

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO – UNISAGRADO

HELOIZA BRASILINO GONÇALVES

VACINAS PARA MALÁRIA: UM PROGRESSO INOVADOR PARA A SAÚDE
MUNDIAL

BAURU

2022

HELOIZA BRASILINO GONÇALVES

VACINAS PARA MALÁRIA: UM PROGRESSO INOVADOR PARA A SAÚDE
MUNDIAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina - Centro
Universitário Sagrado Coração.

Orientadora: Prof.^a Ma. Thainá Valente
Bertozzo.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Érica Boarato
David.

BAURU

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo
com ISBD

G635v	<p>Gonçalves, Heloiza Brasilino</p> <p>Vacinas para malária: um progresso inovador para a saúde mundial / Heloiza Brasilino Gonçalves. -- 2022. 72f. : il.</p> <p>Orientadora: Prof.^a M.^a Thainá Valente Bertozzo Coorientadora: Prof.^a Dra. Érica Boarato David</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP</p> <p>1. Malária. 2. Vacinas. 3. Resposta Imunológica. 4. Ensaio Clínico. I. Bertozzo, Thainá Valente. II. David, Érica Boarato. III. Título.</p>
-------	--

HELOIZA BRASILINO GONÇALVES

VACINAS PARA MALÁRIA: UM PROGRESSO INOVADOR PARA A SAÚDE
MUNDIAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina - Centro
Universitário Sagrado Coração.

Aprovado em: ___/___/___.

Banca examinadora: Prof.^a Dra. Ana Paula Favaro Trombone Garlet

Prof.^a Dra. Thainá Valente Bertozzo (Orientadora)
Centro Universitário Sagrado Coração

Prof.^a Dra. Érica Boarato David (Coorientadora)
Centro Universitário Sagrado Coração

Prof.^a Dra. Ana Paula Favaro Trombone Garlet
Centro Universitário Sagrado Coração

Dedico este trabalho à minha mãe, Izabel Cristina, e ao meu pai, João, que sonharam esse sonho junto comigo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus, por me ajudar a ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo do curso. Aos meus pais, que deram apoio e me incentivaram a não desistir dos meus objetivos. Tenho muita gratidão por tê-los em minha vida. Amo vocês pra sempre.

À minha orientadora Ma. Thainá Valente Bertozzo, pelo voto de confiança e por te me ajudado no desenvolvimento deste trabalho, sempre sendo muito atenciosa. Foi um prazer ter você como minha orientadora.

À minha coorientadora, Dra. Érica Boarato David, que foi parte importante deste trabalho. Você ocupa um lugar muito de muita admiração e carinho no meu coração, sendo uma honra ter tido você como minha coorientadora.

À minha banca, Dra. Ana Paula Favaro Trombone Garlet, por ter aceitado o convite de avaliar o meu trabalho. Tenho uma verdadeira admiração pela profissional que você é, me servindo de muita inspiração.

À Amanda Gabrielle Paulucci, por ter sido uma amiga parceira e compreensiva. Obrigada por todas as conversas e incentivos, que foram muito importantes pra mim.

De forma geral, gostaria de agradecer à todos os envolvidos que fizeram parte dessa conquista. Sou grata a cada um de vocês.

“Somos feitos da matéria de que são feitos os sonhos” (SHAKESPEARE, 1611).

RESUMO

A malária é uma doença parasitária transmitida majoritariamente pela picada do mosquito vetor *Anopheles* sp. As consequências resultantes da infecção podem levar a quadros graves e potencialmente fatais. Há mais de dez anos, pesquisadores vêm tentando desenvolver uma vacina para a malária, capaz de desencadear uma resposta imune protetora, evitando a manifestação clínica da doença. O principal objetivo deste trabalho é trazer um compilado das principais vacinas em desenvolvimento atualmente, seus mecanismos de ação, composição e resposta imunológica, através de ensaios clínicos. As informações abordadas ao longo do trabalho foram coletadas de diversas bases de dados contendo artigos renomados, e a seleção dos trabalhos foi baseada em artigos mais recentes possíveis, de modo a trazer uma abordagem atual sobre o desenvolvimento das vacinas. O trabalho permite um conhecimento geral sobre a malária e as vacinas que vêm sendo desenvolvidas, abordando também o perfil imunológico de cada uma delas, a fim de compreender a sua eficácia e imunogenicidade nos ensaios clínicos, ressaltando que mesmo com entraves encontrados ao longo do desenvolvimento desses imunizantes, teve-se um grande avanço com a vacina RTS,S para a saúde pública mundial, sendo um potencial imunizante que pode salvar vidas.

Palavras-chave: malária; vacinas; resposta imunológica; ensaios clínicos.

ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease transmitted mainly by the bite of the mosquito vector *Anopheles* sp. The consequences resulting from the infection can lead to serious and potentially fatal conditions. For more than ten years, researchers have been trying to develop a vaccine for malaria, capable of triggering a protective immune response, preventing the clinical manifestation of the disease. The main objective of this work is to bring a compilation of the main vaccines currently under development, their mechanisms of action, composition and immune response, through clinical trials. The information covered throughout the work was collected from several databases containing renowned articles, and the selection of works was based on the most recent articles possible, in order to bring a current approach to vaccine development. The work allows a general knowledge about malaria and the vaccines that have been developed, also approaching the immunological profile of each one of them, in order to understand their effectiveness and immunogenicity in clinical trials, emphasizing that even with obstacles encountered during the development of these immunizers, there was a great advance with RTS,S for global public health, being a potential immunizing agent that can save lives.

Keywords: malaria; vaccines; immune response; clinical trials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do ciclo do <i>Plasmodium ssp</i>	20
Figura 2 – Óbitos por malária no Brasil de 2008 a 2019.....	22
Figura 3 – Estágios do ciclo de vida do <i>Plasmodium ssp</i> e antígenos candidatos a vacinas que visam cada estágio	26
Figura 4 – Representação gráfica das estruturas circunsporozoítas (CSP) e da RTS,S	28
Figura 5 – Dinâmica dos anticorpos anti-CSP e sua associação contra a infecção	31
Figura 6 – Design do estudo desenvolvido de RTS,S com AdVac	32
Figura 7 – Resposta imune desencadeada após as vacinações com RTS,S e AdVac.....	33
Figura 8 – Associações sorológicas e celulares de proteção após a vacinação	34
Figura 9 – Projeto e caracterização da vacina R21	37
Figura 10 – Imunogenicidade da R21	38
Figura 11 – R21 e imunogenicidade do vetor viral em regime de combinação	39
Figura 12 – Eficácia protetora da vacina R21	41
Figura 13 – Respostas de anticorpos anti-NANP a R21/Matrix-M.....	42
Figura 14 – Ilustração do complexo RCR ligado à basigina	43
Figura 15 – Propriedades inibitórias do crescimento de mAbs específicos para a PfRH5. 45	
Figura 16 – Epítomos de neutralização inseridos na proteína PfRH5 Δ NL.....	46
Figura 17 – A imunização com complexo AMA1-RON 2L protege camundongos contra o desafio letal com <i>P. yoelli</i>	47
Figura 18 – Complexo AMA1-RON 2L gera anticorpos inibidores	49
Figura 19 – Arquitetura da proteína VAR2CSA	50
Figura 20 – Perfil das subclasses de IgG para a proteína recombinante IDI-ID2a	53
Figura 21 – Estudos em camundongos comparando Pfs25-EPA/Alhydrogel com Pfs230DM1-EPA/Alhydrogel	55
Figura 22 – Estudos em macacos rhesus comparando Pfs25-EPA/Alhydrogel com Pfs230D1M-EPA/Alhydrogel	56
Figura 23 – Estudos em macacos rhesus com e sem sistema complemento	57
Figura 24 – Níveis de anticorpos por ELISA em humanos.....	57
Figura 25 – Resposta de anticorpos séricos contra a Pfs25.....	59
Figura 26 – Resposta de anticorpos séricos contra Pfs25 no dia 140.....	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA	12
1.2	PROBLEMA E HIPÓTESE	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	METODOLOGIA	17
4	EMBASAMENTO TEÓRICO	18
4.1	ASPECTOS GERAIS SOBRE A MALÁRIA.....	18
4.2	EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA.....	20
4.3	PATOGENIA DA MALÁRIA	22
4.4	SINAIS E SINTOMAS	24
4.5	DESENVOLVIMENTO DE VACINAS PARA MALÁRIA.....	25
4.6	DEMAIS VACINAS EM ESTUDO.....	60
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
	REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA

O historiador grego Heródoto já dizia que devemos “pensar o passado para compreender o presente e idealizar o futuro”. Este pensamento é extremamente pertinente quando trazido para a história das vacinas, a fim de compreender seu desenvolvimento ao longo dos anos.

