll (Amersham) gradient, as described elsewhere [13] with minor modifications. Briefly, after plasma separation by centrifugation, blood pellets were washed 3 times and then resuspended in RPMI 1640 medium (Sigma) to a final hematocrit of 10%. Five milliliters of this suspension was overlaid on a 5-mL 45% Percoll solution

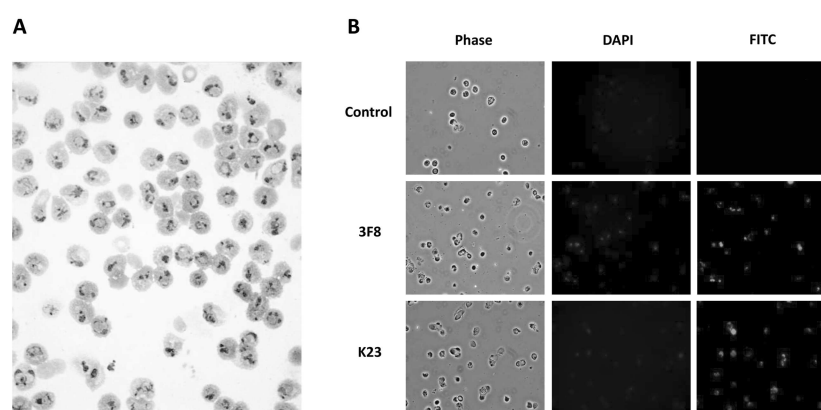


Figure 1. Percoll gradient enrichment of *Plasmodium vivax* maturing forms. *A*, Giemsa staining of the mature trophozoites and young schizonts obtained after Percoll gradient enrichment, yielding cell suspensions with 85%–97% *P. vivax*-infected erythrocytes. *B*, Parasite species and maturity confirmed by immunofluorescence assay using anti-PvMSP-1₉ conformational monoclonal antibodies (3F8 and K23) diluted at 1:50. Normal mouse serum samples were used as negative controls. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; FITC, fluorescein isothiocyanate.

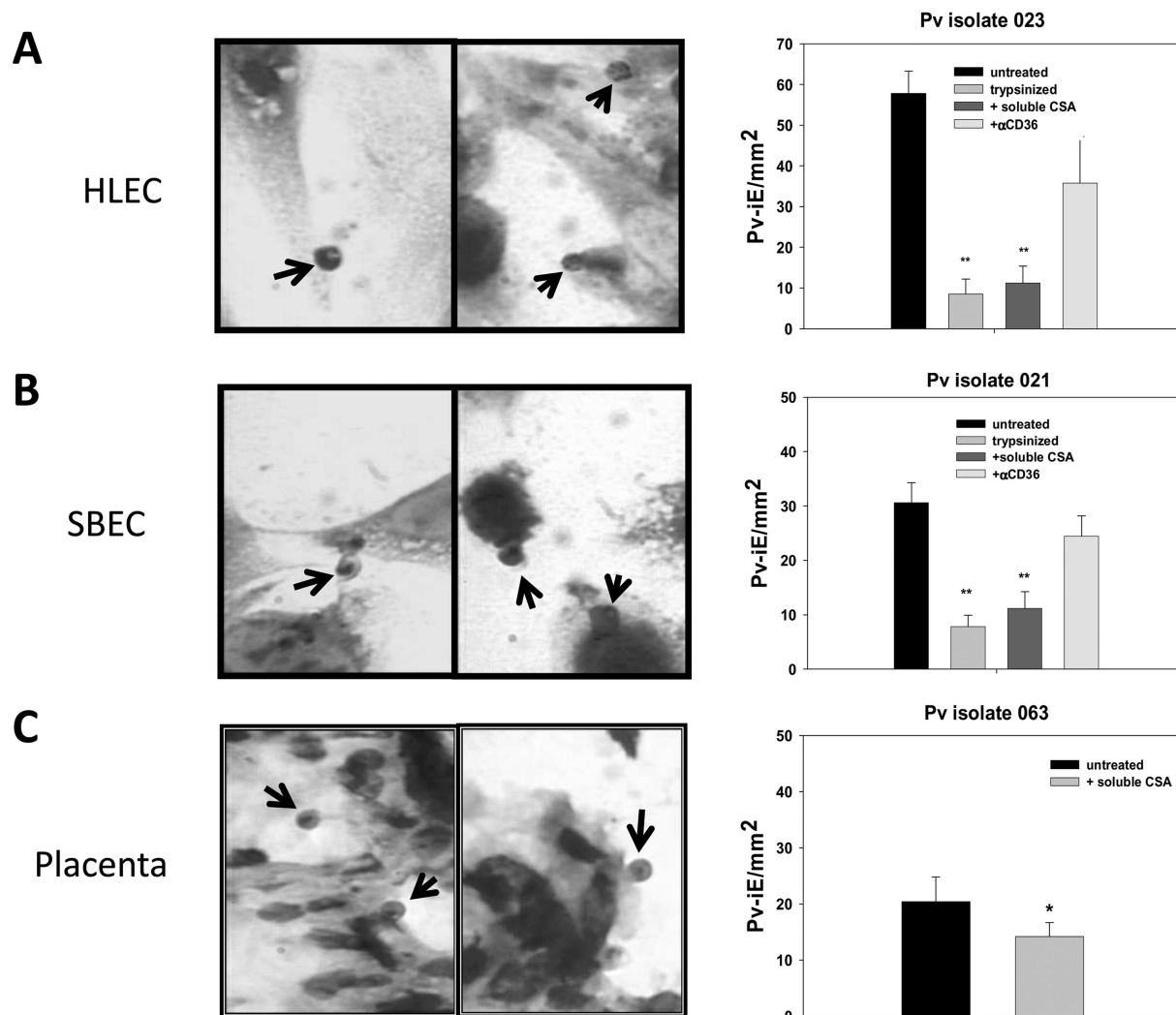


Figure 2. Adhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes (Pv-iEs) to lung and brain endothelial cells or placental cryosections. Shown are representative photomicrographs of (left) and cytoadhesion assays for (right) Pv-iEs binding to human lung endothelial cells (HLECs) (A), *Saimiri* brain endothelial cells (SBECs) (B), and placental cryosections (C) stained with Giemsa stain and visualized using a Nikon microscope at $\times 100$ magnification. Arrows indicate Pv-iEs bound to host cells. Representative results for Pv-iEs obtained from different patients and used for cytoadhesion assays conducted on untreated cells, on Pv-iEs pretreated with trypsin, or in the presence of soluble chondroitin sulfate A (CSA) or anti-CD36 antibody are shown. In all cases, parasites (5×10^4) were left for 1 h at 37°C in 8-well culture slides ($0.69 \text{ cm}^2/\text{well}$) and then extensively washed, and adhered Pv-iEs were counted. Data are the mean number of bound Pv-iEs per square millimeter, normalized to an input of 1×10^3 Pv-iEs/ mm^2 ; error bars indicate standard deviations. $^*.05 > P > .01$ and $^{**}0.01 > P > .001$ (Kruskal-Wallis test).

(2.25 mL of Percoll, 0.5 mL of RPMI 1640 [$\times 10$], and 2.25 mL of distilled water) in a 15-mL tube. After centrifugation, floating mature iEs were collected and resuspended in RPMI 1640. Ex vivo, Pf-iEs were enriched in Percoll gradient at 60%, as described elsewhere [14]. Giemsa-stained thick smears (before enrichment) and thin smears (after enrichment) were examined to determine the *Plasmodium* species and the percentage of mature stages, respectively. A sensitive nested polymerase chain reaction (PCR) assay was applied to the samples to confirm the diagnosis [15].

P. vivax slide preparation and immunofluorescence assays. Immunofluorescence assays (IFAs) were performed in 8-well slides containing mature stages of *P. vivax*. Immediately after enrichment on Percoll, Pv-iEs were washed and resuspended in 10% fetal calf serum (FCS) (Nutricell) and then deposited on IFA slides ($50 \mu\text{L}/\text{well}$), fixed in acetone for 10 min, air-dried, and stored at -20°C until use. Ten micrograms per milliliter of each monoclonal antibody (3F8 or K23) against *P. vivax* merozoite surface protein 1 (PvMSP1) [16] was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) and applied to slides for 30

Table 1. Cytoadhesion Assays for *Plasmodium vivax*-Infected Erythrocytes (Pv-iEs) and *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes (Pf-iEs) Collected from 24 Patients

Parasite, patient	HLECs					SBECs				Placental cryosections	
	Adhesion ^a	% of inhibition ^b				Adhesion ^a	% of inhibition ^b			Adhesion ^a	sCSA, % of inhibition ^b
		Trypsinized	sCSA	Anti-CD36	CaseABC		Trypsinized	sCSA	Anti-CD36		
Pv-iEs											
008						58.2 ± 9.8	19 ± 10				
015						32.4 ± 11.04	52 ± 11*				
016	52.4 ± 8.5	70 ± 7*									
019	36.1 ± 10.6	59 ± 10 **	25 ± 21								
021						30.6 ± 3.7	74 ± 7**	63 ± 10**	20 ± 12		
022	28.3 ± 4.5	29 ± 21**	52 ± 8**	2 ± 27							
023	57.8 ± 5.5	85 ± 6**	81 ± 7**	38 ± 20							
024	33.9 ± 3.7	76 ± 7**	65 ± 8**	20 ± 11							
030	16.6 ± 3.4	46 ± 10***				12.8 ± 2.8	42 ± 18*				
031	26.1 ± 4.5	47 ± 15***									
034	56.7 ± 7.4		18 ± 10*			49.5 ± 7.9		28 ± 9*			
035	37.5 ± 9.4		41 ± 13**			23.9 ± 8.0		31 ± 30			
036										22.3 ± 5.4	23 ± 19
063										20.4 ± 4.4	30 ± 12*
065	33.5 ± 8.8		51 ± 13***								
066										9.9 ± 3.2	15 ± 40
076	19.7 ± 4.0		34 ± 18***		7 ± 25						
083	38.6 ± 7.3		49 ± 15**		4 ± 21						
086	30.1 ± 6.5		40 ± 16**		13 ± 22						
087	41.3 ± 5.2		16 ± 23		3 ± 15						
Pf-iEs											
002	130.1 ± 23.7										
003	636.7 ± 119.2										
005										773.5 ± 179.5	87 ± 7*
008	454.4 ± 45.4										

NOTE. Data from *P. falciparum* isolates confirmed that the host cells and placental cryosections used were able to sustain parasite cytoadhesion. Asterisks indicate statistical significance with respect to adhesion values, as follows: *.05 > P > .01; **.01 > P > .001; and P < .001. HLECs, human lung endothelial cells; SBECs, *Saimiri* brain endothelial cells; SD, standard deviation.

^a Mean no. (±SD) of bound infected erythrocytes per square millimeter, normalized to an input of 1 × 10³ infected erythrocytes/mm².

^b Percentage of inhibition (±SD) of adhesion was calculated after enumeration of adherent infected erythrocytes either following trypsinization of infected erythrocytes or prior to the assay, or when the assay was conducted in the presence of soluble CSA (sCSA), anti-CD36 monoclonal antibody, or in endothelial cells pretreated with chondroitinase ABC (CaseABC).

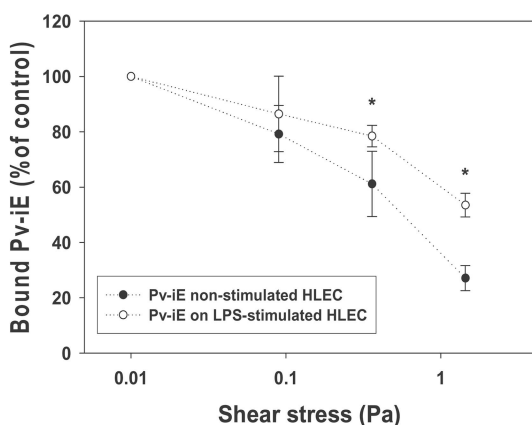


Figure 3. Resistance of *Plasmodium vivax*-infected erythrocyte (Pv-iE) cytoadhesion to flow conditions. Enriched Pv-iEs (5×10^5) were allowed to adhere to human lung endothelial cells (HLECs) during a 1-h incubation at 37°C in single-well microslides (8.6 cm²) mounted in a flow chamber system, and cytoadhesion medium (RPMI 1640 [pH 6.8]) was flowed through at a wall shear stress of 0.09, 0.36, and 1.44 Pa for 10, 5, and 2.5 min, respectively; medium was not flowed through the control chamber. The Pv-iEs that still bound at the end of the flow period were counted in 20 randomly selected fields, and the percentage of binding compared with that in the control chamber were calculated. Data are mean binding percentages for 2 patient isolates (104 and 106) on HLECs previously treated with lipopolysaccharide (LPS) (1.0 µg/mL) or left untreated; error bars indicate standard deviations. * $P < .05$ for the comparison of adhesion to nonstimulated vs LPS-stimulated HLECs (Mann-Whitney U test).

min at 37°C. After washing with PBS, slides were incubated with 10 µg/mL fluorescein isothiocyanate-conjugated sheep anti-mouse immunoglobulin G (Sigma) and 100 µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Molecular Probes) for 30 min at 37°C and then washed several times. Positive monoclonal antibody recognition was detected with the aid of an immunofluorescence microscope (Nikon). For IFAs conducted using VIR antisera, Pv-iEs were left in suspension (liquid phase). Briefly, parasites were fixed in 2% paraformaldehyde and washed and diluted in FCS, and then mouse VIR-A4 and VIR-E5 antisera were added at a final dilution of 1:20 and incubated for 60 min. After 2 washes with FCS, cells were incubated with 100 µg/mL Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) and 500 µg/mL DAPI for 30 min at 37°C and then washed twice with FCS. In both assays, positive recognition by monoclonal antibody, VIR-A4, VIR-E5, or MSP-1₁₉ antisera was detected with the aid of an immunofluorescence microscope.

Polyclonal VIR antisera were generated by injecting mice with VIR-A4 or VIR-E5 glutathione S-transferase (GST) fusion proteins belonging to the A or E *vir* subfamilies, respectively [17, 18] and raised after 2 immunizations (21-day interval) with each recombinant protein (5 µg/animal/dose) emulsified

in complete or incomplete Freund adjuvant. No Pv-iE-positive labeling was visualized by means of GST antisera.

Selection of monophenotypic cultured *P. falciparum* parasites and cells. The *P. falciparum* lines FCR3 [19] and S20 [20] were cultured in candle jars. Briefly, Pf-iEs were cultivated in fresh type O⁺ human erythrocytes (Blood Center, Universidade Estadual de Campinas) suspended at a final hematocrit of 4% in complete medium (RPMI 1640 [pH 7.2]) (Sigma) and supplemented with 10% homologous human plasma.

The following cell lines were used in this study: *Saimiri* brain endothelial cells (SBECs) and human lung endothelial cells (HLECs) [21, 22], adapted from cultured primary explants, and CHO-ICAM, CHO-CD36 and CHO-K1 cells [23]. Selection of FCR3 parasites to CSA (FCR3^{CSA}) was performed by panning (5 rounds) of mature-stage iEs on endothelial cells [21, 24] in the presence of soluble CSA (100 µg/mL; Sigma).

Mature S20 trophozoites were selected on CHO-ICAM cells (5 rounds) and then by a further 2 rounds on plastic plates coated with recombinant ICAM-1 [25]. The selected S20^{ICAM} parasite line bound strongly to CHO-ICAM cells but poorly to nontransfected CHO-K1 cells (data not shown).

Static cytoadhesion assays. We assessed the ability of Pv-iEs or Pf-iEs obtained from infected patients to adhere to placenta cryosections, HLECs, and SBECs by performing static cytoadhesion assays as described elsewhere [19, 21, 26] with minor modifications. Briefly, HLECs or SBECs were grown to confluence on 8-well culture slides (0.69 cm²/well; BD), and 5×10^4 Percoll-enriched iEs were then added to each well in a total volume of 200 µL of cytoadhesion medium (RPMI 1640 [pH 6.8]), either alone or in the presence of 100 µL of soluble CSA (100 µg/mL) or anti-CD36 (5 µg/mL). Culture slides were incubated for 1 h at 37°C and then extensively washed in cytoadhesion medium. To confirm that the ligands on the surface of Pv-iEs were proteins, Pv-iEs were treated with trypsin (1 mg/mL) for 45 min at 37°C before incubation over endothelial cells. For confirmation of CSA as a receptor, HLECs were previously incubated with chondroitinase ABC (CaseABC) (0.5 U/mL; Sigma) for 2 h at 37°C. Involvement of VIR antigens in the cytoadhesion of Pv-iEs to HLECs was evaluated in an assay where inhibition of parasite binding was tested with antisera (diluted at 1:5 or 1:10) to VIR-A4 or VIR-E5 GST-fused proteins. Serum samples from mice immunized solely with GST in complete or incomplete Freund adjuvant were used as specificity controls. For these assays, inhibition was determined as a percentage of the negative control and was expressed as the mean value for 3 wells $\pm$ standard deviation.

Assays of adhesion to placental trophoblasts were performed as described elsewhere [19, 26, 27] with minor modifications. Placental biopsy samples from 3 human immunodeficiency virus-negative Brazilian women with malaria were collected immediately after delivery, snap-frozen in liquid nitrogen/*n*-hex-

Table 2. Cytoadhesion Assays for *Plasmodium vivax*-Infected Erythrocytes (Pv-iEs) Obtained from 7 Patients or Cultured *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes (Pf-iEs) to Human Lung Endothelial Cells (HLECs) under Flow Conditions

Parasite, patient (LPS treatment)	Adhesion ^a at 0.00 Pa	Shear stress					
		0.09 Pa		0.36 Pa		1.44 Pa	
		Adhesion ^a	Binding, ^b %	Adhesion ^a	Binding, ^b %	Adhesion ^a	Binding, ^b %
Pv-iEs							
090 (no)	67.4 ± 14.4	34.2 ± 8.6	50.8	30.4 ± 9.6	45.2	ND	...
090 (yes)	55.6 ± 9.6	48.0 ± 17.8	86.3	42.7 ± 15.4	76.9	ND	...
091 (yes)	53.0 ± 6.1	39.0 ± 7.7	73.6	38.5 ± 10.1	72.6	ND	...
092 (no)	17.6 ± 9.6	13.4 ± 8.2	76.1	10.8 ± 2.9	61.1	ND	...
093 (no)	47.9 ± 12.0	29.9 ± 8.2	62.4	ND	...	ND	...
094 (no)	60.4 ± 13.8	51.3 ± 9.1	84.9	ND	...	ND	...
104 (no)	30.4 ± 9.1	26.3 ± 5.3	86.5	16.1 ± 5.3	52.9	9.2 ± 7.7	30.3
104 (yes)	32.5 ± 13.8	25.0 ± 5.3	76.9	24.6 ± 5.3	75.7	16.4 ± 6.7	50.5
106 (no)	28.6 ± 8.6	20.5 ± 14.9	71.7	19.8 ± 6.1	69.2	6.8 ± 5.8	23.8
106 (yes)	29.1 ± 8.2	27.9 ± 10.6	96.2	23.6 ± 7.2	81.1	16.4 ± 6.7	56.4
Pf-iEs							
S20 ^{CAM} (no)	39.8 ± 15.8	19.2 ± 13.0	47.9	12.0 ± 5.8	30.0	9.6 ± 8.2	24.3
FCR3 ^{CSA} (no)	370.9 ± 50.9	333.1 ± 25.0	89.8	294.5 ± 36.9	79.4	190.8 ± 34.7	51.4

NOTE. *P. vivax* or cultured *P. falciparum*, selected on intercellular adhesion molecule 1 (S20^{CAM}) or chondroitin sulfate A (FCR3^{CSA}), were allowed to adhere to HLECs either previously incubated with 1.0 µg/mL lipopolysaccharide (LPS) or not incubated with LPS, and then cytoadhesion medium was flowed through at a wall shear stress of 0.09, 0.36, or 1.44 Pa for 10, 5, and 2.5 min, respectively. ND, not determined; SD, standard deviation.

^a No. of remaining adherent parasites after application of a flow condition. Data are the mean no. (±SD) of infected erythrocytes per square millimeter, normalized to an input of 1×10^3 infected erythrocytes/mm².

^b Percentage of parasites that remained cytoadherent after being subjected to wall shear stress.

ane (Merck), and then stored frozen in Tissue-Teck (Thermo) before use. Serial placenta cryosections (5–7 µm) were cut with a cryostome and mounted on individual glass slides. Cryosections were washed and air-dried, and an area of ~1 cm² was delimited with a Dako Pen device. Assays of the adhesion of Pv-iEs to placental cryosections were performed as for endothelial cells. Three to 4 placenta cryosections were used for each adhesion assay. After a 1-h incubation at 37°C and following Giemsa staining, the number of infected erythrocytes that adhered to the endothelial cell monolayer or to placenta cryosections was counted under the microscope.