Em meados do século X, na China, foram relatados os primeiros casos de imunização, que eram conhecidos como “variolação”. Este termo vem do latim *varius* (que significa “manchada”). Esta técnica se baseava na inoculação do vírus causador da varíola a partir de pústulas secas de indivíduos doentes, que eram sopradas ou inoculadas diretamente na pele de indivíduos não infectados, a fim infectá-los com a forma menos grave da doença, fazendo com que essas pessoas se tornassem protegidas a uma exposição futura ao vírus. Essa prática acabou se tornando muito popular no continente europeu e na África, durante o século XVIII, onde a varíola causava em torno de meio milhão de óbitos. (DE GREGORIO; RAPPUOLI, 2014).

Durante o século XVIII, a prática da variolação era uma tentativa precoce de tratamento para moléstias infecciosas amplamente realizada, difundida pela aristocrata inglesa Lady Mary Wortley Montague, responsável por introduzir a prática na Inglaterra. Tal técnica se espalhou por todo o continente europeu, até a grande descoberta de Edward Jenner. (RIEDEL, 2005).

Algum tempo depois, o médico inglês Edward Jenner começou a observar que as pessoas que tinham a varíola bovina, também conhecida como *cowpox*, eram “imunes” a varíola humana, e que a varíola bovina poderia ser transmitida de pessoa a pessoa através das pústulas na pele, funcionando como técnica de proteção (RIEDEL, 2005).

Com base em seus conhecimentos prévios, Jenner, no ano de 1796, inoculou o pus da lesão de uma mulher chamada Sarah Nelmes (que era ordenhadora e que possuía a varíola bovina) em um garoto de oito anos, chamado de James Phipps. Esse garoto, então infectado por *cowpox*, desenvolveu sintomas leves da doença como febre leve e desconforto nas axilas após a inoculação, mas depois de dez dias estava totalmente curado. Logo depois, Jenner inoculou no garoto o pus de uma pessoa com varíola humana, e o mesmo não se infectou, se tornando imune. (RIEDEL, 2005).

Este é considerado o evento oficial que marca o advento da vacina, cuja a origem da palavra vem do latim *vaccinae* (“da vaca”), já que o imunizante veio através da doença bovina, descrita por Jenner em seu livro publicado em 1798, intitulado de “*An inquiry into the*

causes and effects of the variolae vaccinae: a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and, known by the name of the cow pox” (RIEDEL, 2005).

As vacinas são as principais intervenções médicas mais eficazes já introduzidas no combate às doenças infecciosas graves, sendo responsáveis por evitarem cerca de 2,5 milhões de mortes em todo o mundo. Mesmo que uma grande maioria de doenças sejam evitadas pelas vacinas disponíveis no momento, ainda existem outras enfermidades negligenciadas, que são verdadeiros desafios da saúde pública global. E, mais desafiadora ainda, é o desenvolvimento de vacinas, como é o caso da malária, doença que possui cerca de 200 milhões de novos casos notificados ao ano e mais de 600 mil mortes. (DE GREGORIO; RAPPUOLI, 2014).

Segundo Neves (2007) a malária ou também conhecida como paludismo, febre palustre, impaludismo, maleita e/ou sezão, é descrita na literatura desde a era pré-Cristã, por Hipócrates, que descreveu em seus manuscritos as características de ocorrência sazonal e o quadro febril padrão e intermitente. Porém, foi no século XIX que o seu termo em si (malária) teve origem, momento em que estudiosos italianos defendiam a ideia de que a enfermidade era causada por vapores nocivos que eram exalados dos pântanos, surgindo assim, o termo “mal aria”, que em seu significado literal quer dizer “mau ar”.

Entretanto, somente no ano de 1884, que pesquisador Gerhardt, descobriu que a malária era uma hemoparasitose, ou seja, uma doença causada por um protozoário que atingia a corrente sanguínea do hospedeiro, sendo essa descoberta feita através de uma transfusão de sangue de uma pessoa infectada (NEVES, 2007).

A malária é uma doença que acomete principalmente regiões tropicais e subtropicais, que geograficamente apresentam maiores períodos de chuvas ao longo do ano e também altas temperaturas, sendo um *habitat* perfeito para o agente etiológico causador da doença. Os quatro principais agentes causadores da malária são: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae*. (NEVES, 2007)

A transmissão da doença para os humanos ocorre através da fêmea do mosquito prego, como é conhecido popularmente, que é pertencente ao gênero *Anopheles*. Uma vez que a fêmea do mosquito é infectada pelo agente etiológico, ou seja, pelo *Plasmodium* spp, o mesmo começa a se reproduzir sexuadamente no tubo digestivo do mosquito. Logo após a fase sexuada ter se findado, a fêmea do mosquito já se torna infectante para o ser humano, que uma vez picado, desenvolverá a parte assexuada do ciclo parasitário (esquizogônia), infectando as hemácias, desenvolvendo assim a doença. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O epidemiologista Halidou Tinto (2021), ressalta que a malária é uma doença extremamente perigosa e que, a cada segundo, infecta sete pessoas ao redor do mundo. Além disso, ressalta sua importância pelo fato do parasito conseguir driblar de maneira eficiente o sistema imune.

Há mais de 10 anos pesquisadores vêm buscando vacinas que sejam capazes de reduzir a taxa de mortalidade por malária ao redor do mundo. Ao longo dos anos, muitos imunizantes contra malária foram desenvolvidos com o intuito de agirem em alguma fase do ciclo evolutivo do parasito, como são os casos das vacinas experimentais que atuam na fase sexuada do parasito (Vacinas bloqueadoras de transmissão vetorial – TBV), na fase pré-eritrocitária e na fase eritrocitária do parasito. (DUFFY; GORRES, 2020).

A vacina experimental para a fase pré-eritrocitária da doença, a RTS,S/AS01 ou também conhecida por seu nome comercial Mosquirix, se tornou o primeiro imunizante liberado para uso emergencial em crianças pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2021, já que a candidata à vacina apresentou nos estudos clínicos uma boa eficácia, sendo reconhecida pela OMS como uma vacina capaz de salvar vidas, já que a mesma mostrou uma queda nos níveis de morbidade e mortalidade em crianças que vivem em áreas de alta transmissão, como é caso da África Subsaariana. (WHO, 2021).

Por se tratar de um parasito com um ciclo biológico extremamente complexo, o desenvolvimento de vacinas para malária apresenta muitos desafios, já que atualmente nenhuma vacina com eficácia acima de 75%, como é preconizado pela OMS, foi formalmente liberada para uso. (HILL, 2021).

O desenvolvimento de uma vacina contra a malária é de extrema importância para a saúde pública mundial. As vacinas que estão sob desenvolvimento atualmente configuram um importante passo na luta contra a malária, podendo assim, levar-nos, futuramente, a um cenário de erradicação dessa doença através da vacinação, como foi com a varíola.

1.2 PROBLEMA E HIPÓTESE

Há mais de uma década, estudiosos na área de vacinas vem tentando desenvolver uma vacina capaz de atuar de forma eficaz em algumas etapas do ciclo evolutivo da malária. Porém, por se tratar de um parasito que consegue driblar o sistema imune, instalando a doença, isso se torna um grande impasse na hora de mensurar a resposta imunológica regulatória que a vacina é capaz de produzir no indivíduo. (TINTO, 2021).

Dessa forma, muitas vacinas candidatas contra malária vêm sendo desenvolvidas, seja para atuarem na fase eritrocitária, pré-eritrocitária da doença ou até mesmo bloqueando a transmissão pelo vetor, que é o mosquito. Cada vacina é específica para atuar em alguma fase do ciclo biológico do agente etiológico, desempenhando uma resposta imune que pode ser tanto do tipo celular (TCD4) quanto humoral, a partir da produção de anticorpos.

Dentre as candidatas vacinais, a RTS,S/AS01 ou Mosquirix (nome comercial), é a que está em fase mais avançada na pesquisa, sendo o primeiro imunizante a ser liberado pela OMS para uso emergencial, mostrando resultados otimistas na redução da taxa de mortalidade em crianças. (WHO, 2021). Porventura, a grande questão é explorar se estes imunizantes que estão em desenvolvimento como a RTS,S/AS01 são altamente imunogênicos e capazes de promover uma imunidade protetora a longo prazo contra a malária.

A imunogenicidade é um fator preponderante na hora de desenvolver uma vacina, já que é a capacidade do imunizante de ativar o sistema imune contra o patógeno, produzindo anticorpos contra o mesmo, e dessa forma, criar uma proteção duradoura. (MENDES, 2021). De modo geral, a imunogenicidade e produção de anticorpos são um dos parâmetros que mais se destacam na hora de desenvolver uma vacina, sendo fatores importantes para se concluir se a vacina para a malária é ou não é eficaz.

Diante do exposto, esta pesquisa visa conhecer as principais vacinas para malária que estão sendo elaboradas ou utilizadas atualmente, afim de conhecer suas características particulares e seus mecanismos de ação. A partir disso, busca-se entender e enfatizar a importância das vacinas em seus diferentes estágios de atuação no ciclo, abordando também, cientificamente, suas composições, mecanismos de ação, público-alvo e a resposta imune desencadeada por ela, apresentando os pontos positivos dessa imunização.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Discutir quais são as vacinas contra a malária em desenvolvimento atualmente, como também os antígenos que são utilizados, em qual fase atuam e sua resposta imunológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Compreender aspectos importantes sobre malária, ciclo biológico, aspectos fisiopatológicos e quadro de distribuição epidemiológica da malária no Brasil e no mundo;
- Descrever e discutir os principais artigos presentes na literatura sobre ensaios clínicos de vacinas anti-maláricas, destacando o mecanismo, composição e a resposta imunológica das vacinas RTS,S/AS01 (Mosquirix), R21/Matrix-M, vacinas eritrocitárias baseadas nos antígenos PfRH5, AMA1-RON2 e VAR2CSA (contra malária placentária), e as vacinas bloqueadoras de transmissão vetorial (Pfs230 e Pfs25).

3 METODOLOGIA

Realizou-se um estudo com pesquisas exploratórias e descritivas, baseando-se na análise de artigos publicados sobre o tema nos últimos anos. Para tal, foram utilizados artigos traduzidos para o português obtidos na base de dados PubMed e concomitante, foram utilizadas também informações retiradas da Organização Mundial de Saúde, Ministério da Saúde e livros de Parasitologia Humana.

Para tal finalidade, os artigos foram consultados no período de janeiro a julho de 2022. As palavras-chave usadas nas pesquisas para o levantamento bibliográfico foram: “malária”, “vacinas para a malária”, “vacinas para a malária em estágio pré-eritrocitário”, “vacinas para a malária em estágio sanguíneo” e “vacinas bloqueadoras de transmissão para a malária”.

O levantamento dos dados foi feito considerando-se o ano das publicações, a metodologia utilizada e os resultados obtidos. Os dados coletados durante as pesquisas foram armazenados e analisados em plataforma Word, da Microsoft.

4 EMBASAMENTO TEÓRICO

4.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A MALÁRIA

A malária é definida pelo Ministério da Saúde como uma doença febril aguda, que é causada por parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa, família *Plasmodiidae* e ao gênero *Plasmodium*. Das mais de 150 espécies relatadas na literatura, apenas quatro espécies parasitam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*, sendo este último muito comum em regiões restritas ao continente africano (NEVES, 2007); (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

A malária não é uma doença contagiosa, pois necessita da participação de um vetor, que no caso é fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, também conhecido como mosquito prego, responsável pela transmissão da doença (FERREIRA, 2020). Estes mosquitos são muito comuns nos horários crepusculares, ao amanhecer e entardecer (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

O ciclo evolutivo dos plasmódios nos humanos é assexuado, iniciando-se quando os esporozoítos infectantes são inoculados nos humanos pelo inseto vetor através da sua picada. Durante o repasto sanguíneo, cerca de 15 a 200 esporozoítos são inoculados sob a pele do hospedeiro, onde permanecem por 15 minutos antes de atingirem a corrente sanguínea (NEVES, 2007).

Uma vez que os esporozoítos já estão na corrente sanguínea, eles invadem os hepatócitos, células que apresentam proteínas circunsporozoíta (CS) e proteína adesiva relacionada a trombospodina (TRAP), dando origem aos trofozoítos pré-eritrocitários, que se multiplicam por esquizogonia. Subsequente a divisão celular assexuada (esquizogonia pré-eritrocitária) nos hepatócitos, tem-se a formação células multinucleadas, que são os esquizontes (NEVES, 2007; NETO *et. al*, 2008).

Ao final de 8 a 15 dias após a esquizogonia tecidual, os hepatócitos parasitados pelos esquizontes se rompem, liberando milhares de merozoítos na circulação. Algumas espécies como *P. vivax* e *P. ovale*, apresentam esporozoítas que darão origem a formas latentes intra-hepáticas conhecidas como hipnozoítas (do grego *hypnos*, sono). Estes hipnozoítos são responsáveis pelos quadros de recaídas tardias, que geralmente ocorrem após seis meses de incubação para a maioria das cepas de *P. vivax* (NEVES, 2007; NETO *et. al*, 2008).

O ciclo eritrocitário se inicia com os merozoítos invadindo as hemácias, onde essa interação se dá por meio do reconhecimento de receptores específicos. O receptor principal para o *P. falciparum* são as glicoforinas A (glicoproteínas presentes nas hemácias), enquanto

que para o *P. vivax*, a glicoproteína do grupo sanguíneo Duffy, sendo os indivíduos Duffy-negativos refratários para a infecção por *P. vivax* (NETO *et. al*, 2008). Ademais, o *P. falciparum* invade eritrócitos de todas as idades, ao passo que o *P. vivax* so parasita reticulócitos e o *P. malariae* infecta somente eritrócitos maduros (NEVES, 2007).

Além das proteínas citadas acima presentes nos merozoítos, tem-se também diversas outras moléculas capazes de exercer o papel de ligantes de receptores eritrocitários, sendo a EBA-175 a molécula mais relevante nessa função de ligação. No interior das hemácias ocorre uma segunda esquizogonia, onde os merozoítos evoluem para trofozoítos, que se dividem diversas vezes, de forma assexuada, resultando em células multinucleadas, que são os esquizontes (NETO *et. al*, 2008).

Os esquizontes maduros possuem de 6 a 32 núcleos, cada um deles originando um merozoíto. Ao final de cada esquizogonia eritrocitária, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, ocasionando nos acessos maláricos, que são os picos febris periódicos (NETO *et. al*, 2008). Este ciclo eritrocitário se repete sucessivas vezes, a cada 48 horas para as infecções por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, e cada 72 horas para as infecções por *P. malariae* (NEVES, 2007).

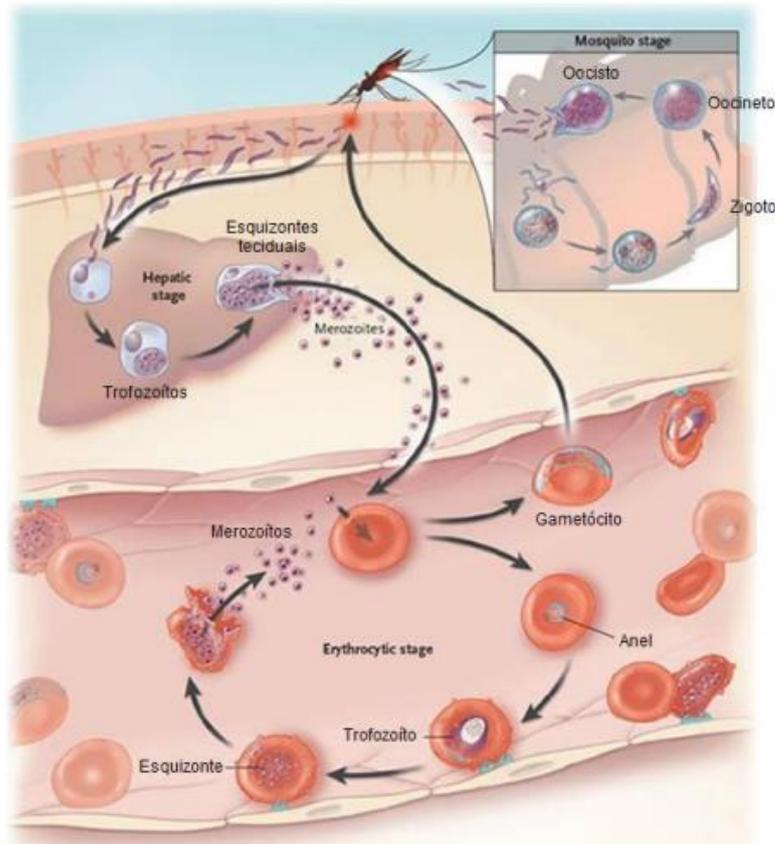
Os merozoítos, além de se transformarem em trofozoítos e posteriormente em esquizontes, podem também se diferenciar em gametócitos, que são as formas de reprodução sexuada infectantes para os mosquitos vetores. Os gametócitos ingeridos pelas fêmeas do mosquito *Anopheles* durante o repasto sanguíneo passam por esporogonia, e em poucos minutos os gametócitos masculinos sofrem exflagelação, resultando na formação de seis a oito microgametas, ao passo que os gametócitos femininos transformam-se em macrogametas (NETO *et. al*, 2008).