Involvement of CD36 or ICAM-1 host receptors was verified by allowing Pv-iEs to adhere under static conditions to CHO-CD36 cells, CHO-ICAM cells, or CHO-745 cells, a cell line that does not express either of these receptors [23]. In these experiments, we performed adhesion assays without using human serum in the medium because it has been shown that human immunoglobulins present in normal serum can mediate binding of Pf-iEs to CHO-745 cells [28].

Flow-based cytoadhesion assays. To assess the resistance of Pv-iEs to shear stress, we performed flow-based cytoadhesion assays according to a modified version of a method that has been described elsewhere [19, 26, 27]. Briefly, HLECs were cultured to confluence in single-well culture microslides (8.6 cm², corresponding to 12.5 times the area of each well in a 8-well culture slide), to which 1.5 mL of 5×10^5 Pv-iEs enriched

on 45% Percoll gradient was added. After a 1-h incubation at 37 °C, microslides were mounted in a flow chamber system (Immunetics), and cytoadhesion medium (RPMI 1640 [pH 6.8]) was flowed through at a wall shear stress of 0.09, 0.36, or 1.44 Pa for 10, 5, and 2.5 min, respectively. After this, the

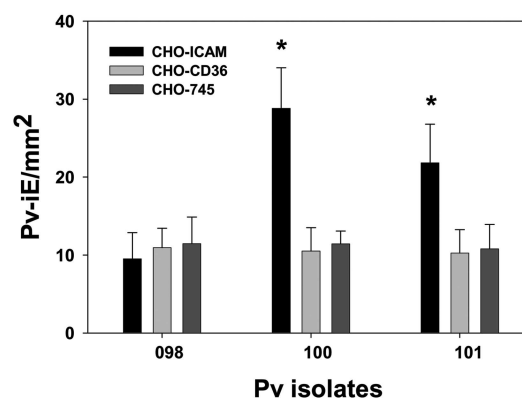


Figure 4. Adhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes (Pv-iEs) to specific receptors. Pv-iEs (5×10^4 cells/well) were allowed to adhere to CHO–intercellular adhesion molecule (ICAM), CHO-CD36, or control CHO-745 cells. Data are the mean number of bound Pv-iEs per square millimeter, normalized to an input of 1×10^3 Pv-iEs/mm²; error bars indicate standard deviations. **P* < .001 for the comparison of adhesion to CHO-ICAM cells vs CHO-CD36 or CHO-745 cells (Kruskal-Wallis test).

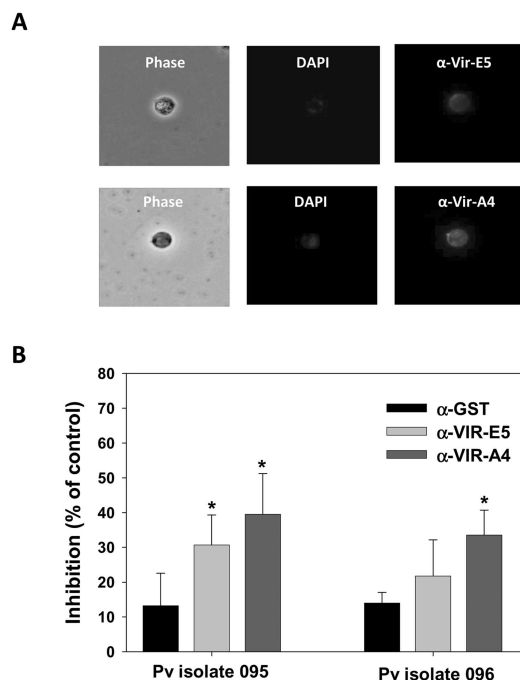


Figure 5. Recognition and blocking of *Plasmodium vivax*-infected erythrocyte (Pv-iE) cytoadhesion to human lung endothelial cells (HLECs) by specific VIR antisera. *A*, Immunofluorescence of a Pv-iE labeled with antisera against VIR-A4 (1:20) or VIR-E5 (1:20). Shown are results for phase contrast, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) staining, and mouse anti-VIR-E5 (top) or anti-VIR-A4 (bottom) with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G. *B*, Results of incubation of Pv-iEs (5×10^4 cells/well) for 1 h at 37°C alone or in the presence of VIR-A4 or VIR-E5 antisera diluted at 1:5 (isolate 095) or 1:10 (isolate 096). In both assays, serum samples from mice immunized solely with glutathione S-transferase (GST) in Freund adjuvant were used as a negative control. For these assays, inhibition was determined as the percentage of negative control counts, expressed as mean values for triplicate wells; error bars indicate standard deviations. * $P < .05$ for the comparison of inhibition with GST antisera (Kruskal-Wallis test).

remaining bound Pv-iEs were counted in 20 randomly selected fields through a digital camera attached to a microscope (Moticam 2500; Motic). Results were expressed as the mean number of infected erythrocytes per square millimeter $\pm$ standard deviation. In some experiments, microslides were stained with Giemsa after a determined shear stress condition, to visualize bound Pv-iEs. Alternatively, HLECs were incubated with lipopolysaccharide (LPS) (1.0 $\mu\text{g/mL}$; Sigma) for 4 h at 37°C and then washed before parasite cytoadhesion. Cultured *P. falciparum* panned isolates (FCR3^{CSA} and S20^{ICAM}) were used as controls. To ascertain whether *P. vivax* adhesion to HLECs occurred under flow conditions, 1×10^6 enriched Pv-iEs diluted in cytoadhesion medium were flowed at a wall shear stress of 0.09 or 0.36 Pa for 1 h and then filmed. For both the static and flow-based assay, parasite adhesion was normalized to 1×10^3 infected erythrocytes/ mm^2 , taking into account the area

and the number of infected erythrocytes used in each assay (5×10^4 infected erythrocytes in 0.69 cm^2 or 5×10^5 infected erythrocytes in 8.6 cm^2).

Flow cytometry. Levels of ICAM-1 expression on HLECs were assessed by flow cytometry. Briefly, 1×10^6 cells either treated with LPS (1.0 $\mu\text{g/mL}$) or left untreated were harvested, incubated with anti-human CD54 (ICAM-1) (phycoerythrin; BD Bioscience) for 30 min at 4°C, washed, and fixed in 2% formaldehyde. Analysis was performed using a FACScanto flow cytometer (BD), and the mean fluorescence intensity and the percentage of positive cells were analyzed with the aid of FCS Express software (version 3.00.0320; De Novo Software). For each sample, a minimum of 100,000 events were acquired.

Statistical analysis. The statistical significance of adhesion to different cells types at various conditions was determined using the Mann-Whitney *U* test or the Kruskal-Wallis test. Calculations were performed using BioEstat software (version 3.0; CNPq, Brazil) and Prism software (version 3.02; GraphPad Software). Differences were considered significant at $P < .05$.

RESULTS

Our investigation of Pf-iE cytoadherence was substantially facilitated by the availability of in vitro-cultured *P. falciparum*, an avenue not open for *P. vivax*. We conducted our experiments with Pv-iEs using samples obtained directly from patients presenting with uncomplicated *P. vivax* malaria in Manaus, Brazil. The limitations imposed by reliance on clinical samples with parasites of diverse genotypes and of varying suitability for cytoadherence assays were compensated for by the collection of a relatively large number of samples ($n = 34$). As controls for the cytoadhesion assays, *P. falciparum*-infected blood was also obtained from 4 patients attending the same hospital. In all cases, a sensitive PCR assay was used to exclude the presence of mixed-species infections. As an initial step, cytoadherence was assessed using HLECs, SBECs, and human placental cryosections. These cell lines and placental cryosections have been characterized and validated for assays of *P. falciparum* cytoadhesion [19, 21, 22, 26, 27]. In *P. falciparum* infection, mature forms of the parasite cytoadhere more strongly than do freshly invaded forms. We hypothesized that this could be also the case for *P. vivax* infection. Given the different densities of mature-stage and early-stage parasites, we subjected *P. vivax* parasites collected from the patients directly and without prior short-term culturing to a Percoll gradient, enabling the recovery of almost-pure trophozoite- and schizont-stage Pv-iEs (Figure 1). Of note, after enrichment the percentage of MSP-1₁₉-expressing forms observed in IFA varied from 85% to 97%.

Pv-iEs were first tested for their ability to cytoadhere to HLECs, SBECs, and placental cryosections under static conditions. For some patients, aliquots of the same Pv-iE suspension were tested after digestion with trypsin or in the presence

of soluble CSA, anti-CD36 monoclonal antibody in the cytoadhesion medium, or HLECs pretreated with CaseABC (Figure 2 and Table 1). All the Pv-iEs tested displayed some level of cytoadherence to HLECs and/or SBECs or to placental cryosections. Pv-iE binding to areas not containing endothelial cells was not observed. Pretreatment of Pv-iEs with trypsin generally decreased adhesion to HLECs or SBECs by 19%–85% (mean, 54%), depending on the parasite isolate. Significant inhibition of cytoadherence was also observed in the presence of soluble CSA (range, 16%–81%; mean, 42%). By contrast, when assays were conducted in the presence of anti-CD36, the extent of inhibition of cytoadherence was not statistically significant (Table 1), although only a few isolates could be tested. Moreover, unlike the higher inhibition observed with soluble CSA, HLECs pretreated with CaseABC did not significantly abolish adhesion of the same Pv-iEs (Table 1). Cytoadhesion assays were also conducted in parallel with similarly enriched mature Pf-iEs derived from 4 patients. The levels of cytoadherence observed were ~10-fold higher than those recorded for Pv-iEs (Table 1).

Having demonstrated that Pv-iEs could cytoadhere to endothelial cells under static conditions, it was important to evaluate whether the observed cytoadherence was biologically relevant and whether it could be maintained under the flow conditions that parasites are subjected to in the bloodstream. Shear stress in postcapillary venules is close to 0.08 Pa [29]. Thus, we enriched Pv-iEs from 7 individuals and conducted flow-based cytoadhesion assays on HLECs at shear stress conditions varying from 0.09 to 1.44 Pa. The parasites that remained attached after being subjected to increasing flow rates for defined periods were enumerated by microscopic examination after Giemsa staining (Figure 3 and Table 2). Given that HLECs express CSA and ICAM-1 on their surface, we performed parallel assays using *P. falciparum* FCR3 and the S20 iEs preselected on CSA (FCR3^{CSA}) and ICAM-1 (S20^{ICAM}). As for Pf-iEs (FCR3^{CSA}), even at a relatively high shear stress (1.44 Pa) a substantial proportion (30%) of the cytoadherent Pv-iEs could not be detached (Table 2). Furthermore, stimulation of the HLECs with LPS significantly strengthened the cytoadherence, because 56% of the cytoadherent Pv-iEs could not be detached at 1.44 Pa (Figure 3). Of note, LPS treatment augmented ICAM-1 expression levels by 3-fold (data not shown). The strength of Pv-iE adhesion was similar to that observed for *P. falciparum* FCR3^{CSA} to unstimulated HLECs (Table 2). The behavior of the cytoadherent Pv-iEs to HLECs under flow conditions was recorded in real time and can be seen in Videos 1 and 2, which are available in the online version of the *Journal* and which show that cytoadherent Pv-iEs display the rolling characteristics of cytoadherent *P. falciparum* parasites [30]. Video 1 shows the rolling and binding of a Pv-iE to an HLEC; parasites were diluted in medium and flowed at a wall shear

stress of 0.09 Pa. Video 2 shows 2 Pv-iEs bound to HLECs under a flow condition of 0.36 Pa.

We then tested whether CD36 or ICAM-1, both present on the HLEC surface [21, 22], were implicated in the observed Pv-iE cytoadherence. For this, CHO lines transfected with CD36 or ICAM-1 were used. None of the Pv-iEs from the 3 samples tested showed binding to CD36 (Figure 4), because the levels of cytoadherent Pv-iEs were not significantly different from background (binding of Pv-iEs to untransfected CHO-745 cells). By contrast, a 2.1–2.7-fold increase in cytoadhesion to ICAM-1 over background was observed for Pv-iEs from 2 of the 3 samples tested (Figure 4). Low cytoadhesion of Pv-iEs isolated from patient 098 may indicate variations in the binding phenotypes of different isolates.

Finally, we investigated potential parasite ligands involved in Pv-iE cytoadhesion. A multigene family orthologous to the *P. falciparum* var genes does not occur in the genome of *P. vivax* [31]. However, a superfamily of surface-expressed variant antigens genes (*vir*) is present in *P. vivax*; it has ~350 members, which can be subdivided into 10 subfamilies and unclustered members [17, 31, 32]. Hence, we tested 2 specific polyclonal antisera, VIR-A4 and VIR-E5, from the A and E subfamilies, respectively [18]. Pv-iEs were specifically recognized by both antisera in IFAs (Figure 5A) but not by the control GST antisera. Significant inhibition of Pv-iE cytoadherence on HLECs was observed when either VIR antisera was included in the assay medium but not in the presence of the GST antisera (Figure 5B).

DISCUSSION

Our observations provide the first evidence, to our knowledge, that mature Pv-iEs are capable of cytoadhering to endothelial cells and placental cryosections. Two receptors used by *P. falciparum* for binding to endothelial cells, ICAM-1 and CSA, were also implicated in the cytoadhesion of *P. vivax* parasites, at least to some extent. However, CaseABC treatment suggested that cytoadhesion to CSA, a highly negative charged molecule, might be due to charge interaction. Indeed, it has been shown that binding to CSA is highly dependent on ionic strength [33]. The fraction of Pv-iEs that cytoadhered was up to 10-fold lower than that for Pf-iEs. Importantly, cytoadhesion of Pv-iEs, once established, is as strong as that of CSA-selected Pf-iEs, as demonstrated by the flow assays (Table 2). Because the parasites we assayed were directly obtained from patients, our data suggest that only a minor fraction of *P. vivax* would have the capacity to cytoadhere in vivo. Partial retention of *P. vivax* from the peripheral circulation would explain why the mature forms of this parasite are generally found in peripheral blood. This is consistent with the observation of partial and differential accumulation of Pv-iEs in organs of *P. vivax*-infected squirrel monkeys [34], as well as with observations of partial depletion

of mature *P. vivax* in the peripheral blood of humans [35, 36]. Our observation of Pv-iE cytoadhesion to placental tissue from sections of the placenta obtained after delivery (data not shown) suggests that the phenomenon can occur in vivo. However, the histopathological studies of postmortem tissues that would be required to indicate whether this phenomenon extends to other organs in infected individuals are limited.

For all isolates for which trypsin treatment was tested, the only partially abrogated Pv-iE cytoadhesion suggests that trypsin-resistant ligands commonly occur on the Pv-iE surface. It would be important to establish whether other receptors are implicated in Pv-iE cytoadhesion and explore the precise roles played by ICAM-1 and CSA. Finally, detailed investigations of the role played by VIR proteins as cytoadhesive ligands, for which we present indirect evidence, are complicated because (1) multiple members of the VIR protein family are expressed on the infected red blood cell surface [17], unlike the clonally expressed *var* genes of *P. falciparum* [37], and (2) the high number of *vir* genes present in the genome (346 *vir* genes for the Sal line of *P. vivax* [31], as opposed to 59 *var* genes for the 3D7 line of *P. falciparum*) [38]. Nevertheless, our data call for further investigation of the role played by VIR proteins in Pv-iE cytoadhesion.

Although infections with *P. vivax* are less life-threatening than those with *P. falciparum*, morbidity in *P. vivax* infection is associated with anemia and a pronounced cytokine-mediated inflammatory response [4]. Differential accumulation of a proportion of parasites to some organs, such as the lungs or placenta, might be targeted by the inflammatory response to this organ, leading to a more severe clinical presentation [4, 39, 40].

In conclusion, our observations add a new aspect to the pathophysiology of a major (yet mostly neglected) human pathogen, which could lead to novel therapeutic approaches to alleviate the increasingly recognized health burden globally imposed by this distinctly not-so-benign parasite.

Acknowledgments

We especially thank Dr Jürg Gysin (Institut Pasteur, Guadeloupe, France) and Dr Artur Scherf (Institut Pasteur, Paris, France) for providing endothelial cells, *P. falciparum* FCR3 parasites, and CHO-CD36 cells. We thank Dr Cristina Vicente and Dr Claudio C. Werneck for providing the megapixel digital camera and for discussion. We are grateful to Anne Charlotte Grüner for her critical comments. L.R. and G.S. are currently part of an official collaboration between the Singapore Immunology Network, Agency for Science, Technology, and Research, and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Laboratoire International Associé). F.T.M.C. dedicates this study to Zeci T. M. Costa (in memoriam).

References

1. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **2002**;415:673–679.
2. Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* **2001**;64:97–106.
3. Nosten F, McGready R, Simpson JA, et al. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *Lancet* **1999**;354:546–549.
4. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of *vivax* malaria. *Trends Parasitol* **2009**;25:220–227.
5. Genton B, D'Acremont V, Rare L, et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med* **2008**;5:e127.
6. Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerg Infect Dis* **2005**;11:132–134.
7. Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med* **2008**;5:e128.
8. Kyes S, Horrocks P, Newbold C. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annu Rev Microbiol* **2001**;55:673–707.
9. Scherf A, Lopez-Rubio JJ, Riviere L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* **2008**;62:445–470.
10. Cserti CM, Dzik WH. The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood* **2007**;110:2250–2258.
11. Fairhurst RM, Welles TE. Modulation of malaria virulence by determinants of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 display. *Curr Opin Hematol* **2006**;13:124–130.
12. Duffy PE. *Plasmodium* in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia. *Parasitology* **2007**;134:1877–1881.
13. Ihalamulla RL, Mendis KN. *Plasmodium vivax*: isolation of mature asexual stages and gametocytes from infected human blood by colloidal silica (Percoll) gradient centrifugation. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1987**;81:25–28.
14. Fernandez V. Purification and synchronization of erythrocytic stages. In: Ljungström I, Perlmann H, Schlichtherle M, Scherf A, Wahlgren M. *Methods in malaria research*. 4th ed. Manassas, Virginia: MR4/ATCC, **2004**:26–7.
15. Snounou G, Singh B. Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. *Methods Mol Med* **2002**;72:189–203.
16. Bargieri DY, Rosa DS, Braga CJ, et al. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella* Typhimurium FliC flagellin. *Vaccine* **2008**;26:6132–6142.
17. Fernandez-Becerra C, Pein O, de Oliveira TR, et al. Variant proteins of *Plasmodium vivax* are not clonally expressed in natural infections. *Mol Microbiol* **2005**;58:648–658.
18. Oliveira TR, Fernandez-Becerra C, Jimenez MC, Del Portillo HA, Soares IS. Evaluation of the acquired immune responses to *Plasmodium vivax* VIR variant antigens in individuals living in malaria-endemic areas of Brazil. *Malar J* **2006**;5:83.
19. Costa FT, Fusai T, Parzy D, et al. Immunization with recombinant duffy binding-like-γ3 induces pan-reactive and adhesion-blocking antibodies against placental chondroitin sulfate A-binding *Plasmodium falciparum* parasites. *J Infect Dis* **2003**;188:153–164.
20. di Santi SM, Boulous M, Vasconcelos MA, Oliveira S, Couto A, Rosario VE. Characterization of *Plasmodium falciparum* strains of the state of Rondonia, Brazil, using microtests of sensitivity to antimalarials, enzyme typing and monoclonal antibodies [in Portuguese]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **1987**;29:142–147.
21. Gay F, Robert C, Pouvelle B, Peyrol S, Scherf A, Gysin J. Isolation and characterization of brain microvascular endothelial cells from *Saimiri* monkeys: an in vitro model for sequestration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol Methods* **1995**;184:15–28.
22. Muanza K, Gay F, Behr C, Scherf A. Primary culture of human lung microvessel endothelial cells: a useful in vitro model for studying *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadherence. *Res Immunol* **1996**;147:149–163.
23. Hasler T, Albrecht GR, Van Schravendijk MR, et al. An improved microassay for *Plasmodium falciparum* cytoadherence using stable trans-

- formants of Chinese hamster ovary cells expressing CD36 or intercellular adhesion molecule-1. *Am J Trop Med Hyg* **1993**; 48:332–347.
24. Pouvelle B, Fusai T, Lepolard C, Gysin J. Biological and biochemical characteristics of cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin-4-sulfate. *Infect Immun* **1998**; 66:4950–4956.
 25. Noviyanti R, Brown GV, Wickham ME, Duffy MF, Cowman AF, Reeder JC. Multiple var gene transcripts are expressed in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes selected for adhesion. *Mol Biochem Parasitol* **2001**; 114:227–237.
 26. Pouvelle B, Traore B, Nogueira PA, Pradines B, LePolard C, Gysin J. Modeling of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadhesion in microvascular conditions: chondroitin-4-sulfate binding, a competitive phenotype. *J Infect Dis* **2003**; 187:292–302.
 27. Avril M, Traore B, Costa FT, Lepolard C, Gysin J. Placenta cryosections for study of the adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A in flow conditions. *Microbes Infect* **2004**; 6:249–255.
 28. Andrews KT, Adams Y, Viebig NK, Lanzer M, Schwartz-Albiez R. Adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CHO-745 cells and inhibition of binding by protein A in the presence of human serum. *Int J Parasitol* **2005**; 35:1127–1134.
 29. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood* **1996**; 88:1525–1541.
 30. Cooke BM, Berendt AR, Craig AG, MacGregor J, Newbold CI, Nash GB. Rolling and stationary cytoadhesion of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum*: separate roles for ICAM-1, CD36 and thrombospondin. *Br J Haematol* **1994**; 87:162–170.
 31. Carlton JM, Adams JH, Silva JC, et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* **2008**; 455:757–763.
 32. del Portillo HA, Fernandez-Becerra C, Bowman S, et al. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature* **2001**; 410:839–842.
 33. Resende M, Ditlev SB, Nielsen MA, et al. Chondroitin sulphate A (CSA)-binding of single recombinant Duffy-binding-like domains is not restricted to *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 expressed by CSA-binding parasites. *Int J Parasitol* **2009**; 39:1195–1204.
 34. Fremount HN, Rossan RN. The sites of sequestration of the Uganda-Palo Alto strain of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells in the squirrel monkey, *Samimiri sciureus*. *J Parasitol* **1974**; 60:534–536.
 35. Rudolf GD, Ramsay JC. Enumeration of parasites in therapeutic malaria. *J Trop Med Hyg* **1927**; 30:1–8.
 36. Field JW, Shute PG. The microscopic diagnosis of human malaria. II. A morphological study of the erythrocytic parasites. Kuala Lumpur: Government Press, **1956**.
 37. Chen Q, Fernandez V, Sundstrom A, et al. Developmental selection of var gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **1998**; 394:392–395.
 38. Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2002**; 419:498–511.
 39. Anstey NM, Handojo T, Pain MC, et al. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J Infect Dis* **2007**; 195:589–596.
 40. Tan LK, Yacoub S, Scott S, Bhagani S, Jacobs M. Acute lung injury and other serious complications of *Plasmodium vivax* malaria. *Lancet Infect Dis* **2008**; 8:449–454.

CASE REPORT

Open Access

Gestational malaria associated to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* placental mixed-infection followed by foetal loss: a case report from an unstable transmission area in Brazil

Bruna O Carvalho^{1,2}, Joycenéa S Matsuda², Sergio LB Luz², Flor E Martinez-Espinosa^{2,3}, Juliana A Leite¹, Fernanda Franzi¹, Patrícia P Orlandi², Gustavo B Gregoracci¹, Marcus VG Lacerda^{3,4,5}, Paulo A Nogueira² and Fabio TM Costa^{1*}

Abstract

Gestational malaria is a multi-factorial syndrome leading to poor outcomes for both the mother and fetus. Although an unusual increasing in the number of hospitalizations caused by *Plasmodium vivax* has been reported in Brazil, mortality is rarely observed. This is a report of a gestational malaria case that occurred in the city of Manaus (Amazonas State, Brazil) and resulted in foetal loss. The patient presented placental mixed-infection by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* after diagnosis by nested-PCR, however microscopic analysis failed to detect *P. falciparum* in the peripheral blood. Furthermore, as the patient did not receive proper treatment for *P. falciparum* and hospitalization occurred soon after drug treatment, it seems that *P. falciparum* pathology was modulated by the concurrent presence of *P. vivax*. Collectively, this case confirms the tropism towards the placenta by both of these species of parasites, reinforces the notion that co-existence of distinct malaria parasites interferes on diseases' outcomes, and opens discussions regarding diagnostic methods, malaria treatment during pregnancy and prenatal care for women living in unstable transmission areas of malaria, such as the Brazilian Amazon.

Background

In severe cases of *Plasmodium falciparum* infection, clinical complications are associated with the sequestration of *P. falciparum*-infected erythrocytes (Pf-iE) within microvasculature and placental syncytiotrophoblasts [1-5]. Vivax malaria has long been considered a benign infection; however, the malaria pigment of this species has been detected in the placenta of *Plasmodium vivax*-infected women [6]. Further, pregnant women infected with *P. vivax* experience maternal anaemia, and some of their babies present a low birth weight [6,7], which are clinical features frequently associated with Pf-iE placental adhesion [1,2]. Despite the adverse pregnancy

outcomes associated with *P. vivax* infection [6], information concerning epidemiology and clinical consequences of vivax malaria during pregnancy is lacking.

In Brazil, where malaria incidence is almost exclusively restricted to the Amazon (99.8% of the cases), *P. vivax* was responsible for the majority (83.7%) of registered cases in 2008. *Plasmodium falciparum* infections accounted for 16.3% of cases, and *Plasmodium malariae* infection was rarely observed [8]. Additionally, chloroquine-resistant strains of *P. vivax* have emerged in the Brazilian Amazon [9].

Case presentation

A 19-year-old pregnant woman, estimated to be 35 weeks of gestation (WG), living on the boundary of the city of Manaus - Amazon State (3.09S, 59.58W), surrounded by the Amazon rainforest, was diagnosed for

* Correspondence: fabiotmc72@gmail.com

¹Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Campinas, SP, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

P. vivax infection at the nearest Health Center and showed approximately 90,000 parasites/mm³. In Brazil, the microscopic examination of Giemsa-stained thick blood smear is the official method for malaria diagnosis. This was her fourth pregnancy, and she had no medical history of previous abortion, stillbirth or pre-term delivery. The patient had three previous malaria episodes, the last occurring two years ago. Additionally, she reported a plasmodial infection during her third pregnancy. At the time, the patient was treated and no further complications were observed.

She was given a three-day regimen (25 mg/kg) of oral chloroquine, with four pills (150 mg each) administered in the first day, followed by three pills on the two subsequent days. However, after the second dose, the patient presented with vomiting, which led to cessation of the drug treatment. The patient was subsequently transferred to a tertiary-care maternity hospital in Manaus, where she was hospitalized until delivery. At the maternity hospital, the patient presented symptoms of fever, headache, jaundice, anorexia, chills and hypertension. Urine sediment analysis revealed that bilirubin and biliary pigments were three-fold above the standard levels. Furthermore, blood analysis revealed slight anaemia (Ht 29.3%, Hb 10.1 g/dL) and leukocyte count were normal (4,200 cells/mm³), with 67% lymphocytes. Serological tests for syphilis, toxoplasmosis, measles and HIV were negative.

Two days after patient admission, another thick blood smear was performed and no patent parasitaemia was observed. Ultrasound analysis showed that foetal heart rate tracings were stable and normal. While foetal centralization was not observed, the ultrasound did reveal oligohydramnios (amniotic fluid index < 5.0 cm), abnormal foetal symmetry and abnormal placental texture. Although pregnancy was estimated to be 35 WG, with a foetal weight of 2,500 g, according to the patient's last menstruation date, foetal growth was approximately 38-39 WG. Thus, the estimate of 35 WG after ultrasound analysis might represent impairment of intra-uterine growth. Two days later in a routine follow-up, an abnormal foetal heart rate was observed. Another ultrasound analysis was performed, and no foetal heartbeat was detected, and oligohydramnios was observed. Next, labour was induced by administration of oxytocin, and foetal loss of a male weighing 2,670 g was confirmed. No foetal autopsy was performed due to the lack of authorization by relatives. Macroscopic examination of the placenta revealed an abnormal dark colour; following patient consent, a sample of the placental tissue was collected for further microscopic and molecular analysis. Molecular analysis of the placenta revealed a mixed infection with *P. falciparum* and *P. vivax*. Taken together, these findings suggest placental dysfunction

most likely associated with plasmodial infection, as other common infectious diseases that cause the same phenomenon were ruled out.

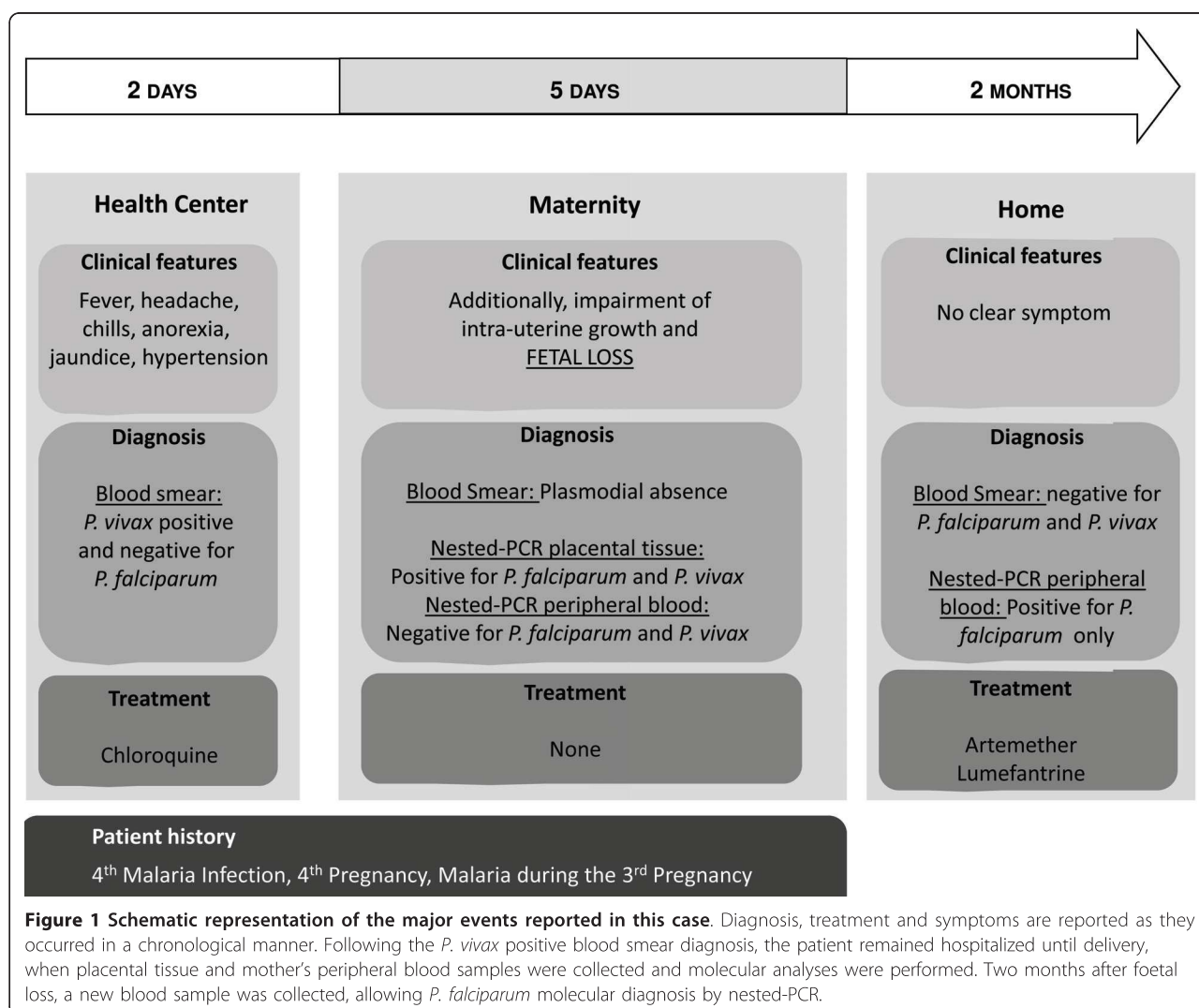
Because of the absence of parasite forms in the thick blood smear performed at the maternity, the patient did not receive any anti-malarial treatment during her stay and immediately after being released from the hospital. In the second month after foetus loss, nested-PCR analysis was conducted on the asymptomatic mother's peripheral blood and a *P. falciparum*-specific PCR product was detected, despite the maintenance of negative thick blood smears. At the time, the patient was treated with artemether/lumefantrine for three days. Figure 1 summarizes, in a chronological manner, the major events reported in this case.

Methods

Molecular analysis

A small fraction (1 × 1 × 1 cm) of maternal placenta was collected, frozen in liquid nitrogen and crushed in 2 mL of digestion buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA and 0.5% SDS) before incubation overnight at 37°C in the presence of proteinase K (0.1 mg/mL, Sigma). The DNA used for PCR amplification was purified by two phenol/chloroform extractions, followed by ethanol precipitation; DNA samples were resuspended in water. Two samples of the patient's peripheral blood were collected, the first one at few hours after the foetus loss and other approximated two months later. Genomic DNA (gDNA) was purified using the Charge Switch gDNA Blood Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. To determine and discriminate the presence of *Plasmodium* spp. gDNA in the blood sample, sensitive nested-PCR was performed using species-specific oligonucleotides based on human malaria parasite genes for the 18S small subunit ribosomal RNA (ssrRNA) as described previously [10]. Important, this set of oligonucleotides amplifies small amounts of genetic material only from viable parasites [10]. As a negative control, gDNA purified from a healthy placenta or from the peripheral blood of a non-infected individual was used. The products of these reactions were analyzed on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. To ensure nested-PCR specificity, amplification products were directly cloned into the pGEM-T cloning vector kit (Promega) and then analysed with the aid of the MegaBace 500 automatic sequencer (GE - Health care).

Nested-PCR results conducted with patient's placental tissue were also confirmed by semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR) (Additional file 1) assays as described [11]. Because of the poor conditions of the placental tissue collected histological analyses were not conducted.



Consent

Written and informed consent was sought and granted from the patient who attended the tertiary-care maternity hospital.

Results

The patient was diagnosed for *P. vivax* infection by thick blood smear performed in a Health Center during her pregnancy. To confirm this diagnosis and to investigate placental vivax infection, we conducted nested-PCR analysis of the placental tissue using species-specific oligonucleotides. As expected, specific amplification of *P. vivax* 18S ssrRNA gene was detected (Figure 2). However, a positive reaction was also observed after incubation with *P. falciparum*-specific oligonucleotides (Figure 2); thus revealing a mixed-species placental infection. Despite the positive nested-PCR result, *P. falciparum*-infected erythrocytes were not detected in peripheral blood by the thick

blood smear before delivery. Nested-PCR analysis of peripheral blood was also performed immediately after foetal loss, and neither *P. vivax*- nor *P. falciparum*-specific fragments were observed (Figure 2).

Discussion

Recent efforts by Brazilian authorities have led to a significant reduction in malaria cases (456,000 in 2007 to 314,000 in 2009) and in the Amazonian Annual Parasitological Index (API; 31.9 in 1999 to 12.8 in 2008) over the last few years [8]. Nevertheless, disease incidence in women and children less than 10 years of age increased from 2003 to 2008; disease in women increased from 34.9 to 38.6%, while the incidence in children under 10 increased from 22 to 25.2% [8]. Indeed, in Manaus, an unusual augmentation in the number of hospitalizations of *P. vivax*-infected individuals has been reported over the past years [12]. Brazilian malaria treatment policy

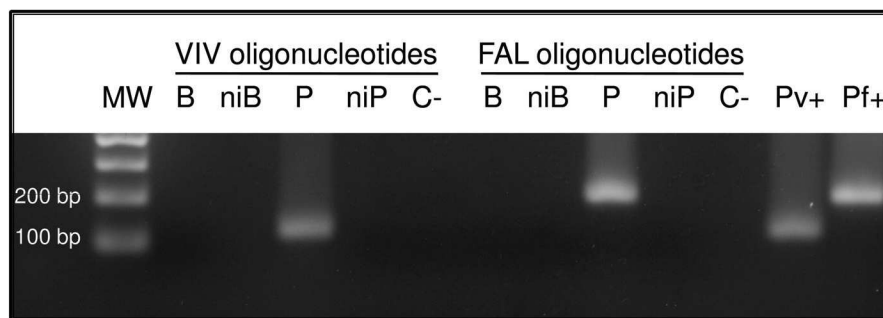


Figure 2 The presence of *P. falciparum*- and *P. vivax*-infected erythrocytes in the placenta collected after foetal loss. Agarose gel electrophoresis of nested-PCR amplified products in the presence of species-specific human malaria parasite oligonucleotides (VIV or FAL, specific for *P. vivax* or *P. falciparum*, respectively) based on the parasite small subunit ribosomal RNA (ssrRNA) gene. Both *P. vivax* and *P. falciparum* gDNA were found in the placenta; no plasmodial gDNA was detected in peripheral blood after delivery. Abbreviations are as follows: **MW**, molecular weight; **bp**, base pair; **B**, patient peripheral blood sample; **niB**, non-infected human peripheral blood; **P**, patient placenta sample; **niP**, non-infected human placenta; **C-**, negative control, absence of nuclear material; **Pv+** and **Pf+**, positive controls representing amplification product of *P. vivax* (120 bp) and *P. falciparum* (200 bp) ssrRNA gene.

restricts the use of antimalarials to confirmed parasitological cases. A combination of chloroquine and primaquine is used in uncomplicated *P. vivax* infections, while artemether-lumefantrine is the choice to treat uncomplicated *P. falciparum* infections. In severe falciparum malaria, intravenous administration of artemisinin derivatives is recommended [13].

The relationship between *P. vivax* infection and pregnancy outcomes such as stillbirth and miscarriage remains unclear in the literature. However, studies conducted in Southeastern Asia indicate a correlation between *P. vivax* infection and adverse pregnancy outcomes, eventually leading to maternal anemia and low birth weight, and with the presence of malaria pigment in the placenta [6,7]. Furthermore, it has been shown an increase in the frequency of *P. falciparum* infections in pregnant women in a cohort of 1,699 childbearing women in the Brazilian Amazon [14].

This is a case report of gestational malaria with foetal loss, in which DNA of both *P. vivax* and *P. falciparum* were amplified from infected placental tissue. In contrast, only *P. vivax*-infected erythrocytes (Pv-iE) were found in patient peripheral blood following diagnosis by Giemsa-stained thick blood smear. Although the patient's chloroquine treatment was incomplete, the utilized diagnostic method failed to detect *P. vivax* in the peripheral blood after treatment; thus showing some efficacy of the drug treatment against this species of parasite. Moreover, as the nested-PCR analysis conducted by us detects only viable parasites, we assume that both of these species of parasites were accumulated or sequestered in the placenta and played a role in pathology.

During the months that followed foetus loss, even without a clear symptom, the patient was further tested for malaria infection by thick blood smear in the health

center, and parasites were not detected in the peripheral blood. However, a molecular diagnosis by nested-PCR performed in the patient's peripheral blood collected two months after delivery detected only *P. falciparum* (Additional file 2). Although immunological analyses were not carried out, microscopically undetectable levels of peripheral parasitaemia might suggest that this woman presents an important acquired immunity against *P. falciparum*.

It is not known by which means *P. vivax* can lead to severe complications in pregnancy; even though a recent report has shown the ability of Pv-iE to cytoadhere to placental cryosections [15]. However, several reports have shown that mixed-malaria species infection attenuates the severity of *P. falciparum* pathology in Asia and in Brazil [16-18]. Moreover, it has been recently shown that in malaria mixed-species infections patients develop higher levels of fever and antisera against *P. vivax* and *P. falciparum* in comparison to patients with a single infection [19], and competition between co-infecting parasites for limited resources within a host consists in a form of selective pressure directed from one species to another [20]. Given that the patient was hospitalized soon after chloroquine administration, it is most likely that by disrupting the equilibrium between these two parasites an exacerbation of the clinical signs by the most virulent species contributed to foetal death. Nonetheless, the possibility that *P. falciparum* erythrocytic infection has occurred in the period between chloroquine treatment and delivery cannot be ruled out.

Conclusions

Collectively, this case reinforces the notion that by interfering in the homeostasis of two distinct species of *Plasmodium* parasites in mixed-infections symptoms provoked by the more virulent species can exacerbate.

Moreover, it demonstrates the necessity during pregnancy to consider asymptomatic plasmodial infections as a potential complication, and urges careful patient follow-up even when peripheral parasitaemia seems absent following drug treatment. Highly sensitive techniques are available and must be used as diagnostic tools, especially in high-risk groups such as pregnant women.