Dentro de 20 a 30 minutos, o microgameta masculino fecunda um macrogameta feminino, dando origem a um zigoto, que em 24 horas após a fecundação, se transforma em oocineto que é o estágio móvel. O oocineto migra até a parede do estômago do mosquito, onde se transforma em uma estrutura esférica que se acomoda entre o epitélio e a membrana basal, que é o oocisto, cujo em seu interior se formam os esporozoítos (NETO *et. al*, 2008).

Estes esporozoítos formados se disseminam por todo o corpo do inseto através da hemolinfa, chegando até o canal central das glândulas salivares, para serem inoculados no hospedeiro vertebrado, juntamente com a saliva, durante o repasto sanguíneo (NEVES, 2007).

A Figura 1 apresenta uma representação esquemática do ciclo evolutivo do *Plasmodium*.

Figura 1: Representação esquemática do ciclo do *Plasmodium ssp*



Fonte: PEREIRA, 2012 (Adaptado da dissertação)

4.2 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

A Organização Mundial da Saúde publicou em 2021 um Relatório Mundial da Malária, com uma estimativa de 227 milhões de casos da doença só no ano de 2019, sendo endêmica em 85 países. No ano seguinte, a pandemia de Covid-19 corroborou para a interrupção de serviços prestados para a prevenção da doença, tendo um aumento no número de casos que chegou a 241 milhões de notificações (WHO, 2021).

Em 2020, os óbitos por malária aumentaram para uma estimativa de 627.000, representando aumento de 12% em relação ao ano anterior. Discute-se que 47.000 (cerca de 68%) das 69.000 mortes adicionais tiveram influência da pandemia de Covid-19 que culminou na interrupção de serviços básicos de atendimento, principalmente das populações mais carentes (WHO, 2021).

A taxa de óbitos de crianças menores de 5 anos veio diminuindo ao longo dos últimos 20 anos, tendo uma queda de 87% em 2000 para 76% em 2019. Todavia, em 2020 teve-se um

leve aumento para 77%, enquanto que as outras faixas etárias apresentam uma taxa de mortalidade menor (WHO, 2021).

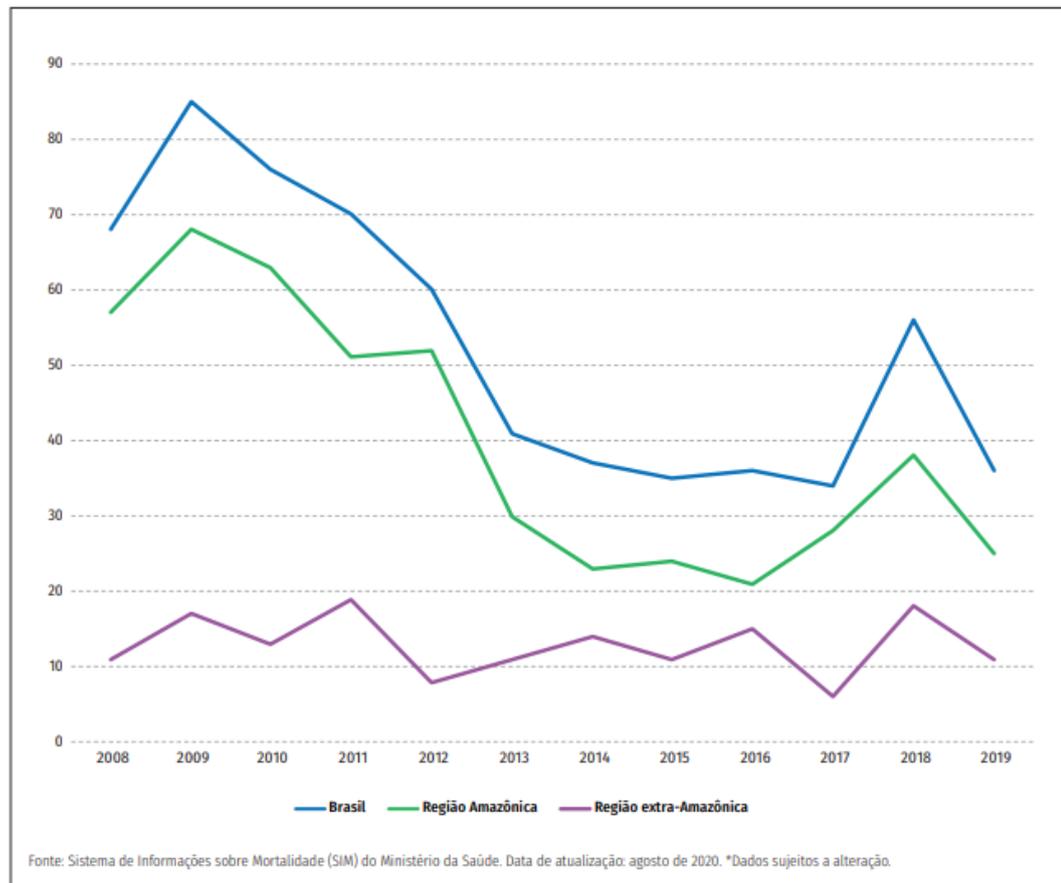
Dos 85 países endêmicos para doença, 29 pertencem ao continente africano, representando em 2020 aproximadamente 96% do total de casos reportados e mortes por malária. Na América Latina, entre 2000 e 2020, a prevalência e número de novos casos de malária reduziram em 58% (de 1,5 milhão para 0,65 milhão) e 67% (de 14,1 para 4,6 casos por 1.000 habitantes em risco), respectivamente. No âmbito dos óbitos, também foi notado uma queda em 56% (de 909 para 409) e 66% (de 0,8 para 0,3 mortes por 100.000 habitantes em risco) (WHO, 2021).

Os países República Bolivariana da Venezuela, Brasil e Colômbia foram os principais representantes do continente, perfazendo 77% dos casos. A maioria dos casos notificados na região é causada pelo agente *Plasmodium vivax*, que é muito comum nestas localidades (68% em 2020) (WHO, 2021).

Em relação ao Brasil, segundo o Boletim Epidemiológico de 2020 emitido pelo Ministério da Saúde, 234 municípios brasileiros contabilizaram casos de malária, onde destes, 37 (15,8%) são considerados como municípios prioritários, sendo responsáveis por 47.495 (79,7%) de 59.637 de casos registrados no país.

No ano de 2019, a letalidade da doença no país foi próxima de 2,04% na região extra-amazônica, ao passo que na região amazônica foi de aproximadamente 0,02%, constatando que a região extra-amazônica teve letalidade 123 vezes maior. Isso ocorre por conta da demora pela suspeição de malária em estados que não são endêmicos, gerando um agravamento do quadro clínico do paciente, resultando em um aumento de mortes (Figura 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Figura 2: Óbitos por malária no Brasil de 2008 a 2019



Fonte: Boletim Epidemiológico da Malária 2020 (Ministério da Saúde)

4.3 PATOGENIA DA MALÁRIA

A patogenia da malária é determinada pela destruição dos eritrócitos pelos merozoítos e a sua consequente liberação na corrente sanguínea, juntamente com os seus metabólitos, desencadeando uma resposta do hospedeiro. Os mecanismos responsáveis pelas diferentes manifestações clínicas são: (1) destruição dos eritrócitos parasitados; (2) toxicidade resultante da liberação de citocinas; (3) sequestro dos eritrócitos parasitados na rede capilar (específico para *P. falciparum*) e (4) lesão capilar por deposição de imunocomplexos (específico de *P. malariae*) (NEVES, 2007).