Additional material

Additional file 1: Presence confirmation of *P. falciparum*- and *P. vivax*-infected erythrocytes in the placental tissue collected after foetal loss. Agarose gel electrophoresis of semi-nested multiplex PCR (SnM-PCR) amplified products in the presence of species-specific human malaria parasite oligonucleotides specific for *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* or *P. falciparum* ssrRNA gene. Both *P. vivax* and *P. falciparum* gDNA were found in the placenta. Abbreviations are as follows: **MW**, molecular weight; **bp**, base pair; **S**, patient placental sample; **C-**, negative control, absence of nuclear material; **Po+**, **Pm+**, **Pv+** and **Pf+**, positive controls representing amplification product of *P. ovale* (436 bp), *P. malariae* (269 bp), *P. vivax* (499 bp) and *P. falciparum* (395 bp) ssrRNA gene.

Additional file 2: Molecular diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection performed two months after delivery. Agarose gel electrophoresis representing nested-PCR performed in the presence of patient's peripheral blood collected two months after delivery and species-specific human malaria parasite oligonucleotides (VIV or FAL, specific for *P. vivax* or *P. falciparum* ssrRNA gene, respectively). Only *P. falciparum* gDNA was detected in peripheral blood. Abbreviations are as follows: **MW**, molecular weight; **bp**, base pair; **B**, patient peripheral blood sample; **niB**, non-infected peripheral blood sample; **C-**, negative control, absence of nuclear material; **Pv+** and **Pf+**, positive controls representing amplification product of *P. vivax* (120 bp) and *P. falciparum* (200 bp) ssrRNA gene.

Acknowledgements and funding

Many thanks to Dr. Risoneide da Silva Henriques for giving us the placenta sample, and we are grateful to Wanessa C. Souza-Neiras for her critical comments. This work received financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). BOC and JAL were sponsored by FAPESP fellowships. FTMC is a CNPq fellow. The sponsors had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author details

¹Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Campinas, SP, Brazil. ²Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) - Manaus, AM, Brazil. ³Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM) - Manaus, AM, Brazil.

⁴Universidade do Estado do Amazonas (UEA) - Manaus, AM, Brazil. ⁵Centro Universitário Nilton Lins - Manaus, AM, Brazil.

Authors' contributions

BOC, JSM, PAN were enrolled in collecting the clinical records and in interviewing the maternity and malaria health center staff. BOC, JAL, FF, PPO, GBG and SLBL set up the placental tissue DNA extraction and fragments cloning, performed and interpreted nested-PCR and sequencing data. BOC, MVGL, FEM and PAN conceived the study, contributed in its coordination and helped to draft the manuscript. FTMC contributed to the study design and coordination, helped to interpret the data and to draft the final version of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 26 November 2010 Accepted: 27 June 2011

Published: 27 June 2011

References

1. Buffet PA, Gamain B, Scheidig C, Baruch D, Smith JD, Hernandez-Rivas R, Pouvelle B, Oishi S, Fujii N, Fusai T, Parzy D, Miller LH, Gysin J, Scherf A: *Plasmodium falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**:12743-12748.
2. Scherf A, Pouvelle B, Buffet PA, Gysin J: Molecular mechanisms of *Plasmodium falciparum* placental adhesion. *Cell Microbiol* 2001, **3**:125-131.
3. Andrews KT, Lanzer M: Maternal malaria: *Plasmodium falciparum* sequestration in the placenta. *Parasitol Res* 2002, **88**:715-723.
4. Kraemer SM, Smith JD: A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr Opin Microbiol* 2006, **9**:374-380.
5. Costa FT, Avril M, Nogueira PA, Gysin J: Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and the infected placenta: a two-way pathway. *Braz J Med Biol Res* 2006, **39**:1525-1536.
6. Nosten F, McGready R, Simpson JA, Thwai KL, Balkan S, Cho T, Hkiriaraen L, Looareesuwan S, White NJ: Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *Lancet* 1999, **354**:546-549.
7. Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM: Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* 2007, **77**(Suppl 6):79-87.
8. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislav JL, Taulil PL, Daniel-Ribeiro CT: Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 2010, **9**:115.
9. de Santana Filho FS, Arcanjo AR, Chehuan YM, Costa MR, Martinez-Espinosa FE, Vieira JL, Barbosa MG, Alecrim WD, Alecrim MG: Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:1125-1126.
10. Snounou G, Singh B: Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. *Meth Mol Med* 2002, **72**:189-203.
11. Rubio JM, Post RJ, van Leeuwen WM, Henry MC, Lindergard G, Hommel M: Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002, **96**(Suppl 1):S199-204.
12. Santos-Ciminera PD, Roberts DR, Alecrim MG, Costa MR, Quinnan GV Jr: Malaria diagnosis and hospitalization trends, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:1597-1600.
13. Ministério da Saúde - Brazil. [http://portal.saude.gov.br/portal/saude].
14. Martinez-Espinosa FE, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim WD: Malaria during pregnancy in a reference centre from the Brazilian Amazon: unexpected increase in the frequency of *Plasmodium falciparum* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004, **99**:19-21.
15. Carvalho BO, Lopes SC, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, Mamoni R, Leite JA, Rodrigues MM, Soares IS, Oliveira TR, Wunderlich G, Lacerda MV, Del Portillo HA, Araújo MO, Russell B, Suwanarusk R, Snounou G, Rênia L, Costa FT: On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis* 2010, **202**:638-647.
16. Snounou G, White NJ: The co-existence of *Plasmodium*: sidelights from falciparum and vivax malaria in Thailand. *Trends Parasitol* 2004, **20**:333-339.
17. Luxemburger C, Ricci F, Nosten F, Raimond D, Bathet S, White NJ: The epidemiology of severe malaria in an area of low transmission in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997, **91**:256-262.
18. Lorenzetti A, Fornazari PA, Bonini-Domingos AC, de Souza Rodrigues Penhalbel R, Fugikaha E, Bonini-Domingos CR, Fraga VD, Conceição LM, Rossit AR, Cavasini CE, Couto VS, Machado RL: Mixed *Plasmodium falciparum* infections and its clinical implications in four areas of the Brazilian Amazon region. *Acta Trop* 2008, **107**:8-12.
19. Chuangchaiya S, Jangpatrapongsa K, Chootong P, Sirichaisinthop J, Sattabongkot J, Pattanapanyasat K, Chotivanich K, Troye-Blomberg M, Cui L, Udomsangpetch R: Immune response to *Plasmodium vivax* has a potential to reduce malaria severity. *Clin Exp Immunol* 2010, **160**:233-239.
20. Mackinnon MJ, Read AF: Virulence in malaria: an evolutionary viewpoint. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004, **359**:965-986.

doi:10.1186/1475-2875-10-178

Cite this article as: Carvalho et al.: Gestational malaria associated to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* placental mixed-infection followed by foetal loss: a case report from an unstable transmission area in Brazil. *Malaria Journal* 2011 **10**:178.

On cytoadhesion of *Plasmodium vivax*: *raison d'être*?

Fabio TM Costa^{1/+}, Stefanie CP Lopes¹, Mireia Ferrer², Juliana A Leite¹, Lorena Martin-Jaular², Maria Bernabeu², Paulo A Nogueira³, Maria Paula G Mourão⁴, Carmen Fernandez-Becerra², Marcus VG Lacerda⁴, Hernando del Portillo^{2, 5/+}

¹Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

²Barcelona Center for International Health Research, Barcelona, Spain ³Instituto Leônidas e Maria Deane-Fiocruz, Manaus, AM, Brasil

⁴Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM, Brasil

⁵Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Barcelona, Spain

It is generally accepted that Plasmodium vivax, the most widely distributed human malaria parasite, causes mild disease and that this species does not sequester in the deep capillaries of internal organs. Recent evidence, however, has demonstrated that there is severe disease, sometimes resulting in death, exclusively associated with P. vivax and that P. vivax-infected reticulocytes are able to cytoadhere in vitro to different endothelial cells and placental cryosections. Here, we review the scarce and preliminary data on cytoadherence in P. vivax, reinforcing the importance of this phenomenon in this species and highlighting the avenues that it opens for our understanding of the pathology of this neglected human malaria parasite.

Key words: *Plasmodium vivax* - malaria - cytoadherence - severe disease

Plasmodium vivax: the last malaria parasite? - The renewed momentum for global malaria eradication has generated the need for further study of *P. vivax* (Alonso et al. 2011). In fact, the burden of *P. vivax* seems to be increasing from 70-80 million to 130-435 million clinical cases per year and threatens 2.6 billion people (Mendis et al. 2001, Hay et al. 2004, Guerra et al. 2010). Frequent relapses of infection with this species and the emergence of chloroquine resistance are two major factors likely responsible for this increasing burden of *P. vivax* malaria (Kochar et al. 2005, Baird 2007, Price et al. 2007). Notably, in South and Southeast Asia, *P. vivax* infections represent more than 50% of malaria cases, whereas in Central and South America infections by *P. vivax* can reach up to 70-90%. Thus, *P. vivax* is most prevalent malaria outside Sub-Saharan Africa.

Notably, the life cycle and biology of *P. vivax* differ from those of *Plasmodium falciparum* (Table). The following differences are worth highlighting: (i) *P. vivax* sporozoites can enter hepatocytes and remain dormant as hypnozoites, which are responsible for clinical relapses (Krotoski 1985), (ii) *P. vivax* preferentially, if not exclusively, invades reticulocytes (Kitchen 1938), and this is arguably the reason why parasitemias are low in natural *vivax* infection, (iii) gametocytes appear in the blood before clinical symptoms are manifest, which compli-

cates and compromises clinical treatment and control of the disease (Boyd & Kitchen 1937), and (iv) mosquito vectors from areas where *P. vivax* is more prevalent are outdoor-biting and anthropophilic, which makes control measures, such as impregnated bed nets, of limited value. Experts therefore agree that due to this unique biology, the present tools used to control *P. falciparum* will not suffice for *P. vivax*, which reinforces the importance of understanding the biology, epidemiology and pathology of *P. vivax* (Mueller et al. 2009).

Pathology of P. vivax - Pathogenesis in *falciparum* malaria is multi-factorial and involves numerous host and parasite factors. However, central to this pathogenesis are the phenomena of antigenic variation, rosetting and cytoadherence (Miller et al. 2002). Antigenic variation refers to the capacity of parasites to clonally express variant proteins at the surface of infected red blood cells (IRBCs) and this function to evade the host immune response and allow for the establishment of chronic infection (Brown & Brown 1965). Rosetting is the formation of rosettes resulting from the adhesion of erythrocytes infected with mature forms of the parasite to uninfected erythrocytes and this process has been shown to increase the microvascular obstruction of blood flow (David et al. 1988). Cytoadherence refers to the capacity of IRBC to adhere to host cells. This process has been described for the endothelium and for the placenta and it causes the disappearance of mature trophozoites and schizonts from the peripheral blood (Bignami & Bastianelli 1889, Miller et al. 1994). Remarkably, the original search for genes responsible for these phenomena identified a single subtelomeric multigene variant family named the *var* gene family (Baruch et al. 1995, Smith et al. 1995, Su et al. 1995). *P. falciparum* *var* genes encode proteins collectively known as PfEMP1 that contain ligand domains for different endothelial receptors, such as CD36, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and chondroitin sulphate

Financial support: FAPESP, CNPq (FTMC and MVGL), CELLEX Foundation, MICINN (CFB and HAP)

FTMC and HdP contributed equally to this work.

+ Corresponding authors: hernando.delportillo@cresib.cat; costafm@unicamp.br

Received 16 April 2011

Accepted 10 June 2011

TABLE
Main biological differences between *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*

<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>
Seventy-300 million yearly clinical cases (Mendis et al. 2001, Hay et al. 2004).	Three hundred-500 million yearly clinical cases (Guerra et al. 2007).
Usually non-lethal and non-severe; yet this situation has radically changed recently (Kochar et al. 2009).	Lethal and severe, responsible for close to one million deaths each year mostly in children under five years old.
Sporozoites can remain within hepatocytes in dormant stages known as hypnozoites (Krotoski 1985).	Sporozoites within hepatocytes undergo immediate schizogony with no dormant stages.
Hypnozoites cause clinical relapses.	There are no clinical relapses.
Invades preferentially, if not exclusively, reticulocytes (Kitchen 1938).	Invades all red blood cells.
Requires mainly (Chitnis & Sharma 2008), but not exclusively (Mercereau-Pujalon & Menard 2010), the Duffy Blood Group as the receptor for entrance into reticulocytes.	Has multiple entrance pathways and receptors (Cowman & Crabb 2006).
Surface membrane of infected reticulocytes suffers invaginations called caveola vesicles.	Surface membrane of infected red blood cells suffers protrusions called knobs.
Continuous in vitro culture not available.	Continuous in vitro culture available since 1976 (Trager & Jensen 1976).
Gametocytes appear in peripheral blood before clinical symptoms (Boyd & Kitchen 1937).	Gametocytes appear in peripheral blood after clinical symptoms.
Mosquito vectors are mostly outdoor biting.	Mosquito vectors are mostly indoor biting.
Chloroquine resistance first reported in 1989.	Chloroquine resistance first reported in late 1950s.
Complete genome sequence first reported in 2008 (Carlton et al. 2008).	Complete genome sequence first reported in 2002 (Gardner et al. 2002).

A (CSA). Furthermore, *var* gene expression is associated with various clinical syndromes of severe *falciparum* disease (Pasternak & Dzikowski 2009). In addition to *var* genes, the full genome sequence of *P. falciparum* has revealed additional subtelomeric multigene families that are likely involved in the pathology of malaria (Gardner et al. 2002). These data therefore indicate that expression of *P. falciparum* multigene families, which are clustered in subtelomeric regions, is associated with the pathology of *falciparum* malaria and the phenomena of antigenic variation, rosetting and cytoadherence.

Studies from *P. vivax* patients in Sri Lanka have shown that *P. vivax* undergoes antigenic variation and that the mature forms have the capacity for rosetting (Udagama et al. 1987, Udomsanpetch et al. 1995). Thus, using immune sera from primary-infected or multiply infected *P. vivax* patients, immunofluorescence assays from different isolates have revealed that only patients with multiple infections were able to recognise several different isolates (Udagama et al. 1987). Moreover, rosetting experiments using blood and wild isolates revealed that close to 70% of the isolates showed rosetting (Udomsanpetch et al. 1995). However, approaches similar to those used for studies of cytoadhesion in *P. falciparum* (Hasler et al. 1993) failed to observe the cytoadhesion of *P. vivax*-infected reticulocytes to human umbilical vein endothelial cells, C32 melanoma cells, platelets or to purified CD36. Notably, sequence analysis of a *P. vivax* isolate revealed the presence of a subtelomeric multigene variant super-

family termed *vir* (*P. vivax* variant genes), which is likely involved in antigenic variation in this species (del Portillo et al. 2001). Further analyses have indicated that *vir* genes could have additional functions and it was hypothesised that they mediate adhesion to facilitate the establishment of chronic infection (del Portillo et al. 2004). The complete genome sequence of the Sal I strain revealed the presence of additional subtelomeric gene families (Carlton et al. 2008), which further indicated that *P. vivax*, like *P. falciparum*, has clustered multigene families at its chromosome ends. However, the relationship between these gene families and pathology has been mostly overlooked, as *vivax* malaria had been predominantly accepted to be clinically benign and not to cytoadhere.

In the last 10 years, the severe complications observed in *P. falciparum* infection, which include renal failure, jaundice, acute respiratory distress syndrome, cerebral malaria, seizures, anemia, hyperparasitemia, thrombocytopenia, pulmonary edema, splenic rupture and death, have also been reported worldwide for *P. vivax* (Kochar et al. 2005, 2009, Baird 2007, Price et al. 2007, Alexandre et al. 2010). However, diagnosis was made in most cases using Giemsa staining, which cast reasonable doubts as to the potential for undetectable infection with *P. falciparum*. The use of nested polymerase chain reactions (PCRs) to exclude the possibility of mixed infection, however, has confirmed sole infection with *P. vivax* in some of these reports. In addition, the clinical exclusion of other syndromes, such as those caused by respiratory

pathogens, human immunodeficiency virus, histoplasma, coccidians and paracoccidians, as well as the adoption of World Health Organization criteria used for severe *falciparum* disease, are now being adopted for the reports of new cases of severe *vivax* disease. In Brazil, for instance, a recent study from the city of Manaus, Amazonas, showed an increased number of hospital admissions for *P. vivax*-infected patients (Santos-Ciminera et al. 2007) with increased clinical severity, which were mostly related to jaundice and severe anaemia after *P. falciparum* or other possible causes of disease were excluded (Alexandre et al. 2010). Similar to what has been observed in Brazil, an increasing number of cases with complications have been reported worldwide (Anstey et al. 2009). These data illustrate and confirm that there is indeed an augmentation of the number of severe cases exclusively associated with *P. vivax* infection across different endemic regions of the world. Nevertheless, whether this severity is directly associated with changes in parasite biology, increasing resistance to antimalarial drugs or with the presence of comorbidities is still a matter of debate.

Although it has long been axiomatic that *P. vivax* is less virulent than *P. falciparum* due to its lack of cytoadherence, the existence of subtelomeric variant families in the genome of *P. vivax* and the recent confirmed reports of severe *vivax* disease have led us to question the validity of this view. Moreover, in spite of studies that have documented the presence of all stages of *P. vivax* in the peripheral blood of infected patients, previous studies revealed that the presence of mature forms were disproportionately lower than young stages, indicating a segmentation of these mature forms somewhere else than in peripheral blood (Field et al. 1963).

Cytoadherence of *P. vivax*-infected reticulocytes - In an attempt to elucidate whether cytoadhesion is a *P. falciparum*-restricted phenomenon, a recent collaborative study by our groups (Carvalho et al. 2010) demonstrated that *P. vivax*-IRBC (Pv-IRBCs) obtained from Brazilian patients with non-severe disease were able to cytoadhere under static or flow conditions to brain, lung (Fig. 1), placental and endothelial receptors, which have previously been implicated in the binding of *P. falciparum* (Beeson & Brown 2002). Under static conditions, the number per mm² of adherent Pv-IRBC was 10-15-fold lower than that of *P. falciparum*-IRBC (Pf-IRBC). However, the percentage of parasites able to bind endothelial receptors under flow conditions did not differ significantly. These results differ from those previously reported in Sri Lanka (Udomsanpetch et al. 1995). One explanation for this discrepancy is that our cytoadhesion assays used percoll-enriched mature forms of the parasite at pH 6.8, whereas this other studies has used forms obtained directly from the blood at pH 7.4.

To identify potential endothelial receptors involved in *P. vivax* adherence, CHO cells expressing different endothelial receptors were used for adhesion assays. We found greater adhesion to ICAM-1-transfected cells in comparison to CD36-transfected or untransfected cells. However, we cannot rule out the role of additional host receptors in Pv-IRBC. Moreover, adhesion of parasites to endothelial cells was significantly inhibited by the addition

of soluble CSA, although treatment of the same cells with chondroitinase-ABC (CaseABC) did not affect adhesion (Carvalho et al. 2010). These results indicated that the CSA backbone was not directly involved in parasite adhesion. As CSA is highly negatively charged due to the presence of sulphate groups, the inhibition of cytoadhesion may be sustained by a charge interaction. Indeed, it has been shown that the binding of several *P. falciparum* VAR2CSA domains to CSA at various salt concentrations is not different from their binding to non-placental domains, which demonstrates that binding to CSA is highly dependent on ionic strength (Resende et al. 2009).

We hypothesised that Vir proteins, due to their variant nature, sub-cellular localisation and genome organisation, could mediate *P. vivax* cytoadherence. By using two different antibodies raised against two different Vir proteins, the specific inhibition of the IRBC-endothelial cell interaction was demonstrated (Carvalho et al. 2010). To perform functional binding assays in the absence of a continuous in vitro culture system for *P. vivax*, 3D7 *P. falciparum* transgenic lines expressing different Vir proteins, motifs, protein domains and secondary structures have been generated (M Bernabeu & C Fernandez-Becerra, unpublished observations). Notably, one of these transgenic lines that expressed Vir proteins on the surface of the IRBC mediated cytoadherence to ICAM-1, VCAM and E-selectin. Moreover, two polyclonal, mono-specific anti-Vir antibodies significantly inhibited this adhesion. Together, these data further support our findings and indicate that *P. vivax*-infected reticulocytes can cytoadhere to a variety of endothelial receptors and that this adherence is at least partially mediated specifically by Vir proteins.

Cytoadherence and severe *vivax* disease - The recent findings that infection with *P. vivax* can lead to severe complications in endemic areas worldwide (Kochar et al. 2005, Lomar et al. 2005, Tjitra et al. 2008) have led the scientific community to search for the mechanisms of pathogenesis related to this infection, which have been neglected thus far. One of the major arguments against the severity of *P. vivax* infection was based on the lack of cytoadherence and the formation of knobs by this parasite. However, robust evidence points to the existence of severe *falciparum* disease without the presence of the aforementioned mechanisms, which therefore suggests that these are not the *sine qua non* for severity (Maegraith 1948). As reviewed above, cytoadhesion was demonstrated for *P. vivax* using an in vitro approach (Carvalho et al. 2010) and unpublished data on adhesion to the placenta (FTM Costa & MVG Lacerda, unpublished observations) (Fig. 2), lungs and spleen (MVG Lacerda & H del Portillo, unpublished observations) have recently been obtained. When IRBCs are found inside of blood vessels in human tissues, there is no way to confirm that cytoadhesion has taken place, and this possibility should also be taken into account for previous studies of *P. falciparum*-infected tissues.

There is not much information available on autopsies related to *vivax* infection, which could lend support to cytoadherence during severe *vivax* disease. As reviewed elsewhere (Anstey et al. 2009), however, early XX century autopsies for which *P. vivax* diagnosis was based on

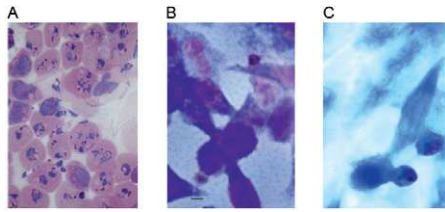


Fig. 1: adhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes maturing forms to endothelial cells. A: Giemsa staining of *P. vivax* mature forms obtained after Percoll enrichment. Representative photomicrographs of *P. vivax*-infected red blood cells adhesion to human lung; B: Saimiri brain; C: endothelial cells.

thick blood smears reported the presence of intracapillary masses of swollen, infected erythrocytes and pigment (Billings & Post 1915). In addition, these autopsies reported the frequent presence of mature malaria parasites within a red blood cell taking up the entire lumen and being in immediate contact with endothelial cells in some vessels in the brain, as well as an unusually large number of infected red cells and young plasmodia and a large amount of pigment in intestinal submucosal vessels (Bruetsch 1932). In these cases, however, comorbidities and mixed infection with *P. falciparum* were not properly discarded. More recently, one autopsy from India, which had confirmed *P. vivax* mono-infection by PCR, found congestion of alveolar capillaries by monocytic infiltrates and diffuse damage to alveolar membranes consistent with acute respiratory distress syndrome. Parasites were observed in lung tissue as well as in other organs without lesions (Valecha et al. 2009). Despite the fact that this is evidence from a single case, this resembles the findings of cytoadhesion in *P. falciparum* pulmonary disease (Corbett et al. 1989). From measurements of gas transfer and lung volume in non-severe *vivax* patients, the progressive alveolar-capillary dysfunction following treatment was found to be consistent with the greater inflammatory response induced by this parasite (Anstey et al. 2007). As a major complication of severe *vivax* disease, the pathogenesis of respiratory distress requires further investigation into the cytoadhesion that takes place, as suggested by studies of in vitro adhesion and endothelial activation of lung microvasculature. In fact, the host inflammatory response, the endothelial Weibel-Palade body release, and the plasma concentrations of angiopoietin-2, ICAM-1, E-selectin, interleukin (IL)-6 and IL-10 are greater in patients with *vivax* compared to *P. falciparum* malaria (Yeo et al. 2010). As the addition of lipopolysaccharide was found to increase the adhesion of IRBCs to human lung endothelial cells in vitro (Carvalho et al. 2010), it is possible that secondary bacterial infections may release endotoxins that could contribute to the enhanced endothelial activation and cytoadhesion. Thus, coinfections and pathogenesis during *vivax* infection require further investigation.

The role of platelets in cytoadhesion is well-documented for severe *falciparum* malaria. Here, platelets participate in strengthening the adhesion of IRBCs to

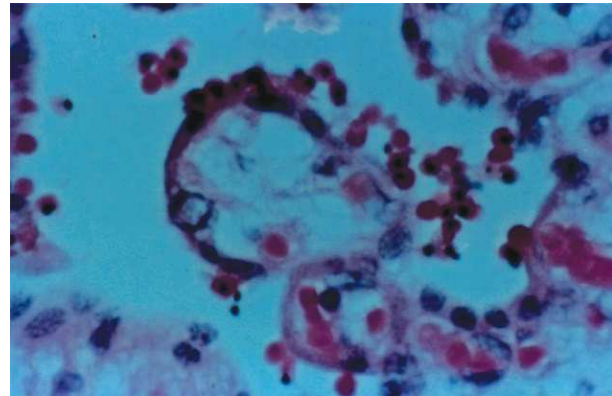


Fig. 2: presence of *Plasmodium vivax*-infected red blood cells attached to the syncytiotrophoblast of a placenta from a patient diagnosed with *P. vivax* in the 36th week of pregnancy (optical microscopy, 1,000X, Thomas' stain).

CD36 (known as glycoprotein IV in platelets), which most likely explains their accumulation in brain microvessels (Grau et al. 2003, Wassmer et al. 2004). Platelets can also participate in tumor necrosis factor (TNF)-induced microvascular pathology (Lou et al. 1997, Wassmer et al. 2006) and platelet-derived microparticles seem to play an important role in endothelial activation (Combes et al. 2006). Despite strong evidence that *vivax* disease triggers greater thrombocytopenia than does *falciparum* disease (Kochar et al. 2010), there are no data available on the ability of these particles to enhance *vivax* cytoadhesion.

As reviewed elsewhere (Clark & Alleva 2009), sequestration in the bone marrow has been shown to cause the dyserythropoiesis observed in *P. falciparum* malaria (Wickramasinghe et al. 1987). Dyserythropoiesis was demonstrated in the bone marrow during *P. vivax* infection, where cytoadhesion was not thought to play a role (Wickramasinghe et al. 1989). As a result, the idea of cytoadhesion as the cause of severe anaemia was abandoned and the presence of increased TNF levels was shown to induce dyserythropoiesis in both species (Clark & Chaudhri 1988). The presence of *P. vivax* parasites in the bone marrow prompts the need for clarification on its implications for disease pathogenesis (Lacerda et al. 2008).

Perspectives and concluding remarks - Demonstration of the cytoadherence of *P. vivax* opens new investigational lines of research. First, proteomic analysis of adhesion proteins and Vir proteins on the surface of infected reticulocytes should further the identification of new parasite ligands. In addition, microscopic analyses from autopsies where coinfections have been ruled out will reinforce the presence of parasite cytoadherence. The role of cytoadherence to the spleen, lungs and placenta in the establishment of chronic infection will further reveal the molecular basis of pathology in *P. vivax* malaria and the demonstration of cytoadhesion in other tissues, such as the kidneys and bone marrow will confirm existing observations of severe disease and the association between cytoadhesion and severe disease syn-

dromes. Furthermore, technological breakthroughs in noninvasive imaging will demonstrate whether *P. vivax*-infected reticulocytes adhere to different organs in vivo and whether this adhesion is associated with severe *vivax* malaria. Ultimately, understanding the factors that determine *P. vivax*-associated morbidity and severe disease will contribute to the control, elimination and eradication of malaria worldwide (Bassat & Alonso 2011).

REFERENCES

- Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhaes BL, Mourao MP, Lacerda MV, Alecrim MG 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* 16: 1611-1614.
- Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, Binka F, Chitnis C, Collins F, Doumbo OK, Greenwood B, Hall BF, Levine MM, Mendis K, Newman RD, Plowe CV, Rodriguez MH, Sinden R, Slutsker L, Tanner M 2011. A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med* 8: e1000406.
- Anstey NM, Handojo T, Pain MC, Kenangalem E, Tjitra E, Price RN, Maguire GP 2007. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. *J Infect Dis* 195: 589-596.
- Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN 2009. The pathophysiology of *vivax* malaria. *Trends Parasitol* 25: 220-227.
- Baird JK 2007. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol* 23: 533-539.
- Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, Taraschi TF, Howard RJ 1995. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* 82: 77-87.
- Bassat Q, Alonso PL 2011. Defying malaria: fathoming severe *Plasmodium vivax* disease. *Nat Med* 17: 48-49.
- Beeson JG, Brown GV 2002. Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation. *Cell Mol Life Sci* 59: 258-271.
- Bignami A, Bastianelli G 1889. Observations of estivo-autumnal malaria. *Riforma Medica* 6: 1334-1335.
- Billings F, Post W 1915. Fatal malaria due to the tertian parasite. *Trans Chicago Path Soc* 9: 209-215.
- Boyd MF, Kitchen SF 1937. On the infectiousness of patients infected with *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 17: 253-262.
- Brown KN, Brown IN 1965. Immunity to malaria: antigenic variation in chronic infections of *Plasmodium knowlesi*. *Nature* 208: 1286-1288.
- Bruetsch W 1932. The histopathology of therapeutic (tertian) malaria. *Am J Psychiatry* 12: 19-65.
- Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, Crabtree J, Angiuoli SV, Merino EF, Amedeo P, Cheng Q, Coulson RM, Crabb BS, Del Portillo HA, Essien K, Feldblyum TV, Fernandez-Becerra C, Gilson PR, Gueye AH, Guo X, Kang'a S, Kooij TW, Korsinczyk M, Meyer EV, Nene V, Paulsen I, White O, Ralph SA, Ren Q, Sargeant TJ, Salzberg SL, Stoeckert CJ, Sullivan SA, Yamamoto MM, Hoffman SL, Wortman JR, Gardner MJ, Galinski MR, Barnwell JW, Fraser-Liggett CM 2008. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* 455: 757-763.
- Carvalho BO, Lopes SC, Nogueira PA, Orlandi PP, Bargieri DY, Blanco YC, Mamoni R, Leite JA, Rodrigues MM, Soares IS, Oliveira TR, Wunderlich G, Lacerda MV, del Portillo HA, Araujo MO, Russell B, Suwanarusk R, Snounou G, Renia L, Costa FT 2010. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *J Infect Dis* 202: 638-647.
- Chitnis CE, Sharma A 2008. Targeting the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *Trends Parasitol* 24: 29-34.
- Clark IA, Alleve LM 2009. Is human malarial coma caused, or merely deepened, by sequestration? *Trends Parasitol* 25: 314-318.
- Clark IA, Chaudhri G 1988. Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br J Haematol* 70: 99-103.
- Combes V, Coltel N, Faille D, Wassmer SC, Grau GE 2006. Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier. *Int J Parasitol* 36: 541-546.
- Corbett CE, Duarte MI, Lancellotti CL, Silva MA, Andrade Junior HF 1989. Cytoadherence in human *falciparum* malaria as a cause of respiratory distress. *J Trop Med Hyg* 92: 112-120.
- Cowman AF, Crabb BS 2006. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 124: 755-766.
- David PH, Handunnetti SM, Leech JH, Gamage P, Mendis KN 1988. Rosetting: a new cytoadherence property of malaria-infected erythrocytes. *Am J Trop Med Hyg* 38: 289-297.
- del Portillo HA, Fernandez-Becerra C, Bowman S, Oliver K, Preuss M, Sanchez CP, Schneider NK, Villalobos JM, Rajandream MA, Harris D, Pereira da Silva LH, Barrell B, Lanzer M 2001. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. *Nature* 410: 839-842.
- del Portillo HA, Lanzer M, Rodriguez-Malaga S, Zavala F, Fernandez-Becerra C 2004. Variant genes and the spleen in *Plasmodium vivax* malaria. *Int J Parasitol* 34: 1547-1554.
- Field JW, Sandosham AA, Fong YL 1963. *The microscopical diagnosis of human malaria*, The Government Press, Kuala Lumpur, p. 20-117.
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallow SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419: 498-511.
- Grau GE, Mackenzie CD, Carr RA, Redard M, Pizzolato G, Allasia C, Cataldo C, Taylor TE, Molyneux ME 2003. Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *J Infect Dis* 187: 461-466.
- Guerra CA, Hay SI, Lucio-Parades LS, Gikandi PW, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW 2007. Assembling a global database of malaria parasite prevalence for the Malaria Atlas Project. *Malaria J* 6: 17.
- Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, Kabaria CW, Tatem AJ, Manh BH, Elyazar IR, Baird JK, Snow RW, Hay SI 2010. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e774.
- Hasler T, Albrecht GR, Van Schravendijk MR, Aguiar JC, Morehead KE, Pasloske BL, Ma C, Barnwell JW, Greenwood B, Howard RJ 1993. An improved microassay for *Plasmodium falciparum* cytoadherence using stable transformants of Chinese hamster ovary cells expressing CD36 or intercellular adhesion molecule-1. *Am J Trop Med Hyg* 48: 332-347.
- Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis* 4: 327-336.

- Kitchen SK 1938. The infection of reticulocytes by *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg* 18: 347.
- Kochar DK, Das A, Kochar A, Middha S, Acharya J, Tanwar GS, Gupta A, Pakalapati D, Garg S, Saxena V, Subudhi AK, Boopathi PA, Sirohi P, Kochar SK 2010. Thrombocytopenia in *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and mixed infection malaria: a study from Bikaner (Northwestern India). *Platelets* 21: 623-627.
- Kochar DK, Das A, Kochar SK, Saxena V, Sirohi P, Garg S, Kochar A, Khatri MP, Gupta V 2009. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *Am J Trop Med Hyg* 80: 194-198.
- Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A 2005. *Plasmodium vivax* malaria. *Emerg Infect Dis* 11: 132-134.
- Krotoski WA 1985. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 1-11.
- Lacerda MV, Hipolito JR, Passos LN 2008. Chronic *Plasmodium vivax* infection in a patient with splenomegaly and severe thrombocytopenia. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 522-523.
- Lomar AV, Vidal JE, Lomar FP, Barbas CV, Matos GJ, Boulos M 2005. Acute respiratory distress syndrome due to *vivax* malaria: case report and literature review. *Braz J Infect Dis* 9: 425-430.
- Lou J, Donati YR, Juillard P, Giroud C, Vesin C, Mili N, Grau GE 1997. Platelets play an important role in TNF-induced microvascular endothelial cell pathology. *Am J Pathol* 151: 1397-1405.
- Maegraith BG 1948. *Pathological processes in malaria and blackwater fever*, Charles C Thomas, Springfield, 430 pp.
- Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 64: 97-106.
- Mercereau-Puijalon O, Menard D 2010. *Plasmodium vivax* and the Duffy antigen: a paradigm revisited. *Transfus Clin Biol* 17: 176-183.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415: 673-679.
- Miller LH, Good MF, Milon G 1994. Malaria pathogenesis. *Science* 264: 1878-1883.
- Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, del Portillo HA 2009. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* 9: 555-566.
- Pasternak ND, Dzikowski R 2009. PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1463-1466.
- Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM 2007. *Vivax* malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg* 77: 79-87.
- Resende M, Ditlev SB, Nielsen MA, Bodevin S, Bruun S, Pinto VV, Clausen H, Turner L, Theander TG, Salanti A, Dahlback M 2009. Chondroitin sulphate A (CSA)-binding of single recombinant duffy-binding-like domains is not restricted to *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 expressed by CSA-binding parasites. *Int J Parasitol* 39: 1195-1204.
- Santos-Ciminera PD, Alecrim MG, Roberts DR, Quinnan GV Jr 2007. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in the state of Amazonas, Brazil. *Acta Trop* 102: 38-46.
- Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, Pinches R, Newbold CI, Miller LH 1995. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 82: 101-110.
- Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, Ravetch JA, Welles TE 1995. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 82: 89-100.
- Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, Lampah DA, Price RN 2008. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med* 5: e128.
- Trager W, Jensen JB 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193: 673-675.
- Udagama PV, David PH, Peiris JS, Ariyaratne YG, Perera KL, Mendis KN 1987. Demonstration of antigenic polymorphism in *Plasmodium vivax* malaria with a panel of 30 monoclonal antibodies. *Infect Immun* 55: 2604-2611.
- Udomsanpetch R, Thanikkul K, Pukrittayakamee S, White NJ 1995. Rosette formation by *Plasmodium vivax*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 635-637.
- Valecha N, Pinto RG, Turner GD, Kumar A, Rodrigues S, Dubhashi NG, Rodrigues E, Banaulikar SS, Singh R, Dash AP, Baird JK 2009. Histopathology of fatal respiratory distress caused by *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 81: 758-762.
- Wassmer SC, Lepolard C, Traore B, Pouvelle B, Gysin J, Grau GE 2004. Platelets reorient *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadhesion to activated endothelial cells. *J Infect Dis* 189: 180-189.
- Wassmer SC, Souza JB, Frere C, Candal FJ, Juhan-Vague I, Grau GE 2006. TGF-beta1 released from activated platelets can induce TNF-stimulated human brain endothelium apoptosis: a new mechanism for microvascular lesion during cerebral malaria. *J Immunol* 176: 1180-1184.
- Wickramasinghe SN, Looareesuwan S, Nagachinta B, White NJ 1989. Dyserythropoiesis and ineffective erythropoiesis in *Plasmodium vivax* malaria. *Br J Haematol* 72: 91-99.
- Wickramasinghe SN, Phillips RE, Looareesuwan S, Warrell DA, Hughes M 1987. The bone marrow in human cerebral malaria: parasite sequestration within sinusoids. *Br J Haematol* 66: 295-306.
- Yeo TW, Lampah DA, Tjitra E, Piera K, Gitawati R, Kenangalem E, Price RN, Anstey NM 2010. Greater endothelial activation, Weibel-Palade body release and host inflammatory response to *Plasmodium vivax*, compared with *Plasmodium falciparum*: a prospective study in Papua, Indonesia. *J Infect Dis* 202: 109-112.

Antigenicity and Immunogenicity of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-3

Amanda R. Bitencourt¹, Elaine C. Vicentin¹, Maria C. Jimenez¹, Ricardo Ricci¹, Juliana A. Leite², Fabio T. Costa², Luis C. Ferreira³, Bruce Russell^{4,5}, François Nosten^{6,7}, Laurent Rénia⁵, Mary R. Galinski^{8,9}, John W. Barnwell¹⁰, Mauricio M. Rodrigues¹¹, Irene S. Soares^{1*}

1 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil, **3** Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **4** Department of Microbiology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore, **5** Singapore Immunology Network, Biopolis, Agency for Science Technology and Research, Singapore, Singapore, **6** Centre for Vaccinology and Tropical Medicine, Churchill Hospital, Oxford, United Kingdom, **7** Mahidol–Oxford University Tropical Medicine Research Programme, Shoklo Malaria Research Unit, Mae Sot, Thailand, **8** Emory Vaccine Center and Yerkes National Primate Research Center, Emory University, Atlanta, Georgia, United States of America, **9** Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Emory University, Atlanta, Georgia, United States of America, **10** Malaria Branch, Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Chamblee, Georgia, United States of America, **11** CTCMOL, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil

Abstract

A recent clinical trial in African children demonstrated the potential utility of merozoite surface protein (MSP)-3 as a vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. The present study evaluated the use of *Plasmodium vivax* MSP-3 (PvMSP-3) as a target antigen in vaccine formulations against malaria caused by *P. vivax*. Recombinant proteins representing MSP-3 α and MSP-3 β of *P. vivax* were expressed as soluble histidine-tagged bacterial fusions. Antigenicity during natural infection was evaluated by detecting specific antibodies using sera from individuals living in endemic areas of Brazil. A large proportion of infected individuals presented IgG antibodies to PvMSP-3 α (68.2%) and at least 1 recombinant protein representing PvMSP-3 β (79.1%). In spite of the large responder frequency, reactivity to both antigens was significantly lower than was observed for the immunodominant epitope present on the 19-kDa C-terminal region of PvMSP-1. Immunogenicity of the recombinant proteins was studied in mice in the absence or presence of different adjuvant formulations. PvMSP-3 β , but not PvMSP-3 α , induced a TLR4-independent humoral immune response in the absence of any adjuvant formulation. The immunogenicity of the recombinant antigens were also tested in formulations containing different adjuvants (Alum, *Salmonella enterica* flagellin, CpG, Quil A, TiterMax[®] and incomplete Freund's adjuvant) and combinations of two adjuvants (Alum plus flagellin, and CpG plus flagellin). Recombinant PvMSP-3 α and PvMSP-3 β elicited higher antibody titers capable of recognizing *P. vivax*-infected erythrocytes harvested from malaria patients. Our results confirm that *P. vivax* MSP-3 antigens are immunogenic during natural infection, and the corresponding recombinant proteins may be useful in elucidating their vaccine potential.