(1) Destruição dos eritrócitos parasitados: Este processo é característico de todos os tipos de malária, e que pode gerar desenvolvimento de anemia. Na maior parte dos casos relatados, a anemia não é correlacionada com a parasitemia, podendo ser referente à outros fatores como: destruição das hemácias não-parasitadas pelo sistema imune ou pelo aumento da

fagocitose por macrófagos do baço; participação de auto-anticorpos com afinidade para parasito e também para a hemácia e/ou por uma disfunção na medula óssea que é estimulada pela ação de citocinas, que leva a uma formação insuficiente de hemácias (anemia diseritropoiética) (NEVES, 2007).

(2) Toxicidade resultante da liberação de citocinas: Na fase aguda da doença ocorre a ativação de células imunes que produzem citocinas que atuam de maneira direta ou indireta sobre o parasito, porém acabam desempenhando um papel nocivo sobre o hospedeiro. A liberação de citocinas como o pirogênio endógeno, TNF (Fator de Necrose Tumoral) e Interleucina-I (IL-1, IL-6 e IL-8) pelos monócitos e macrófagos ativados, devido aos metabólitos liberados na ruptura dos esquizontes, leva ao aparecimento de muitos sintomas da malária aguda, principalmente o mal-estar e a febre (NEVES, 2007).

A citocina TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa) está amplamente relacionada aos casos de malária causadas por *P. vivax* e *P. falciparum*, estando associada com o mal prognóstico da malária por *P. falciparum*. Alguns estudos realizados apontam que esta citocina atua sobre o endotélio de forma direta, e de forma indireta induz as moléculas de citoaderência a se ligarem ao endotélio, levando a uma lesão do vaso que pode ocasionar um extravasamento de líquido para o espaço intersticial de estruturas nobres, como os alvéolos pulmonares e glomérulos renais, acarretando em manifestações de malária grave pulmonar e renal, respectivamente (NEVES, 2007).

Algumas outras citocinas com atividades tóxicas já foram relatadas, desempenhando uma ação inibitória da glicogênese que leva a um quadro de hipoglicemia e também podem aumentar a produção de óxido nítrico pelos leucócitos, músculo liso, micróglia e endotélio vascular, inibindo as funções celulares que implica em algumas complicações graves da malária, especialmente o coma (NEVES, 2007).

(3) Sequestro dos eritrócitos parasitados na rede capilar: Durante a esquizogonia sanguínea realizada pelo *P. falciparum*, uma série de modificações são feitas na superfície das células, permitindo a sua adesão à parede endotelial dos capilares. Este processo chamado de citoaderência é mediado por proteínas do parasito expressas na superfície das hemácias infectadas pelos merozoítos, sendo a proteína principal a PfEMP1 (Proteína 1 de membrana do eritrócito do *P. falciparum*), que forma uma protuberância (NEVES, 2007).

Algumas moléculas presentes no hospedeiro também estão inseridas no processo de citoaderência como a CD36 (antígeno de diferenciação leucocitária) que está na

microcirculação de diferentes órgãos, ICAM-1 (molécula de adesão intracelular) que é o principal ligante presente no cérebro e a CSA (sulfato de condroitina A) que está presente nos vasos placentários (NEVES, 2007).

A citoaderência endotelial é observada nas vênulas do novelo capilar de órgãos vitais, como na substância branca do cérebro, coração, fígado, rins e intestino. Conforme a intensidade dessa adesão celular, pode-se ter a obstrução da microcirculação e conseqüentemente a redução do fluxo de oxigênio para os tecidos, e também ocasionar um metabolismo anaeróbico que leva à uma acidose láctica (NEVES, 2007).

Os órgãos mais prejudicados por esse processo são o cérebro, os rins e o fígado, cujos danos causados são responsáveis pelos quadros de malária cerebral, insuficiência renal aguda e hepatite, comuns nos quadros de malária grave. Esse mecanismo de sequestro de eritrócitos trata-se de uma forma de escape do parasito, evitando a destruição pelo baço (NEVES, 2007).

(4) Lesão capilar por deposição de imunocomplexos: Nas infecções crônicas por *P. malariae* pode ocorrer a glomerulonefrite transitória e autolimitada, que se apresenta com a síndrome nefrótica. Esta lesão glomerular é desencadeada pela deposição de imunocomplexos nos glomérulos, alterando a sua permeabilidade e induzindo a uma perda excessiva de proteínas na urina (NEVES, 2007).

4.4 SINAIS E SINTOMAS

A fase sintomática da doença é caracterizada pela presença de mal-estar, cefaleia, cansaço e mialgia, precedidas por uma febre clássica. O acesso malárico que ocorre a cada ruptura de hemácias ao final da esquizogonia, é acompanhado por calafrios e sudorese, durando de 15 minutos a 1 hora, seguida de uma fase febril, com uma temperatura basal que pode atingir 41°C ou mais (NEVES, 2007).

Depois de um período de duas a seis horas, tem-se a cessação da febre e o indivíduo relata um quadro de sudorese e fraqueza intensa. Após algumas horas, os sintomas desaparecem e o paciente tem a sensação de melhora (NEVES, 2007).

A periodicidade dos sintomas está diretamente relacionada com o tempo de duração dos ciclos eritrocitários de cada espécie: 48 horas para *P. vivax*, *P. ovale* e *P. falciparum* (caracterizando uma malária terçã) e 72 horas para o *P. malariae* (tendo uma malária quartã) (NEVES, 2007).

4.5 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS PARA MALÁRIA

Dentro do campo da saúde pública, as vacinas constituem grandes triunfos para erradicar ou minimizar doenças endêmicas, contribuindo para o bem-estar da população. No caso da malária, existem três estágios que as vacinas em desenvolvimento devem atingir: estágio pré-eritrocitário, eritrocitário e bloqueadores de transmissão vetorial (Figura 3) (FRIMPONG *et. al*, 2018).

O estágio pré-eritrocitário ocorre quando os esporozoítos viajam pela corrente sanguínea e vão para o fígado, infectando os hepatócitos para realizarem a esquizogonia, que é a fase de alta multiplicação que precede a invasão dos glóbulos vermelhos. O principal objetivo dos potenciais imunizantes para essa fase, é inibir a infecção dos hepatócitos através de mecanismos de proteção que envolvem a produção de anticorpos anti-esporozoítos e de células T citotóxicas, que destroem as células hepáticas infectadas (FRIMPONG, *et. al*, 2018).

Para esse estágio, a vacina mais promissora é a RTS,S, que foi liberada para uso emergencial pela OMS em 2021 porém, existem outras potenciais candidatas vacinais como PfSPZ (esporozoíto inteiro), PfSPZ-CVac (com quimioprofilaxia) e PfSPZ-GAP (parasito geneticamente atenuado) (FRIMPONG *et. al*, 2018).

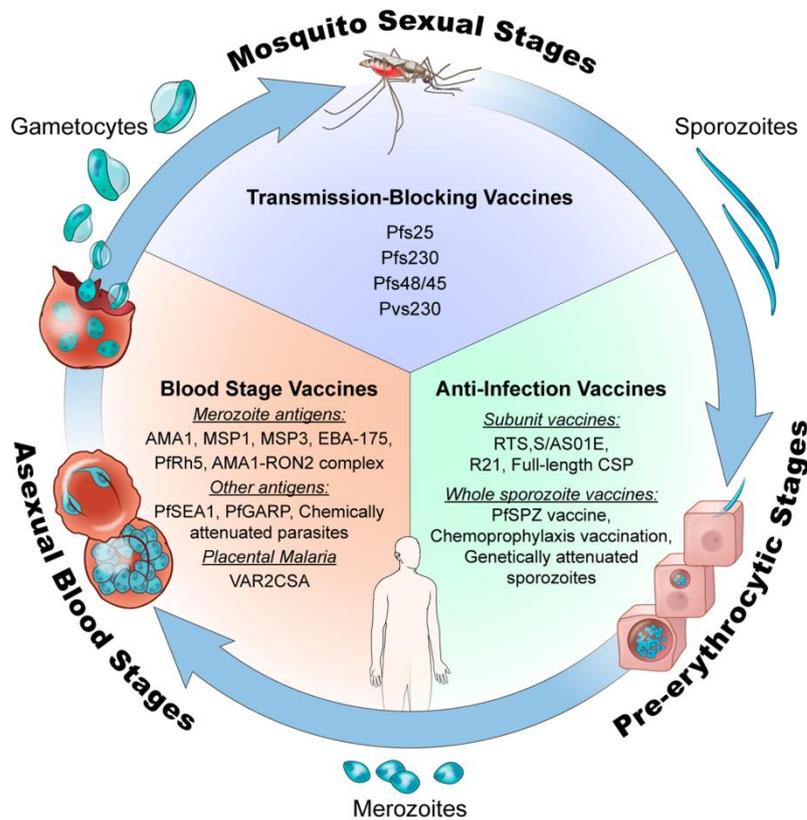
Já para o estágio eritrocitário, a finalidade é provocar uma resposta imune que bloqueie ou limite a invasão das hemácias pelos merozoítos, utilizando como componente principal a proteína de superfície do parasito, como as proteínas de superfície de merozoíto, antígeno de membrana apical 1 (AMA 1) e a proteína homóloga ao reticulócito. As principais vacinas para esse estágio são a PfRH5, AMA-1/RON2, VAR2CSA (malária placentária), entre outras (FRIMPONG *et al*, 2018).