Citation: Bitencourt AR, Vicentin EC, Jimenez MC, Ricci R, Leite JA, et al. (2013) Antigenicity and Immunogenicity of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-3. PLoS ONE 8(2): e56061. doi:10.1371/journal.pone.0056061

Editor: Luzia Helena Carvalho, Centro de Pesquisa Rene Rachou/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Minas), Brazil

Received: October 31, 2012; **Accepted:** January 4, 2013; **Published:** February 14, 2013

Copyright: © 2013 Bitencourt et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2010/09893-0) and The National Institute for Vaccine Development and Technology (CNPq - INCTV). ARB, MCJ and JAL were supported by fellowships from FAPESP. ECV, RR, FTC, LCF, MMR and ISS were supported by fellowships from CNPq. Support is also acknowledged from the US National Institutes of Health, National Institute for Allergy and Infectious Diseases to MRG (1R01AI24710), from SIgN and from the Horizontal Programme on Infectious Diseases under the Agency for Science, Technology and Research (A*STAR, Singapore). SMRU is sponsored by The Wellcome Trust of Great Britain, as part of the Oxford Tropical Medicine Research Programme of Wellcome Trust-Mahidol University. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: isoares@usp.br

Introduction

Recent studies have made important advances toward the development of a vaccine against human malaria caused by *Plasmodium falciparum*. Clinical trials performed in African endemic areas demonstrated 3 distinct antigens have a significant, albeit partial, effect in retarding clinical malaria acquisition in vaccinated children. These antigens are the circumsporozoite protein (CSP), apical membrane antigen-1 (AMA-1), and merozoite surface protein (MSP)-3 [1–3]. These results confirm the feasibility of an effective malaria vaccine.

In contrast to *P. falciparum* malaria, vaccine development against *P. vivax* malaria lags far behind. Few phase I clinical trials have been performed and phase II trials have yet to be initiated [4–6]. This is a significant hurdle for malaria eradication, as a vaccine against *P. vivax* is an essential step toward this objective [7].

To reduce the gap in the development of a vaccine against *P. vivax* malaria, we and others have worked for the past 15 years, characterizing naturally acquired immune responses to pre-erythrocytic and blood-stage recombinant antigens in individuals from endemic areas of South America [8–20]. A number of pre-clinical studies in mice and non-human primates were performed

using these recombinant antigens. These pre-clinical studies used recombinant or synthetic antigens based on the CSP, MSP-1, AMA-1, and Duffy-binding protein [21–27].

PfMSP-3.1 provided protective immunity in African children vaccinated against *P. falciparum* infection [3], providing important evidence that a comparable antigen from *P. vivax* may also be a viable candidate for the development of a vaccine against *vivax* malaria. In *P. vivax*, MSP-3 (PvMSP-3) comprises a family of proteins characterized by a putative signal peptide, a central alanine-rich domain, and the lack of a C-terminal transmembrane domain or GPI anchor motif [28–30]. PvMSP-3 α and PvMSP-3 β were initially predicted to form α -helical secondary and coiled-coil tertiary structures with heptad repeats [28,29]. We recently demonstrated that recombinant proteins based on predicted coiled-coil domains of PvMSP-3 α form oligomeric and elongated molecules [31], suggesting this protein may mediate interactions with host proteins or other merozoite surface proteins.

Based on the promising results of vaccination with *P. falciparum* MSP-3.1 (the one member of the PfMSP3 family that has a central domain of predicted coiled-coil structure [32]), this study was designed to evaluate the antigenicity of four prokaryotic recombinant proteins representing PvMSP-3 α or PvMSP-3 β of *P. vivax* in humans and mice.

Materials and Methods

Ethics Statement

Blood samples were obtained for research use with the written informed consent of all study participants enrolled in a protocol approved by the Ethics Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences of University of São Paulo, Brazil (CEP No. 22/2001), the Ethics Committee of the Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Thailand (MUTM 2010-006-01), and the University of Oxford, Centre for Clinical Vaccinology and Tropical Medicine, United Kingdom (OXTREC 027-025). This study was performed in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation (<http://www.cobea.org.br/>). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Faculty of Pharmaceutical Sciences of University of São Paulo, Brazil (CEEA No. 112/2006).

Subjects

Serum samples were collected from 220 individuals with patent *P. vivax* malaria in five different localities of the Amazon Region and described in detail elsewhere [9,11]. These samples were tested for the presence of IgG antibodies against the C-terminal region of MSP-1 (PvMSP1₁₉), apical membrane antigen-1 (AMA-1), and the Duffy binding protein (PvRIL) [11,13,16]. A second group was composed of 26 healthy adult volunteers selected from blood donors in the city of São Paulo, State of São Paulo, southeastern Brazil (control group).

Recombinant Proteins

The recombinant proteins presented in Table 1 were expressed in *Escherichia coli* as described elsewhere [21,31]. Briefly, *E. coli* BL21-DE3 (Novagen) containing the recombinant plasmids pHISa-MSP-3 α , pHISa-MSP-3 β (FP-1), pHISb-MSP-3 β (FP-2), pET14b-MSP-3 β (FP-3), and pET14b-MSP1₁₉ were cultivated in 1 L of LB-ampicillin (100 μ g/mL) at 37°C shaken culture to OD₆₀₀ 0.6–0.8. Recombinant protein expression was induced by 3 h incubation with 0.1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG, Life Technologies). The bacterial supernatant was

obtained by centrifugation at 24,000 *g* for 60 min at 4°C and recombinant proteins were purified by affinity chromatography on Ni²⁺-NTA Agarose (Qiagen) following by AKTA Prime using anionic-columns (GE Healthcare). Fractions were analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Fractions containing recombinant proteins with a high degree of purity were pooled and extensively dialyzed against PBS. The protein concentration was determined spectrophotometrically at 280 nm. All batches of recombinant proteins were tested by circular dichroism spectroscopy, as described previously [31].

Adjuvants and Mouse Immunization

Initially, 4 groups of C57BL/6 (H-2^b) and C57BL/6 TLR4 knockout (TLR4 KO, non-responsive to LPS) mice were immunized subcutaneously (s.c.) with 10 μ g of each recombinant PvMSP-3 in the absence of adjuvants. Animals of 6–8 week-old were purchased from Federal University of São Paulo, Brazil. A volume of 50 μ L was injected into each footpad. After 15 and 30 days, each animal received a booster injection of 10 μ g of the same protein injected s.c. at the base of the tail.

PvMSP-3 α and PvMSP-3 β (FP-3) were selected for immunization of BALB/c (H-2^d) mice. The animals were purchased from University of São Paulo, Brazil. The immunization schedule was the same as for C57BL/6 mice, except that the animals were immunized in the presence of 6 adjuvants. In order, the antigens included 25 μ g of Imject® Alum (Pierce), 2.5 μ g of FlC flagellin of *Salmonella enterica* Typhimurium, 10 μ g of CpG-ODN 1826 (TCCATGACGTTCTGACGTT) (Prodimol Biotecnologia), 25 μ g of Quil A (Superfos Biosector), or an equal volume of TiterMax Gold (Sigma) or Incomplete Freund's Adjuvant (IFA). PvMSP-3 β (FP-3) was also co-administered in CPG ODN 1826 plus Alum or FlC. These adjuvants were administered at the doses used for immunization with single adjuvants. Controls received only PBS emulsified in adjuvant. Serum samples were collected for analysis 14 days after each dose and stored at -20°C.

Immunological Assays

ELISA detection of human IgG antibodies. Human IgG antibodies against PvMSP-3 α , PvMSP-3 β (FP-1, FP-2, and FP-3), and PvMSP1₁₉ of *P. vivax* were detected by ELISA [11]. ELISA plates were coated with 200 ng/well of each recombinant protein. Fifty microliters of each solution were added to each well of a 96-well plate (High binding, Costar). After overnight incubation at room temperature (r.t.), the plates were washed with PBS-Tween (0.05%, v/v) and blocked with PBS-milk (PBS, pH 7.4, containing 5% nonfat dry milk) for 2 h at 37°C. Serum samples were diluted 1:100 in the same solution and 50 μ L of each sample was added to duplicate wells. After incubation for 2 h at r.t. and washes with PBS-Tween, 50 μ L of a solution containing peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Fc-specific) diluted 1:5,000 (Sigma) was added to each well. The enzymatic reaction was developed by the addition of 1 mg/mL *o*-p-phenylenediamine (Sigma) diluted in phosphate-citrate buffer, pH 5.0, containing 0.03% (v/v) hydrogen peroxide, and stopped by the addition of 50 μ L of 4 N H₂SO₄. Plates were read at 492 nm (OD₄₉₂) with an ELISA reader (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA). Cutoff points were set at 3 standard deviations above the mean OD₄₉₂ of sera from 26 individuals, unexposed to malaria, from the city of São Paulo. The results are expressed as index of reactivity (IR).

ELISA detection of mouse antibodies. Antibodies to PvMSP-3 in mouse sera were detected by ELISA on days 14, 29, and 44 as described previously [33]. ELISA plates (High binding, Costar) were coated with 200 ng/well of the homologous recombinant protein. Each solution (50 μ L) was added to each

Table 1. Recombinant proteins used in the immunological studies.

Protein	Fragment Name	Sequence	Expression vector	Apparent molecular weights
PvMSP-3 α	FP-1	359–798	pHISa	87 kDa
PvMSP-3 β	FP-1	35–375	pHISa	60 kDa
PvMSP-3 β	FP-2	385–654	pHISb	57 kDa
PvMSP-3 β	FP-3	35–654	pET14b	104 kDa
PvMSP-1	MSP1 ₁₉	1616–1704	pET14b	18 kDa

FP = Fusion Protein with His-tag.

doi:10.1371/journal.pone.0056061.t001

well of a 96-well plate. After overnight incubation at r.t., the plates were washed with PBS-Tween and blocked with PBS-milk-BSA (PBS, pH 7.4, containing 5% nonfat dry milk, 2.5% BSA) for 2 h at 37°C. Mouse sera were tested in serial dilutions starting at 1:100; a final volume of 50 μ L of sample was added to duplicate wells, following incubation for 1 h at r.t. After washes with PBS-Tween, 50 μ L of a solution containing secondary antibody conjugated to peroxidase (goat anti-mouse IgG, KPL) diluted 1:3,000 was added. The enzymatic reaction was developed as described for ELISA detection of human IgG antibodies. Detection of IgG subclass responses was performed as described above, except the secondary antibody was specific to mouse IgG1, IgG2a, IgG2b or IgG3 (Southern Technologies) diluted 1:8,000. The specific anti-PvMSP-3 titers were determined as the highest dilution yielding an OD₄₉₂ greater than 0.1. The results are expressed as means of IgG titers (Log_{10}) $\pm$ SEM.

***P. vivax* slide preparation and immunofluorescence assays.** The thin smears used for the IFA were prepared from *ex vivo* matured and 45% percoll concentrated schizonts [34] that were diluted 1:4 with uninfected RBCs to provide enough volume to make a number of duplicate slides. Clinical isolates of *P. vivax*-infected blood from malaria patients were collected at Shoklo Malaria Research Unit (Thailand) with written informed consent. Pooled sera from mice immunized 3 times with the recombinant PvMSP-3 α and PvMSP-3 β (FP-3) proteins emulsified in Freund's Adjuvant (1:100) were applied to the smear and incubated for 1 h before incubation with secondary anti-mouse IgG antibody conjugated to Alexa Fluor 568 (Invitrogen) or DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen). The presence of native PvMSP-3 was visualized using a Nikon TS100 epifluorescence microscope.

Statistical Analysis

Differences between the proportions of responder individuals were analyzed by the Chi-square test. Comparison of antibody level (IR) in independent samples was performed by One-way analysis of variance (ANOVA) and correlations were determined by the nonparametric Spearman correlation coefficient. One-way ANOVA was used to compare normally distributed log-transformed means for the different animal groups. Multiple comparisons were assessed by Tukey's Test, with a P-value of <0.05 considered significant.

Results

Antigenicity of Recombinant PvMSP-3 α or PvMSP-3 β Proteins

Initially, we compared the IgG antibody response of individuals during patent infection to the recombinant PvMSP-3 α and PvMSP-3 β (FP-1, FP-2, and FP-3) Proteins. Details of each

recombinant protein can be found in our previously published studies on the biochemistry of these proteins [31]. The frequency of responders to MSP-3 α and at least one recombinant protein representing PvMSP-3 β was 68.2% and 79.1%, respectively, indicating both proteins are immunogenic during infection with *P. vivax*. The frequency of individuals presenting IgG antibodies to each recombinant PvMSP-3 β was 26.3% (FP-1), 64.5% (FP-2), and 65.9% (FP-3). The prevalence of antibodies against FP-1 was significantly lower than the prevalence of antibodies against FP-2 and FP-3 of PvMSP-3 β (Chi-square test, $p < 0.001$). Reactivity to FP-2 and FP-3 of PvMSP-3 β did not statistically differ ($p > 0.05$). We also compared the reactivity of each PvMSP-3 recombinant protein with an immunodominant epitope of *P. vivax*, contained within the PvMSP1₁₉ protein [9,11]. The responder frequency and reactivity index in malaria-infected individuals with PvMSP1₁₉ were significantly higher when compared to the other recombinant proteins ($p < 0.001$, Figure 1A and B, respectively).

After repeated exposure, differences in reactivity between PvMSP1₁₉ and the recombinant PvMSP-3 proteins were maintained ($p < 0.0001$ to PvMSP-3 α and PvMSP-3 β FP-1, $p < 0.01$ to PvMSP-3 β FP-2, and $p < 0.001$ to PvMSP-3 β FP-3, Figure 1C). The proportions of responders to FP-2 and FP-3 increased significantly after repeated *P. vivax* infection reaching more than 80% in multiply infected individuals, indicating most individuals may become responders based on their degree of exposure. Such a pattern was not observed in response to FP-1 (Figure 1C).

We also evaluated the correlation between antibody reactivities to paired recombinant proteins during patent infection. In all cases, significant correlations were observed. For example, there was a relatively high correlation between PvMSP-3 α and PvMSP-3 β FP-2 ($r = 0.56$, $p < 0.0001$; Figure 2B), or PvMSP-3 β FP-2 and PvMSP-3 β FP-3 ($r = 0.59$, $p < 0.0001$; Figure 2F), and a moderate correlation between PvMSP-3 α and PvMSP-3 β FP-3 ($r = 0.41$, $p < 0.0001$; Figure 2C) or PvMSP-3 β FP-1 and PvMSP-3 β FP-2 ($r = 0.33$, $p < 0.0001$; Figure 2D), or PvMSP-3 β FP-1 and FP-3 ($r = 0.42$, $p < 0.0001$; Figure 2E). Overall, the correlations between the antibody reactivities to PvMSP1₁₉ and the other recombinant proteins (Figures 2G, 2H, 2I, and 2J) were weak.

Immunogenicity of Recombinant PvMSP-3 α and PvMSP-3 β Proteins in Mice

The immunogenicity of recombinant proteins representing PvMSP-3 α and PvMSP-3 β was evaluated after immunization of C57BL/6 wild type (WT) mice. Animals immunized with PvMSP-3 α failed to respond even after three immunizing doses (Figure 3A). In contrast, we detected specific antibodies in mice immunized 2 or 3 times with any of the PvMSP-3 β proteins (Figures 3B, 3C, 3D). The antibody titers to PvMSP-3 β FP-2 were higher than the titers to PvMSP-3 β FP-1 or FP3 ($p < 0.01$). In addition, the titers to

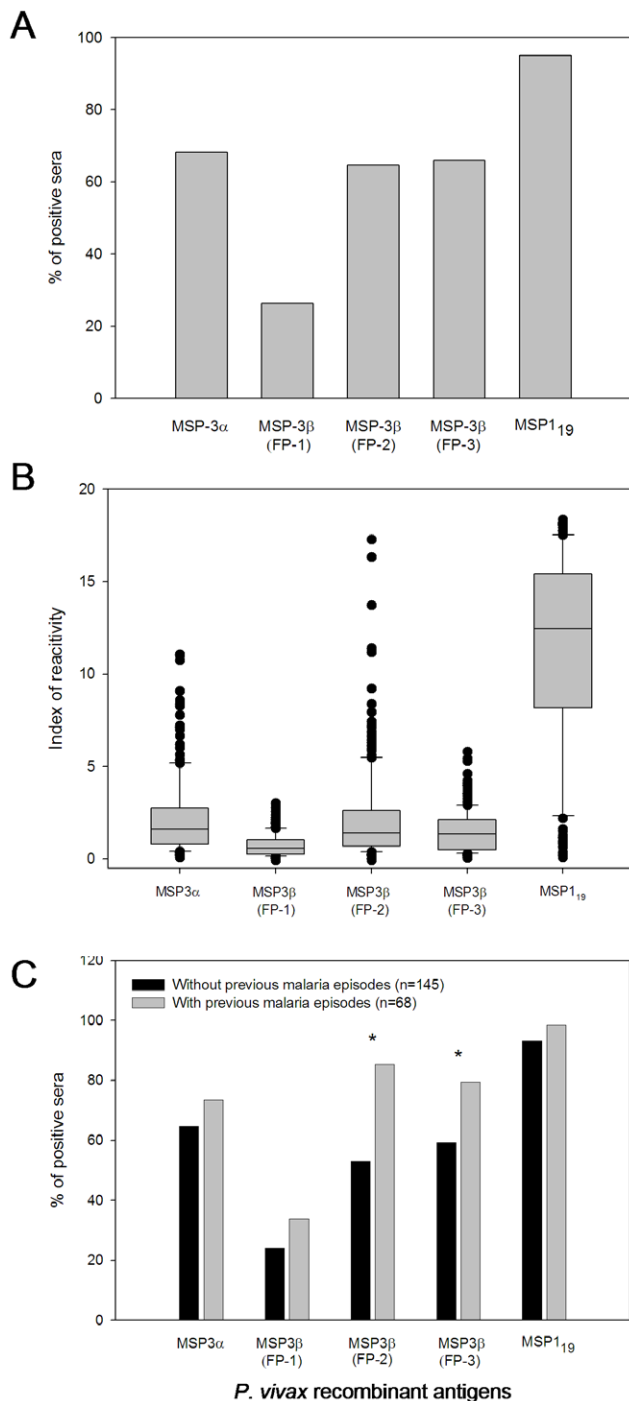


Figure 1. Human antibody response to recombinant PvMSP-3 α , PvMSP-3 β , and PvMSP1₁₉ proteins during patent *P. vivax* infection. **A** The bars express the percent response for each of the analyzed proteins. Sera from 220 individuals were analyzed for the presence of specific IgG antibodies by ELISA and tested at a 1:100 dilution in duplicate. The cutoff proteins obtained from the PvMSP-3 α , PvMSP-3 β (FP-1), PvMSP-3 β (FP-2), PvMSP-3 β (FP-3), and PvMSP1₁₉ were 0.179, 0.715, 0.195, 0.396, and 0.185, respectively. **B** Comparison of individual IR IgG antibodies to MSPs in sera of individuals infected by *P. vivax*. The line indicates the limit of positivity (IR=1). IR: Index of reactivity (mean absorbance of test serum/cutoff). **C** Comparative analysis of the IgG antibody response against MSP proteins and the frequency of previous episodes of *vivax* malaria. We analyzed 213 serum samples from individuals who reported the number of previous episodes of malaria for the presence of specific IgG antibodies by

ELISA. All sera were tested in duplicate at 1:100 dilution. *: the percentage of responders with statistically significant correlation to the frequency of previous malaria episodes. doi:10.1371/journal.pone.0056061.g001

PvMSP-3 β FP-1 were higher than the titers to FP-3 ($p < 0.01$, Figures 3B, 3C, and 3D).

Because bacterial recombinant proteins are often contaminated with LPS, we also compared the WT response to that of LPS-unresponsive TLR4 KO mice.

Similar titers were detected in WT and TLR4 KO mice following immunization with PvMSP-3 β FP-1 and FP-3 (Figures 3B and 3D). In the case of PvMSP-3 β FP-2, the titers of WT mice were significantly higher than in the TLR4 KO mice ($p < 0.05$), suggesting a possible effect of LPS contamination in the protein preparation (Figure 3C). Nevertheless, specific antibodies are still observed after PvMSP-3 β FP-2 immunization.