Apesar dessas proteínas utilizadas serem altamente imunogênicas e promissoras para a produção de vacinas, a maioria desses antígenos também são altamente polimórficos, induzindo respostas específicas de antígenos e cepas de parasitos. Por outro lado, as proteínas Rh (proteínas homólogas aos reticulócitos) apresentam alto nível de conservação em sua sequência, mas em contra partida, tendem a ser menos imunogênicas (FRIMPONG *et. al*,2018).

O terceiro alvo das vacinas são as formas parasitárias que se encontram no vetor, ou seja, os gametócitos. A vacina bloqueadora de transmissão vetorial (TBV) visa a interrupção da transmissão do parasito entre humanos e o mosquito vetor por meio da resposta imune do hospedeiro às proteínas direcionadas ao parasito, como Pfs230, Pfs25, Pfs45, etc. Dentre as

principais candidatas a TBV, apenas a Pfs230 e a Pfs25 foram submetidas a ensaios clínicos em humanos (FRIMPONG *et.al*, 2018).

Figura 3: Estágios do ciclo de vida do *Plasmodium spp* e antígenos candidatos a vacinas que visam cada estágio



Fonte: DUFFY *et. al*, 2020 (Adaptado do artigo)

Estágio pré-eritrocitário

- **Vacina RTS,S**

Estudos de genoma e proteoma desenvolvidos em 2002 pelo pesquisador Doolan, identificou cerca de 16 proteínas antigênicas pré-eritrocitárias reconhecidas através de voluntários que foram imunizados com esporozoítos de *P. falciparum* atenuados por radiação, servindo como um estudo prévio para que Kappe identificasse 25 genes expressos em estágio pré-eritrocitário, dentre eles os conhecidos CSP (Proteína Circunsporozoíta) e TRAP (Proteína Adesiva relacionada à Trombospodina), através de transcriptômica (BETTENCOURT, 2020).

A CSP foi o primeiro antígeno a ser descrito na literatura por conferir uma proteção no nível pré-eritrocitário, sendo uma proteína expressa predominantemente pelos esporozoítos (BETTENCOURT, 2020). O antígeno é um dos componentes da vacina MosquirixTM

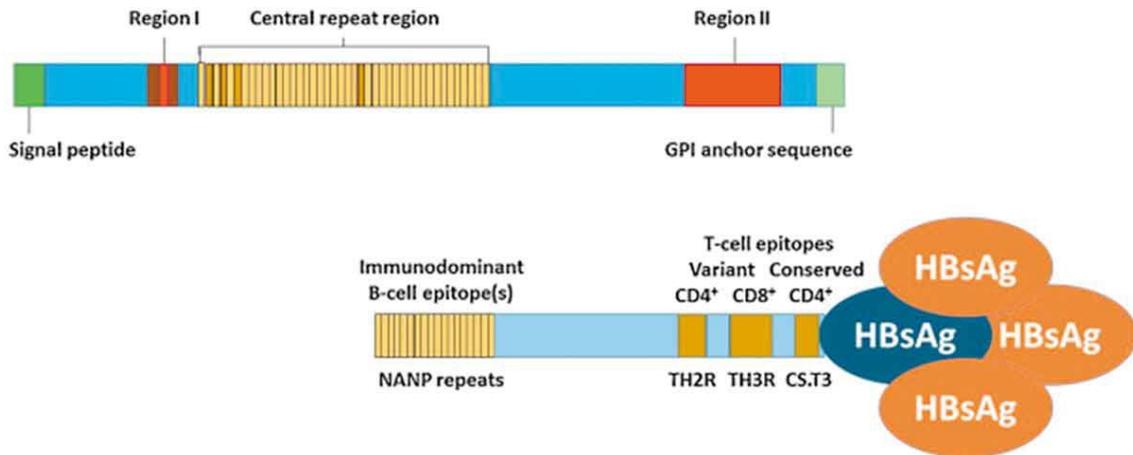
(RTS,S/AS01), que também apresenta na composição 19 repetições da região NANP (região central composta pelos aminoácidos Asn-Ala-Asn-Pro [Aspargina-Alanina-Aspargina-Prolina]) e regiões C-terminais (PfCSP 3D7), que são expressos em antígeno de superfície de partículas semelhantes a vírus da hepatite B (HBsAg-VLP “*virus-like particle*”), formulados com o adjuvante AS01 (BETTENCOURT, 2020; NOE *et. al*, 2021; DATOO *et. al*, 2021)).

A vacina RTS,S tem como alvo principal a proteína circunsporozoíta (CSP) do *Plasmodium falciparum*, inibindo assim, a infecção dos hepatócitos pelos esporozoítos, sendo considerada uma vacina pré-eritrocitária (LAURENS, 2019). O imunizante Mosquirix™ (nome comercial da RTS,S/AS01) vem sendo desenvolvido desde 1987 pela GlaxoSmithKline (GSK) em colaboração com o Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), onde na época tentaram produzir uma vacina baseada no uso de esporozoítos atenuados por radiação, pois protegiam contra a infecção da malária (LAURENS, 2019).

O grupo GSK utilizando a experiência adquirida na produção da vacina *Energix-B*™ contra a hepatite B, usaram o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) como uma matriz transportadora para a região central de repetição (NANP) da CSP, adicionando a região terminal C a matriz, já que essa região contém epítomos de células T e B, baseados na cepa de *P. falciparum* NF54 (LAURENS, 2019).

Dessa forma, foi criada então a vacina RTS,S, onde o “R” representa a região de repetição central, sendo uma única cadeia polipeptídica que corresponde a uma sequência de aminoácidos NANP de tetrapeptídeos repetidos altamente conservados; o “T” representa os epítomos imunodominantes de linfócitos TCD4 e TCD8 (Th2R e Th3R). Estes peptídeos imunodominantes foram combinados geneticamente e fundidos a porção N-terminal do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), enquanto que o “S” representa as partículas semelhantes a vírus de hepatite B (HBsAg-VLP) que expressam em sua superfície a proteína circunsporozoíta (CSP) que é coexpressa em células de levedura. Já uma segunda porção que é denominada “S”, é o antígeno HBs não fundido a matriz que se funde espontaneamente, dando origem a RTS,S (Figura 4) (LAURENS, 2019).

Figura 4: Representação gráfica das estruturas circunsporozoítas (CSP) e da RTS,S



Fonte: LAURENS, 2019 (Adaptado do artigo)

A CSP é composta por quatro regiões, onde a Região N-terminal contém uma sequência peptídica de sinal; a Região I apresenta um sítio de clivagem proteolítica de cinco aminoácidos (KLKQP) conservados, que se ligam a proteoglicanos de sulfato de heparina (que estão presentes na superfície celular de tecidos como os hepatócitos, favorecendo a aderência da proteína à célula); a Região Central que contém a sequência de repetição de quatro aminoácidos (NANP/NVDP), e por fim, a Região C-terminal que contém a região II (que apresenta um domínio do tipo trombospondina (TSP), que é uma glicoproteína) e uma sequência de glicolípideos âncoras, que são as GPIs (glicosilfosfatidilinositol canônica) (LAURENS, 2019).

Para a composição da vacina, foram utilizadas apenas as últimas 18 repetições das sequências de aminoácidos NANP e a Região C-terminal, que corresponde a sequência de glicolípideos âncoras (GPI), que auxiliam na ancoragem de diversas moléculas. O antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) se automonta em partículas semelhantes a vírus (VLP- *virus like particle*), sendo geneticamente fundidos a CSP, servindo como transportador dessa proteína (LAURENS, 2019).

A porção da Região C-terminal da CSP contém três epítomos de células T conhecidos: (1) epítomo de célula TCD4+ (TH2R); (2) epítomo de célula TCD8+ e (3) epítomo de célula TCD4+ “universal” conservado (CS.T3). Já a porção sequencial de aminoácidos NANP apresenta epítomos imunodominantes de células B (LAURENS, 2019).

Os componentes proteicos da vacina são expressos em células de levedura, sendo utilizada a *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas, que são fundidas espontaneamente em partículas semelhantes a vírus (HBsAg-VLP) que transporta a CSP em

sua superfície. O adjuvante usado na composição da vacina é o AS01, produzido pela GSK, que contém os imunostimulantes QS-21 (saponina extraída da casca da árvore *Quillaja saponaria*) e MPL (3-*O*-desacil-4'-monofosforil lipídio A), que são adjuvantes formulados à base de lipossomas (pequenas vesículas) (LAURENS, 2019).

Nos últimos 15 anos, vários ensaios clínicos de fase II e III foram feitos em áreas endêmicas para a malária, indicando que vacina RTS,S, quando aplicada em crianças de 6 a 12 semanas, e de 5 a 7 meses de idade, induz uma resposta imunológica protetora capaz de neutralizar a infecção por esporozoítos ou de atenuar a gravidade clínica da doença (ZAVALA, 2022).

Um ensaio clínico de fase III realizado em diferentes áreas endêmicas da África Subsaariana, revelou que a proteção contra a doença diminuiu para 28% em crianças de 5 a 17 anos após a última dose do imunizante, para 9% em crianças de 1 a 5 anos e para 11% para crianças de 6 a 12 semanas de idade, ressaltando que o efeito protetor da vacina é de curta duração e que parece depender da intensidade da transmissão em diferentes áreas endêmicas. Essa proteção de curta duração acontece devido aos níveis reduzidos de anticorpos anti-CSP, indicando que a proteção duradora depende de altos níveis desses anticorpos circulantes (ZAVALA, 2022).

O perfil de imunogenicidade da RTS,S vem sendo amplamente estudado, porém já é possível constatar que os títulos de anticorpos anti-CSP contra a região de repetição NANP e respostas de células TCD4+ aumentaram após a imunização e podem estar relacionadas com a proteção, reduzindo de forma significativa o risco de malária clínica (LAURENS, 2019).

Um estudo de fase III duplo-cego, controlado individualmente e randomizado, foi feito para avaliar a eficácia, segurança e imunogenicidade da vacina entre 2009 e 2014, ressaltou que a RTS,S/AS01 foi mais imunogênica em crianças de 5 a 17 meses (apresentando altos títulos de anticorpos anti-CSP) do que naquelas de 6 a 12 semanas de idade. Crianças portadoras de HIV apresentaram uma redução da imunogenicidade (WHITE *et. al.*, 2015).

Segundo o estudo, a redução dos níveis de anticorpos anti-CSP podem estar relacionados com variáveis como intensidade da transmissão, sexo do indivíduo, parto prematuro, baixo peso, portadores de HIV e casos anteriores de malária clínica. A dinâmica dos títulos de anticorpos anti-CSP após a vacinação primária e após a dose de reforço é bem descrita por um modelo exponencial bifásico (Figura 5 a-d), onde em crianças de 6 a 12 semanas estima-se que 7% da resposta seja de longa duração após a vacinação primária, aumentando para 21% após a dose de reforço (WHITE *et. al.*, 2015).

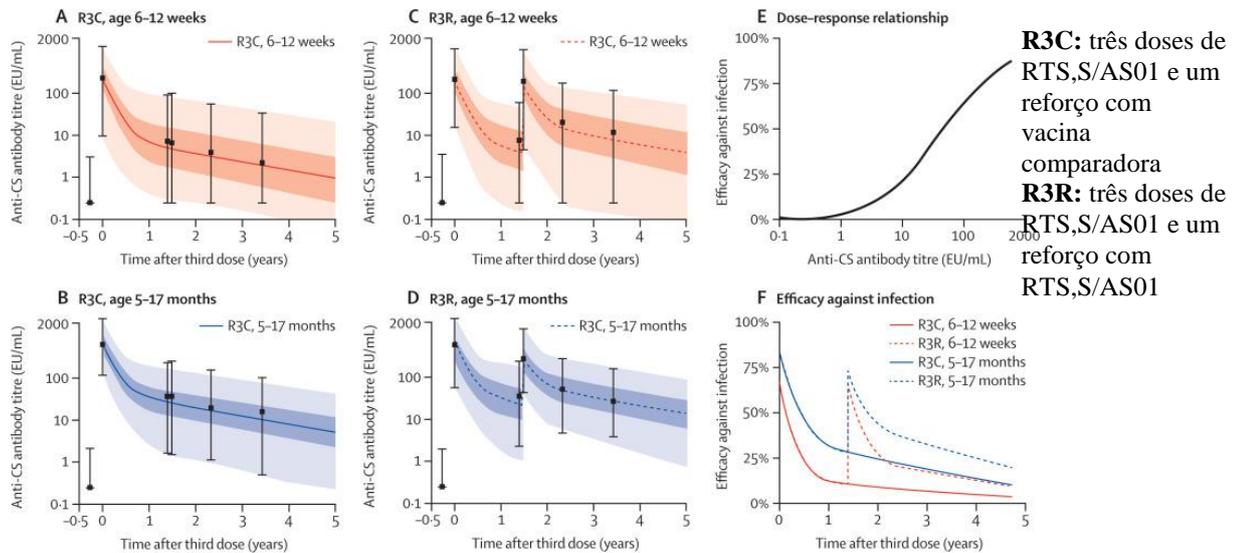
Já em crianças de 5 a 17 meses, estima-se que 12% da resposta imunológica seja de longa duração após a vacinação primária, aumentando para 30% após a dose de reforço. No caso da relação dose-resposta, é possível concluir que quanto mais alto são os níveis de anticorpos anti-CSP circulantes (cerca de 121 EU/mL), melhor é a resolução da infecção, prevenindo 50% das infecções (Figura 5 e). O estudo também demonstra que a imunogenicidade aumenta com um esquema vacinal de três doses (0, 1 e 2 meses) e uma dose de reforço no mês 18, em crianças de 5 a 17 meses (WHITE *et. al*, 2015).

Estima-se que em crianças de 5 a 17 meses, a eficácia contra a doença começa em 74% e diminui para 28% aos 12 meses, e cai para 9% após os 5 anos de idade. Uma dose de reforço aos 18 meses aumenta a eficácia da vacina para 59%, resultando em 17% de eficácia aos 5 anos. Nas crianças de 6 a 12 semanas, a eficácia contra a infecção foi estimada em 63% e diminui para 11% aos 12 meses e para 3% após os 5 anos. Uma dose de reforço aos 18 meses aumenta a eficácia para 58%, resultando em 8% de eficácia em 5 anos (WHITE *et. al*, 2015).

O rápido declínio dos anticorpos anti-CSP em todas faixas etárias foi caracterizado por uma meia-vida rápida, de aproximadamente 40 dias, seguida por uma perda mais gradual de anticorpos induzidos pela vacina, que ocorre no período de 600 dias (Figura 5 f) (LAURENS, 2019).

No entanto, a vacina RTS,S não é capaz de induzir uma resposta imune do tipo TCD8+, que é uma resposta que tem um papel crítico na proteção contra a malária. Um trabalho desenvolvido no ano de 2017 pelo pesquisador Dmitri Kazmin e colaboradores, descreveu uma abordagem diferente de vacinação, onde em um primeiro estudo foi mantido as três doses de RTS,S, porém a dose de reforço aplicada nos participantes foi um imunizante com adenovírus recombinante 35 (Ad35) expressando o antígeno CSP, e no segundo estudo foi aplicado o imunizante com adenovírus recombinante 35 como dose primária, e as outras doses foram de RTS,S, a fim de revelar informações importantes sobre as respostas imunológicas frente à vacinação e sua imunidade protetora contra a malária (KAZMIN *et. al*, 2017).