Adjuvant and Antibody Responses after Immunization with PvMSP-3 α and PvMSP-3 β (FP-3)

High antibody titers are desirable for vaccine efficacy. Toward that goal, we attempted to identify adjuvants that could significantly improve specific antibody responses. Our main goal was to obtain, if possible, titers similar to those elicited by immunization in the presence of Freund's adjuvant. To test different adjuvant formulations, we selected 2 recombinant proteins, PvMSP-3 α and full-length PvMSP-3 β (FP-3). We used adjuvant formulations containing Alum, Quil A, TiterMax, IFA, and the TLR-5 or -9 agonists (FliC or CPG ODN 1826, respectively). Both recombinant proteins were highly immunogenic in BALB/c mice when administered in the presence of adjuvant (Figures 4 and 5). At the end of the immunization schedule, mice immunized with PvMSP-3 α in Quil A, TiterMax, or IFA had significantly higher antibody titers than mice immunized with other adjuvant formulations (Figure 4C, $p < 0.001$ in all cases). No statistically significant differences in antibody titers were detected in mice immunized with PvMSP-3 α in Quil A, TiterMax, or IFA ($p > 0.05$). However, mice immunized with PvMSP-3 α formulated in CPG-ODN 1826 also had high antibody titers in comparison to FliC ($p < 0.05$) or Alum ($p < 0.001$). The mean antibody titers obtained with FliC and Alum did not significantly differ ($p > 0.05$). Control mice immunized with adjuvants only did not present specific antibodies to PvMSP-3 α throughout the experiment. The only exception was FliC-immunized mice, which had a low antibody immune response to PvMSP-3 β (Figure 5). In this experiment, we observed that after the third dose, animals immunized with PvMSP-3 β in CPG ODN 1826, Quil A, or TiterMax presented antibody titers similar to those of mice immunized with antigen in IFA ($P > 0.05$) (Figure 5C). However, when administered with Alum or FliC antibody, titers to PvMSP-3 β were significantly lower ($p < 0.001$). FliC proved to be the most efficient adjuvant, generating antibody titers significantly higher than Alum ($p < 0.05$). Interestingly, when CPG ODN 1826 was administered with Alum or FliC, it improved their activity, producing antibody titers as high as the IFA-immunized group (Figure 5C).

The Th bias of the immune response was analyzed by determination of IgG subclasses in immunized by BALB/c mice. As shown in Figure 6, high levels of IgG1 were observed in mice immunized with Alum, in comparison to other groups, indicating Th2 polarization (IgG1/IgG2a ratio: 1:12). However, co-administration of Alum with CPG ODN 1826 greatly reduced the IgG1/IgG2a ratio in comparison to the adjuvant alone (Alum plus CPG ODN 1826:1:12 vs. 0.36, $p < 0.05$). Although co-administration of Alum plus FliC also modulated the Th1/Th2 response in

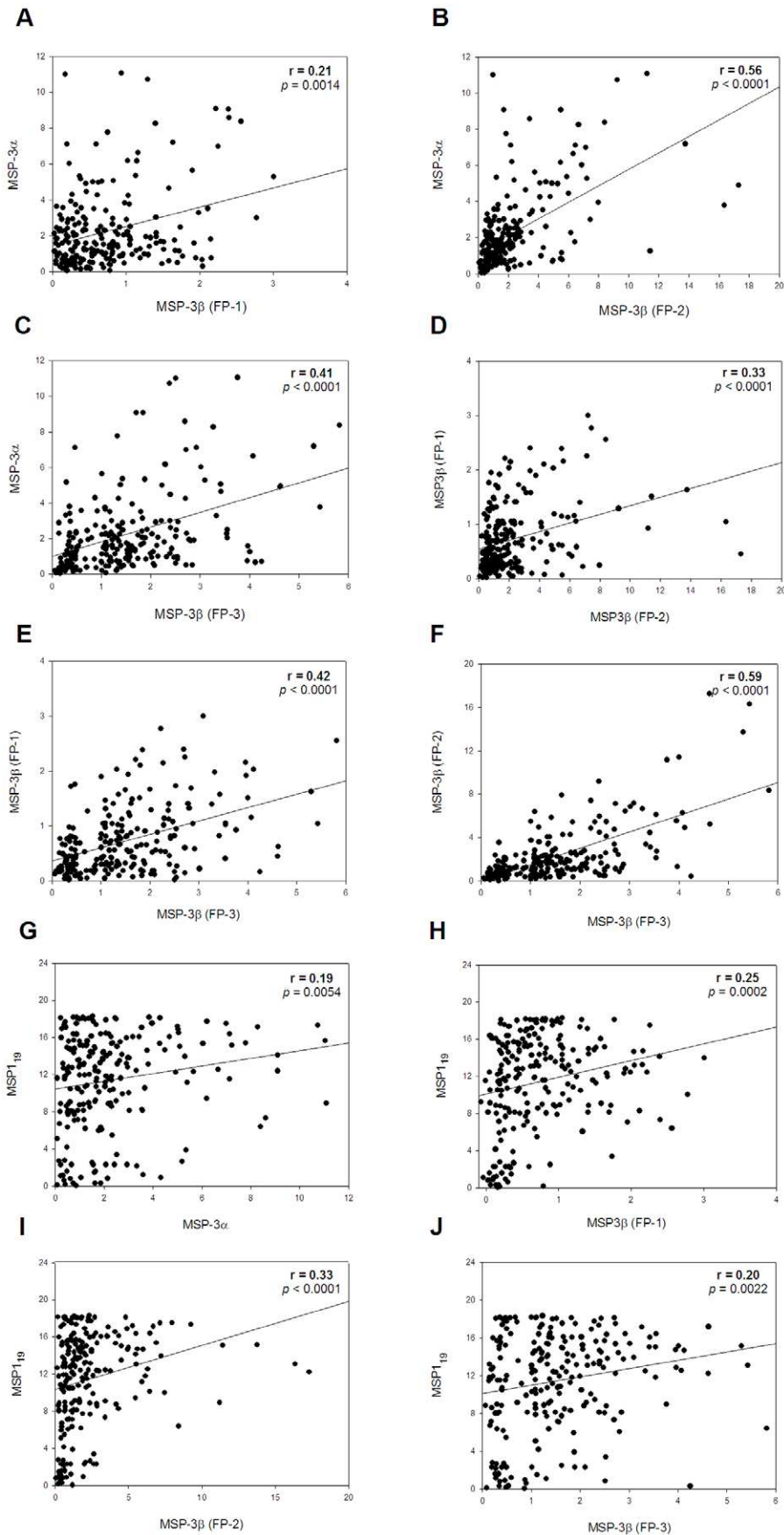


Figure 2. Reactivity against recombinant PvMSP-3 and PvMSP1₁₉ proteins in 220 sera from individuals with patent *P. vivax* malaria infection. Each panel represents the reactivity index of serum samples against the indicated recombinant proteins. The serum samples were tested at a 1:100 dilution, as described in Figure 1B. Symbols represent the IR IgG antibodies against recombinant MSP proteins in the sera of *P. vivax*-infected individuals. The values of the Spearman correlation coefficient (r) and p values are shown in each panel.
doi:10.1371/journal.pone.0056061.g002

comparison to FliC alone, this difference was not statistically significant (IgG1/IgG2a ratio: 22 vs. 1.63, $p > 0.05$). A more balanced Th1/Th2 response was observed in mice immunized with PvMSP-3 β in FliC, CPG-ODN 1826, Quil A, TiterMax, and IFA (IgG1/IgG2a ratio between 0.35 and 28).

In addition to IgG1 and IgG2a, in many cases, we have also detected the presence of IgG2b and IgG3. The results are summarized on Figure S1.

Recognition of Native Protein in *P. Vivax* Parasites

Pooled sera from mice immunized three times with PvMSP-3 α and PvMSP-3 β in Freund's Adjuvant were tested for their ability to recognize native protein expressed by *P. vivax* merozoites. Both sera reacted with native protein exposed on the surface of *P. vivax* parasites isolated from an infected individual, but not with control sera. The IFA patterns obtained with these sera are shown in Figure 7, where the schizonts appeared as a "bunch of grapes"

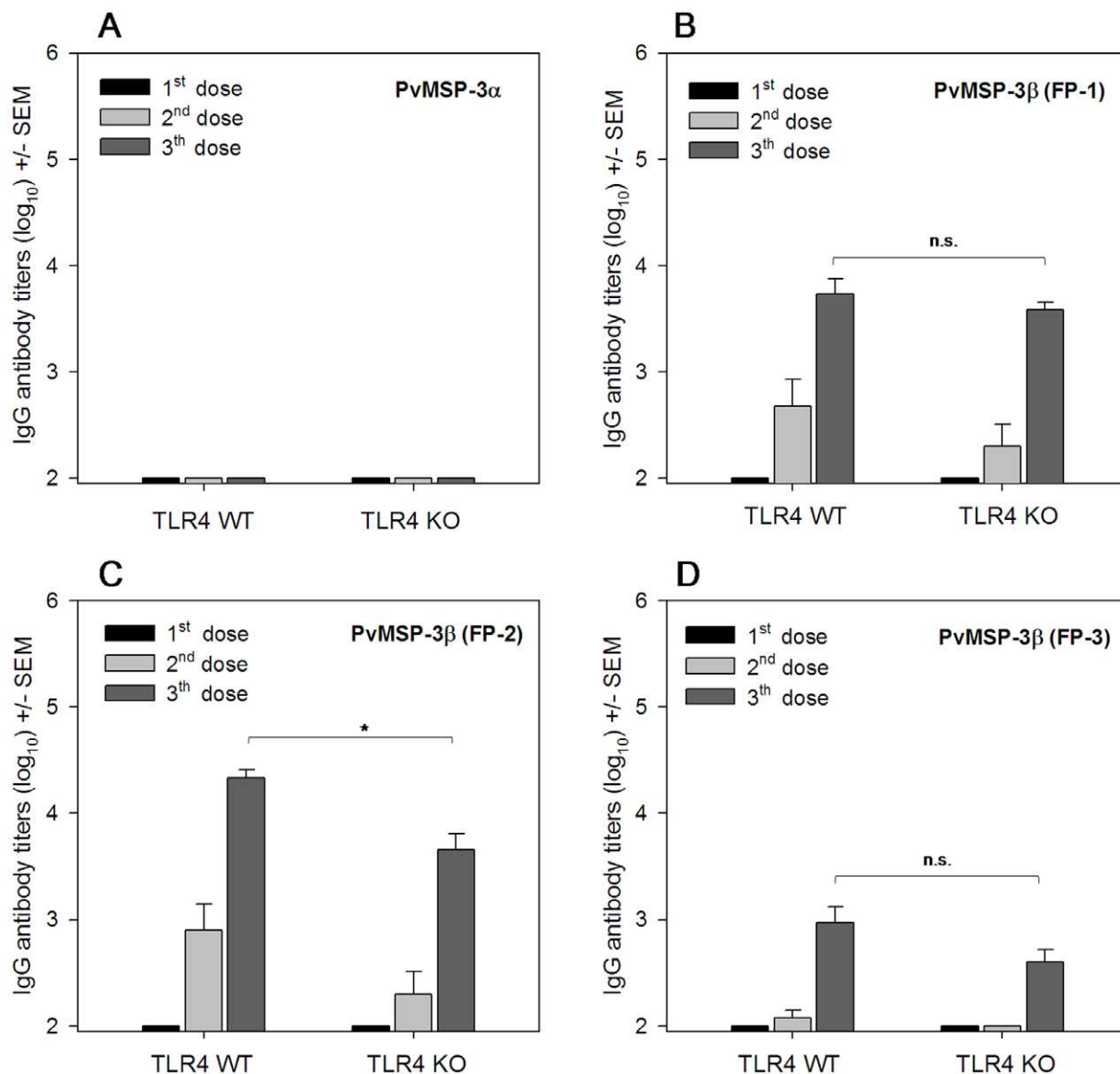


Figure 3. IgG antibody response in C57BL/6 wild-type (WT) and TLR4 KO mice after immunization with MSP-3 in the absence of adjuvant. Groups of 5 mice were immunized 3 times (s.c.) with 10 μ g of PvMSP-3 α , PvMSP-3 β (FP-1), PvMSP-3 β (FP-2), or PvMSP-3 β (FP-3) and antibody titers to homologous PvMSP-3 were determined after each dose. Results are expressed as the means of antibody titers ($\log_{10}$) $\pm$ SEM and were compared by one-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons. After the third dose, non-significant differences between groups of immunized mice (C57BL/6 WT vs. TLR4 KO) are denoted on the graph as "n.s." Significant difference between 2 groups of mice immunized with 3 doses of PvMSP-3 β (FP-2) are denoted on the graph (* $p < 0.05$).
doi:10.1371/journal.pone.0056061.g003

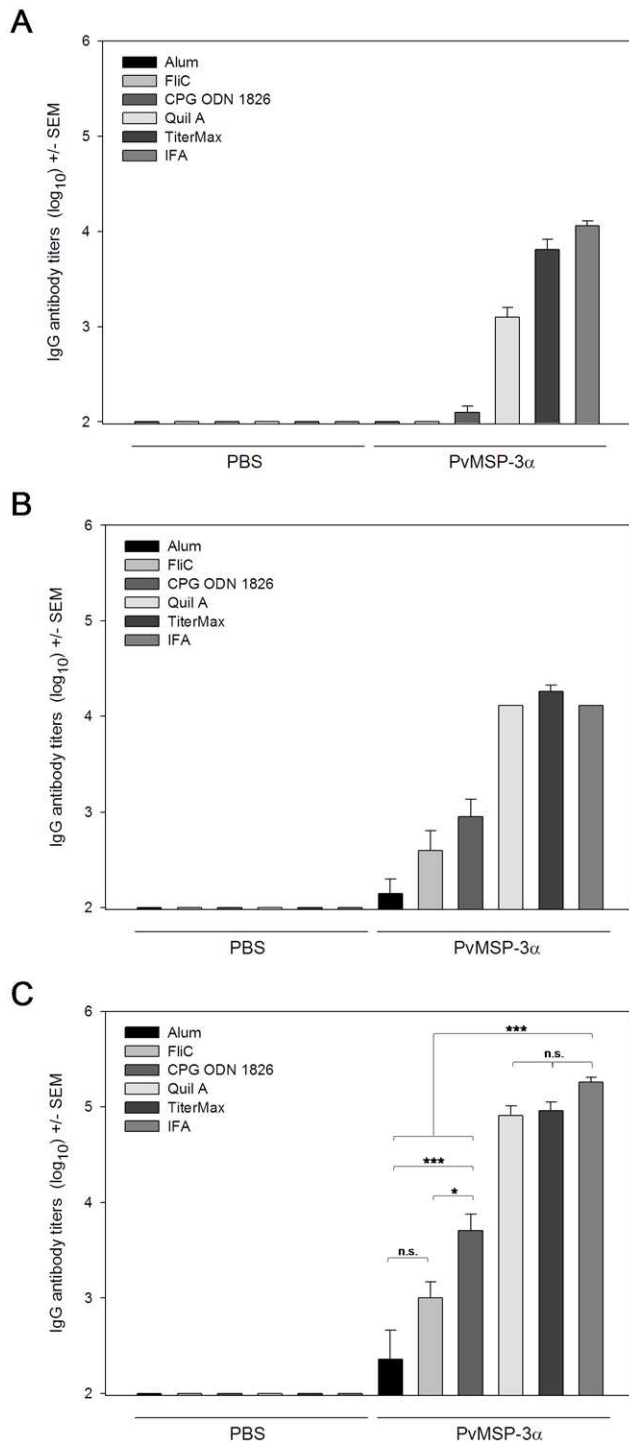


Figure 4. IgG anti-PvMSP-3 α in mice immunized with various adjuvant formulations. Groups of 6 female BALB/c mice were immunized 3 times (s.c.) with 10 μ g of protein in the following adjuvant formulations: Alum, FliC, CpG ODN 1826, Quil A, TiterMax, or IFA. Anti-PvMSP-3 α in the sera of immunized mice was analyzed by ELISA 2 weeks after the first (A), second (B), and third (C) immunizing dose. Results are expressed as mean IgG antibody titers ($\log_{10}$) $\pm$ SEM and were compared by one-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons. Significant differences are noted on the graph: * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001. Non-significant (n.s.) differences are indicated (p >0.05). Data representative of 2 independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0056061.g004

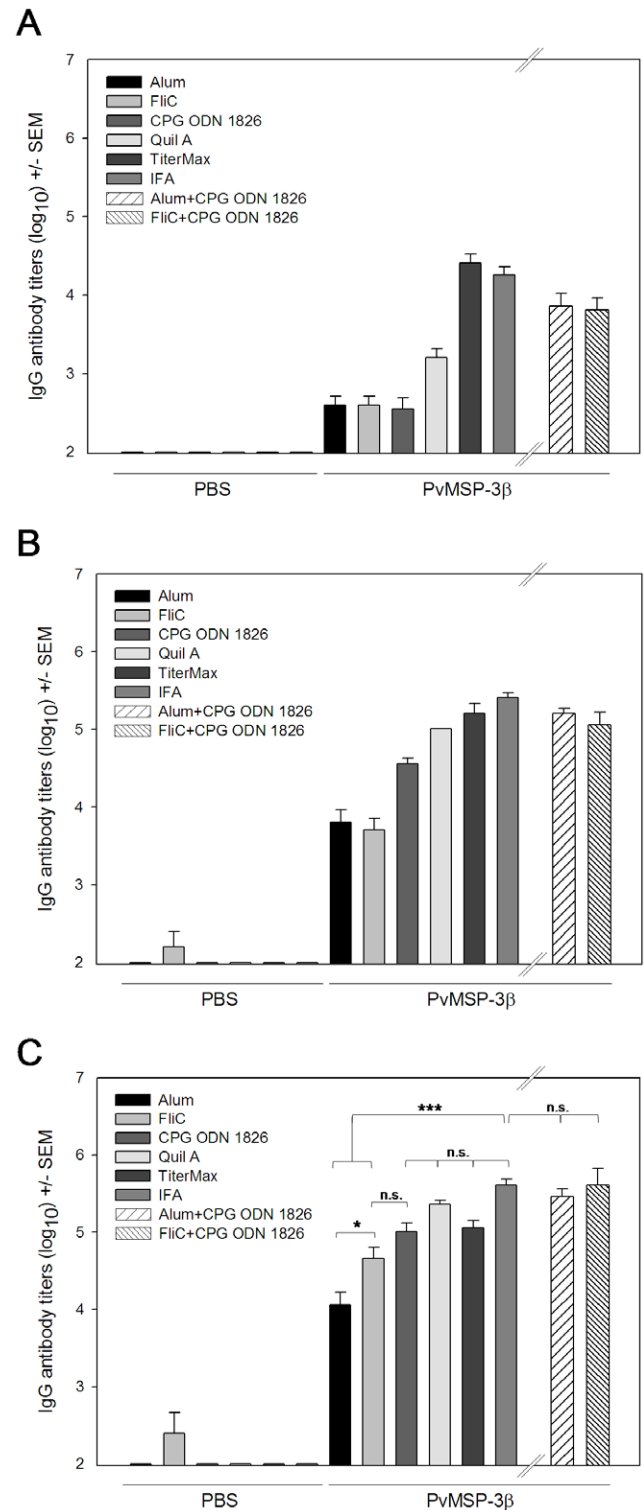


Figure 5. IgG anti-PvMSP-3 β and IgG subclass profiles in mice immunized in the presence of adjuvant. Groups of 6 females BALB/c were immunized 3 times (s.c.) with 10 μ g of protein in the presence of the following adjuvant formulations: Alum, FliC, CpG ODN 1826, Quil A, TiterMax, or IFA. The adjuvants Alum, FliC, and CpG ODN 1826 were also tested in combination (Alum plus CpG ODN 1826 and FliC+CpG ODN 1826). Anti-PvMSP-3 β in the sera of immunized mice was analyzed by ELISA 2 weeks after the first (A), second (B), and third (C) doses. Results are expressed as mean IgG antibody titers ($\log_{10}$) $\pm$ SEM and were compared by one-way ANOVA followed by Tukey's test for

multiple comparisons. Significant differences are noted on the graph: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Non-significant (n.s.) differences are indicated ($p > 0.05$). Data representative of 2 independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0056061.g005

when stained [28]. It is important to note that some schizonts stain, but others do not. This fact could be explained by the presence in infected of patients of multiple clones of *P. vivax* parasites expressing multiple alleles of PvMSP-3 α and PvMSP-3 β .

Discussion

We evaluated the immunogenic properties of four recombinant proteins representing MSP-3 α and MSP-3 β of *P. vivax*; one representing the C-terminal region of PvMSP-3 α and three representing different regions of PvMSP-3 β . Initially, these recombinant proteins were compared for their ability to bind IgG antibodies in the serum of individuals exposed to *P. vivax* malaria. We demonstrated that the frequencies of individuals with IgG antibodies to PvMSP-3 α and at least one of the three recombinant proteins representing PvMSP-3 β were relatively high (68.2% and 79.1%, respectively). For PvMSP-3 α , these findings confirm two recent studies performed in distinct endemic areas of the Brazilian Amazon, where 78% [19] and 58.4% [20] of individuals presented IgG antibodies to this protein.

Previous studies evaluated the polymorphism in the C-terminal region of PvMSP-3 α and found the region is highly conserved among natural isolates [35]. This fact may account for the recognition by IgG antibodies from a relatively high percentage of individuals. In contrast to the C-terminal region of PvMSP-3 α , a variable degree of polymorphism has been reported for the gene encoding PvMSP-3 β [36]. Despite the reported sequence diversity of PvMSP-3 β , we found a significant percentage of individuals

recognized PvMSP-3 β recombinant proteins FP-2 and FP-3 (>60.0%). Nevertheless, we detected a lower frequency (26.3%) of responders to PvMSP-3 β recombinant protein FP-1, suggesting most of the antibody responses were directed to the second moiety of the protein. The PvMSP-3 α and PvMSP-3 β polymorphic frequency in the studied areas is unknown. A recent study used PCR-RFLP to characterize the diversity of MSP-3 α in 60 *P. vivax* isolates from four geographic regions of the Brazilian Amazon. The results revealed a high diversity where three different fragment sizes were found [37].

The cause for differential recognition by human antibodies of the N- and C-terminal regions of PvMSP-3 β (FP-2 and FP-3) does not seem to be related to the absence of proper folding. In a previous study involving circular dichroism experiments, we demonstrated FP-1 was better structured than FP-2, which was highly recognized by IgG antibodies [31].

The comparison of human antibody reactivities to different antigens revealed major correlations. Significant correlations were observed between FP-2 and FP-3 of PvMSP-3 β , possibly because they share a number of common B and T cell epitopes. However, the lack of correlation in most cases reflects differential genetic control by human HLA molecules. This hypothesis is being tested.

To investigate the immunogenic properties of PvMSP-3 α and PvMSP-3 β as vaccine candidates, we tested their immunogenicity in the presence or absence of different adjuvant systems in pre-clinical vaccinations of mice. In the absence of adjuvant, some of PvMSP-3 β recombinant proteins elicited a specific TLR4-independent antibody response. This observation may explain how these molecules are immunogenic during natural human infection. In contrast, PvMSP-3 α did not induce antibody immune responses, indicating the presence of other molecules in the parasite providing the adjuvant signal.

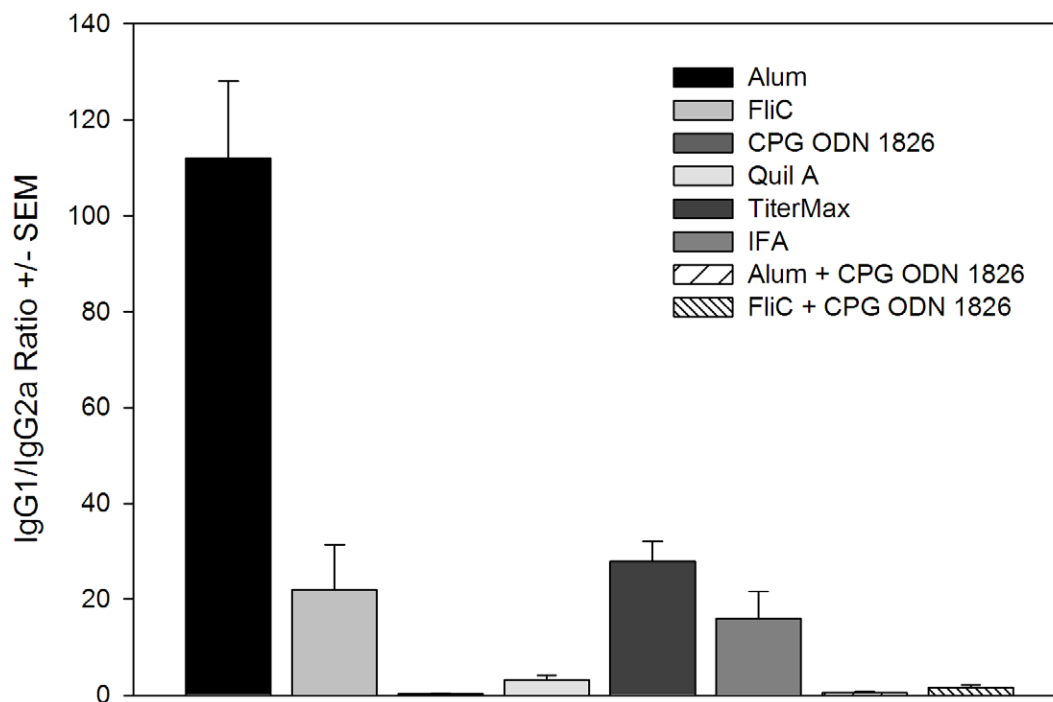


Figure 6. Serum IgG isotype responses in mice after immunization with PvMSP-3 β in the presence of adjuvant. BALB/c mice were immunized with recombinant PvMSP-3 β in the presence of adjuvant as described in Figure 5. PvMSP-3 β -specific IgG1 and IgG2a antibody titers in the sera of immunized mice were analyzed by ELISA 2 weeks after the third dose. Results are the means of IgG1/IgG2a $\pm$ SEM for 6 mice per group. All groups were compared by one-way ANOVA and Tukey's test for multiple comparisons. doi:10.1371/journal.pone.0056061.g006

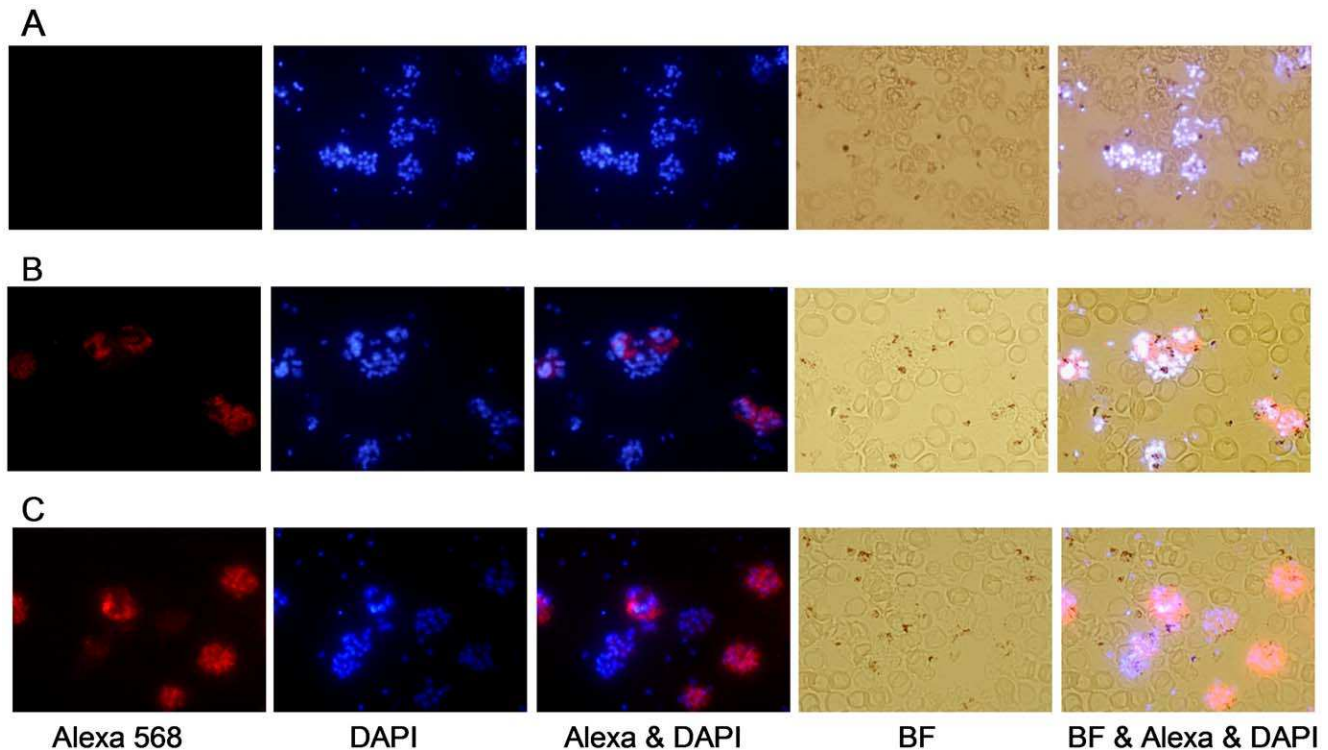


Figure 7. Immunofluorescence of *P. vivax* parasites and anti-MSP-3 antibodies. Immunofluorescence patterns in the sera of mice immunized with recombinant PvMSP-3 α and PvMSP-3 β (FP-3) on acetone-fixed *P. vivax*-infected erythrocytes (Pv-iE). The smears were incubated with pooled antisera (1:100) from mice immunized with: (A) PBS emulsified in adjuvant, (B) PvMSP-3 α , or (C) PvMSP-3 β in Freund's Adjuvant. Antibody binding was detected with secondary Alexa 568-labeled antibody (red) and nuclei were visualized by DAPI staining (blue). BF, bright field. doi:10.1371/journal.pone.0056061.g007

Previous studies have demonstrated that a major challenge in the development of subunit vaccines for malaria is the identification of a safe and potent adjuvant capable of inducing immune responses high antibody titers [38]. Antibody titers were very high in animals vaccinated with the C-terminus of PvMSP-3 α or different regions of PvMSP-3 β emulsified in IFA; thus, these recombinant proteins can be highly immunogenic. Our results indicate PvMSP-3 α or a protein representing the majority of the PvMSP-3 β sequence (FP-3) were immunogenic when administered in adjuvants other than IFA. The immunogenicity of PvMSP-3 α was greater when administered in Quil A, a saponin derived from the bark of a Chilean tree, *Quillaja saponaria*, than in Alum, FliC, or CpG ODN 1826 and was similar to IFA. In addition, the antigen in TiterMax generated antibody titers similar to that obtained in IFA. PvMSP-3 β yielded high antibody titers in all tested adjuvants, although Alum and FliC failed to perform at the level of IFA; however, TLR-9 agonist CPG ODN 1826 improved their adjuvant activity. It is of interest to note that adjuvants such as Alum, FliC, TiterMax, and IFA tend to induce Th2 with high IgG1/IgG2a ratios, whereas CPG ODN 1826 and Quil A show a clear modulation of the IgG subclass response pattern to a more balanced Th1/Th2 response.

The cellular response to CpG DNA is mediated by TLR9, followed by induction of pro-inflammatory cytokines (e.g. IL-12, TNF- α , and IFN- γ), and producing a strong Th1 response [39]. We observed a response pattern favoring Th1 in all formulations containing CPG ODN (CPG ODN 1826 alone, Alum+CPG ODN 1826, and FliC+CPG ODN 1826). Clinical trials evaluating the adjuvant activity of CpG ODN with vaccines designed to prevent malaria have been reported [40–43]. Co-administration of

CpG with AMA-1 [40] or MSP1₄₂ of *P. falciparum* [43] increased the geometric media of antibodies by 5.5 or 8-fold, respectively, when compared to each protein alone.

The relevance of antibodies against PvMSP-3 α or β in host protection remains untested. Evidence in favor of a protective role for anti-*P. vivax* MSP-3 was obtained by clinical trials performed with *P. falciparum* MSP3.1 [3]. The functional role(s) for the parasite and in the context of host immune responses remain to be determined for other members of the MSP3 family in each of these species [32]. Such investigations as a whole should help guide decisions for the development of malaria vaccines based on these or alternative proteins, which could prove to be valuable in areas of the world afflicted with both *P. falciparum* and *P. vivax*.

Supporting Information

Figure S1 Serum IgG isotype responses in mice after immunization with PvMSP-3 in the presence of adjuvant. BALB/c mice were immunized with the recombinant proteins PvMSP-3 α (A) or PvMSP-3 β FP-3 (B) in the presence of adjuvant as described in Figures 4 and 5. IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody titers in the sera of immunized mice were analyzed by ELISA 2 weeks after the third dose. Results are expressed as mean IgG antibody titers ($\log_{10} \pm$ SEM for 6 mice per group. (TIF)

Acknowledgments

We are particularly grateful to the staff at Shoklo Malaria Research Unit (SMRU), Mae Sod Thailand for their contribution to this study. Kátia Sanches Françoso for her technical assistance. Fernanda Gentil Omori performed a few preliminary experiments.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ISS MMR ARB. Performed the experiments: ARB ECV MCJ RR JAL BR. Analyzed the data: ARB ECV

RR BR ISS MMR. Contributed reagents/materials/analysis tools: LCF JWB MRG FTC LR FN. Wrote the paper: ISS MMR LCF FTC LR MRG.

References

- Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, Fernandes JF, Abossolo BP, et al. (2011) First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children. *N Engl J Med* 365: 1863–1875.
- Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Laurens MB, Ouattara A, et al. (2011) A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. *N Engl J Med* 365: 1004–1013.
- Sirima SB, Cousens S, Druilhe P (2011) Protection against malaria by MSP3 candidate vaccine. *N Engl J Med* 365: 1062–1064.
- Herrera S, Fernández OL, Vera O, Cárdenas W, Ramírez O, et al. (2011) Phase I safety and immunogenicity trial of *Plasmodium vivax* CS derived long synthetic peptides adjuvanted with montanide ISA 720 or montanide ISA 51. *Am J Trop Med Hyg* 84(2 Suppl): 12–20.
- Arévalo-Herrera M, Soto L, Perlaza BL, Céspedes N, Vera O, et al. (2011) Antibody-mediated and cellular immune responses induced in naive volunteers by vaccination with long synthetic peptides derived from the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Am J Trop Med Hyg* 84(2 Suppl): 35–42.
- Wu Y, Ellis RD, Shaffer D, Fontes E, Malkin EM, et al. (2008) Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pf25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS One* 3: e2636.
- malERA Consultative Group on Vaccines (2011) A research agenda for malaria eradication: vaccines. *PLoS Med* 8: e1000398.
- Soares IS, Levitus G, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM (1997) Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infect Immun* 65: 1606–1614.
- Soares IS, Cunha MG, Silva MN, Souza JM, Del Portillo HA, et al. (1999) Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Am J Trop Med Hyg* 60: 357–363.
- Michon PA, Arevalo-Herrera M, Fraser T, Herrera S, Adams JH (1998) Serologic responses to recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in a Colombian village. *Am J Trop Med Hyg* 59: 597–599.
- Rodrigues MH, Cunha MG, Machado RL, Ferreira OC Jr, Rodrigues MM, et al. (2003) Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. *Malar J* 2: 39.
- Herrera S, Gómez A, Vera O, Vergara J, Valderrama-Aguirre A, et al. (2005) Antibody response to *Plasmodium vivax* antigens in Fy-negative individuals from the Colombian Pacific coast. *Am J Trop Med Hyg* 73(5 Suppl): 44–49.
- Rodrigues MHC, Rodrigues KM, Oliveira TR, Comodo AN, Rodrigues MM, et al. (2005) Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int J Parasitol* 35: 185–192.
- Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli AU, et al. (2005) IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. *Parasitol Res* 95: 420–426.
- Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli AU, et al. (2006) Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg* 75: 582–587.
- Barbedo MB, Ricci R, Jimenez MC, Cunha MG, Yazdani SS, et al. (2007) Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 335–339.
- Ceravolo IP, Sanchez BA, Sousa TN, Guerra BM, Soares IS, et al. (2009) Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. *Clin Exp Immunol* 156: 502–510.
- Storti-Melo LM, Souza-Neiras WC, Cassiano GC, Taveira LC, Cordeiro AJ, et al. (2011) Evaluation of the naturally acquired antibody immune response to the Pv200L N-terminal fragment of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 in four areas of the Amazon Region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 84(2 Suppl): 58–63.
- Lima-Junior JC, Jiang J, Rodrigues-da-Silva RN, Banic DM, Tran TM, et al. (2011) B cell epitope mapping and characterization of naturally acquired antibodies to the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 α (PvMSP-3 α) in malaria exposed individuals from Brazilian Amazon. *Vaccine* 29: 1801–1811.
- Mourão LC, Morais CG, Bueno LL, Jimenez MC, Soares IS, et al. (2012) Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* blood-stage vaccine candidates (PvMSP-1(19) and PvMSP-3 α (359–798)) and their relationship with hematological features in malaria patients from the Brazilian Amazon. *Microbes Infect* 14: 730–739.
- Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS (2001) Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine* 20: 385–396.
- Herrera S, Bonelo A, Perlaza BL, Valencia AZ, Cifuentes C, et al. (2004) Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Int J Parasitol* 34: 1535–1546.
- Arévalo-Herrera M, Castellanos A, Yazdani SS, Shakri AR, Chitinis CE, et al. (2005) Immunogenicity and protective efficacy of recombinant vaccine based on the receptor-binding domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in Aotus monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 73(5 Suppl): 25–31.
- Valderrama-Aguirre A, Quintero G, Gómez A, Castellanos A, Pérez Y, et al. (2005) Antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of *Plasmodium vivax* MSP1 PV200L: a potential malaria vaccine subunit. *Am J Trop Med Hyg* 73(5 Suppl): 16–24.
- Rosa DS, Iwai LK, Tzelepis F, Bargieri DY, Medeiros MA, et al. (2006) Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). *Microbes Infect* 8: 2130–2137.
- Bargieri DY, Rosa DS, Braga CJ, Carvalho BO, Costa FT, et al. (2008) New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella typhimurium* FltC flagellin. *Vaccine* 26: 6132–6142.
- Bouillet LÉ, Dias MO, Dorigo NA, Moura AD, Russell B, et al. (2011) Long-Term Humoral and Cellular Immune Responses Elicited by a Heterologous *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 Protein Prime/Adenovirus Boost Immunization Protocol. *Infect Immun* 79: 3642–3652.
- Galinski MR, Corredor-Medina C, Povoa M, Crosby J, Ingravallo P, et al. (1999) *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 contains coiled-coil motifs in an alanine-rich central domain. *Mol Biochem Parasitol* 101: 131–147.
- Galinski MR, Ingravallo P, Corredor-Medina C, Al-Khedery B, Povoa M, et al. (2001) *Plasmodium vivax* merozoite surface proteins-3 β and-3 γ share structural similarities with *P. vivax* merozoite surface protein-3 α and define a new gene family. *Mol Biochem Parasitol* 115: 41–53.
- Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, et al. (2008) Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* 455: 757–763.
- Jimenez MC, Ramos CH, Barbosa JA, Galinski MR, Barnwell JW, et al. (2008) Biophysical characterization of the recombinant merozoite surface protein-3 of *Plasmodium vivax*. *Biochim Biophys Acta* 1780: 983–988.
- Singh S, Soe S, Weisman S, Barnwell JW, Pérignon JL, et al. (2009) A conserved multi-gene family induces cross-reactive antibodies effective in defense against *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 4: e5410.
- GRReferences and further reading may be available for this article. To view references and further reading you must purchase this article. entil F, Bargieri DY, Leite JA, François KS, Patricio MB, et al. (2010) A recombinant vaccine based on domain II of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice. *Vaccine* 28: 6183–6190.
- Russell B, Suwanarusk R, Borlon C, Costa FT, Chu CS, et al. (2011) A reliable ex vivo invasion assay of human reticulocytes by *Plasmodium vivax*. *Blood* 118: e74–81.
- Rayner JC, Corredor V, Feldman D, Ingravallo P, Iderabdullah F, et al. (2002) Extensive polymorphism in the *Plasmodium vivax* merozoite surface coat protein MSP-3 α is limited to specific domains. *Parasitology* 125: 393–405.
- Rayner JC, Huber CS, Feldman D, Ingravallo P, Galinski MR, et al. (2004) *Plasmodium vivax* merozoite surface protein PvMSP-3 β is radically polymorphic through mutation and large insertions and deletions. *Infect Genet Evol* 4: 309–319.
- Ribeiro RS, Ladeira L, Rezende AM, Fontes CJ, Carvalho LH, et al. (2011) Analysis of the genetic variability of PvMSP-3 α among *Plasmodium vivax* in Brazilian field isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 Suppl 1: 27–33.
- Coler RN, Carter D, Friede M, Reed SG (2009) Adjuvants for malaria vaccines. *Parasite Immunol* 31: 520–528.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, et al. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740–745.
- Mullen GE, Ellis RD, Miura K, Malkin E, Nolan C, et al. (2008) Phase I trial of AMA1-C1/Alhydrogel plus CPG7909: an asexual blood-stage vaccine or *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One* 3: e2940.
- Traore B, Kone Y, Doumbo S, Doumatabe D, Traore A, et al. (2009) The TLR9 agonist CpG fails to enhance the acquisition of *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in semi-immune adults in Mali. *Vaccine* 27: 7299–7303.
- Sagara I, Ellis RD, Dicko A, Niambele MB, Kamate B, et al. (2009) A randomized and controlled Phase I study of the safety and immunogenicity of the AMA1-C1/Alhydrogel +CPG 7909 vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria in semi-immune Malian adults. *Vaccine* 27: 7292–7298.
- Ellis RD, Martin LB, Shaffer D, Long CA, Miura K, et al. (2010) Phase I trial of the *Plasmodium falciparum* blood stage vaccine MSP1(42)-C1/Alhydrogel with and without CPG 7909 in malaria naïve adults. *PLoSOne* 5: e8787.