Figura 5: Dinâmica dos anticorpos anti-CSP e sua associação contra a infecção

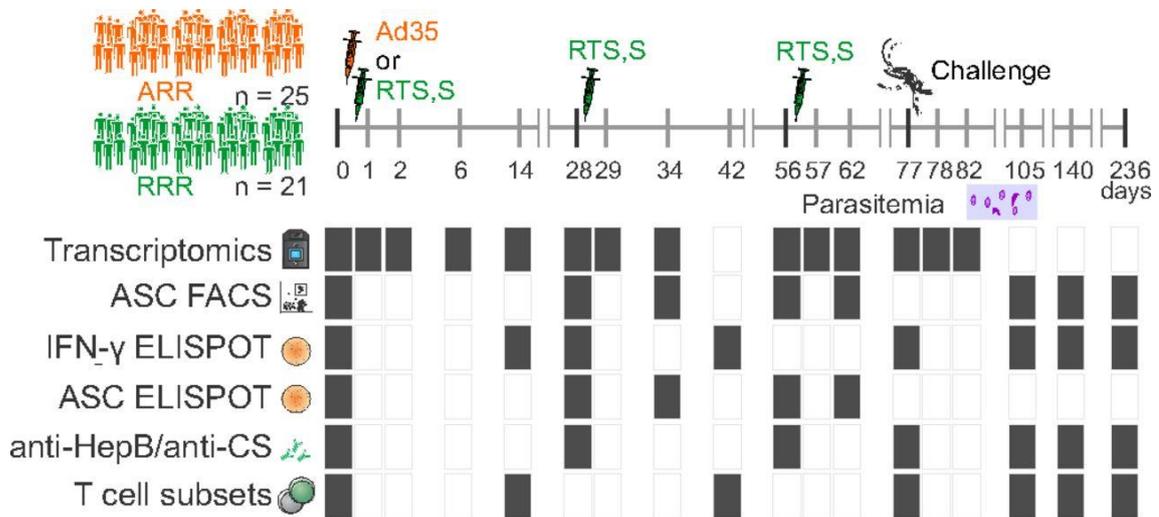


Fonte: WHITE *et. al.*, 2015 (Adaptado do artigo)

O ensaio clínico foi realizado no Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), que contou com 46 voluntários saudáveis e virgens para a malária, sendo divididos em dois grupos de estudo, a fim de avaliar a eficácia e proteção das vacinas RTS,S e da AdVac (adenovírus recombinante 35 expressando CSP) como prime-boost. O grupo 1 (referido como ARR) é composto por 25 voluntários que receberam a vacina AdVac, como imunização primária e seguida de duas doses da vacina RTS,S, enquanto que o grupo 2 é composto por 21 indivíduos que receberam três doses de RTS,S (referido como RRR) (KAZMIN *et. al.*, 2017).

Os participantes de ambos os grupos de estudo foram vacinados em intervalos de 28 dias, e após 21 dias da imunização final foram submetidos a um desafio que consistia em infectá-los com a malária de maneira controlada. A parasitemia foi monitorada por 28 dias, enquanto que o monitoramento da resposta imune perdurou por 159 dias após o desafio (Figura 6). O estudo também contou com 12 indivíduos não vacinados para serem o grupo controle (KAZMIN *et. al.*, 2017).

Figura 6: Design do estudo desenvolvido de RTS,S com a AdVac

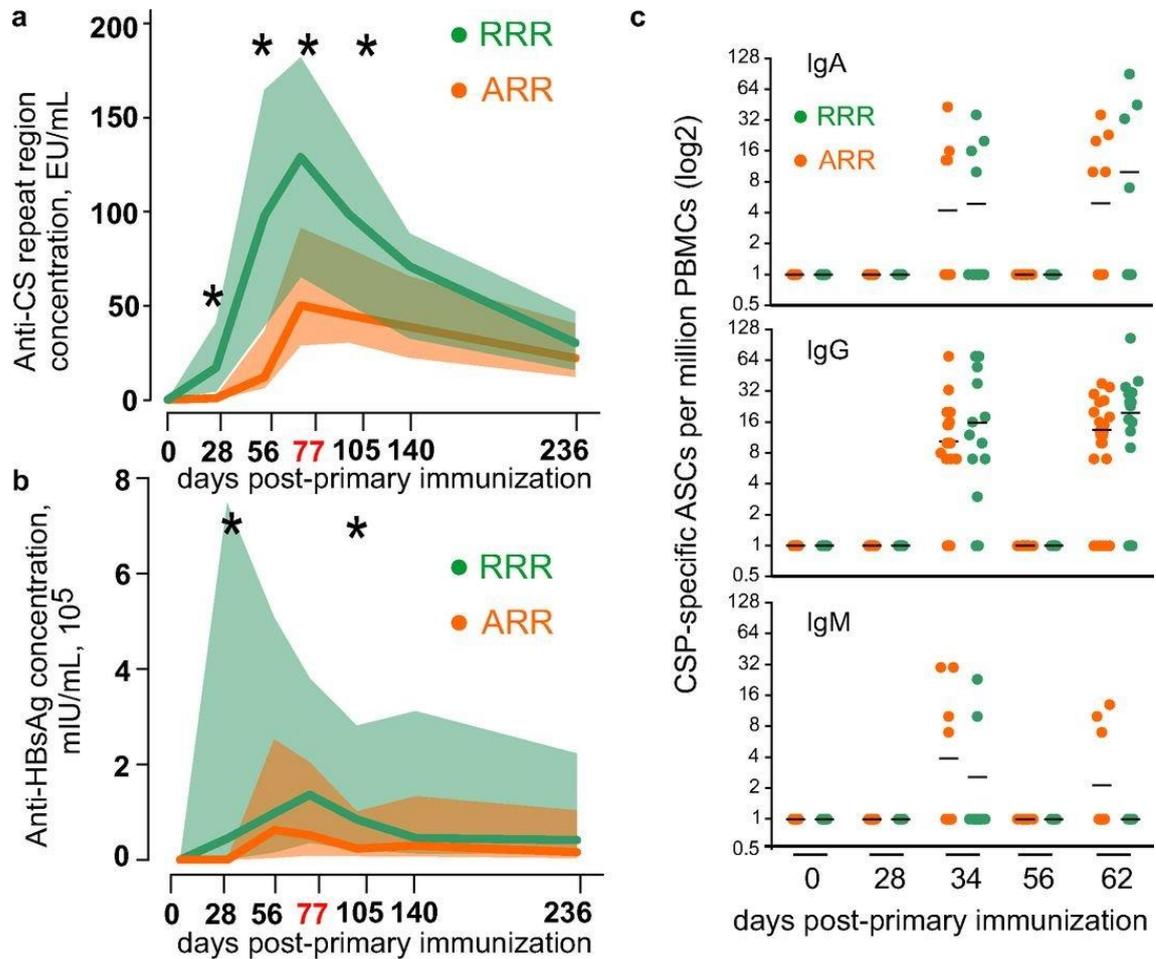


Fonte: KAZMIN *et. al*, 2017 (Adaptado do artigo)

O regime vacinal RRR (com RTS,S) induziu títulos significativos de anticorpos anti-CSP quando comparados com o regime ARR (com AdVac) (Figura 7 a). Duas doses de RTS,S após a AdVac não foram capazes de induzir uma magnitude tão elevada de anticorpos como as doses aplicadas de RTS,S no grupo RRR, ressaltando que a vacinação em RRR induziu uma maior produção de anticorpos anti-CSP do que no grupo ARR (Figura 7 a) (KAZMIN *et. al*, 2017).

Também foi avaliado o número de células secretoras de anticorpos (ASCs) induzidas após a imunização, usando a técnica ELISPOT (que é um imunoenensaio que mede quantitativamente a frequência de citocinas secretadas por essas células), onde se observou que ambas as vacinas induziram a mesma quantidade de anticorpos anti-CSP específicos (Figura 7 c). Constatou-se também, que os grupos que receberam as três doses de RTS,S (RRR) apresentaram altos títulos de anticorpos contra o HBsAg, que é a proteína fundida com a CSP (Figura 7 b) (KAZMIN *et.al*, 2017).

Figura 7: Resposta imune desencadeada após as vacinações com RTS,S e AdVac



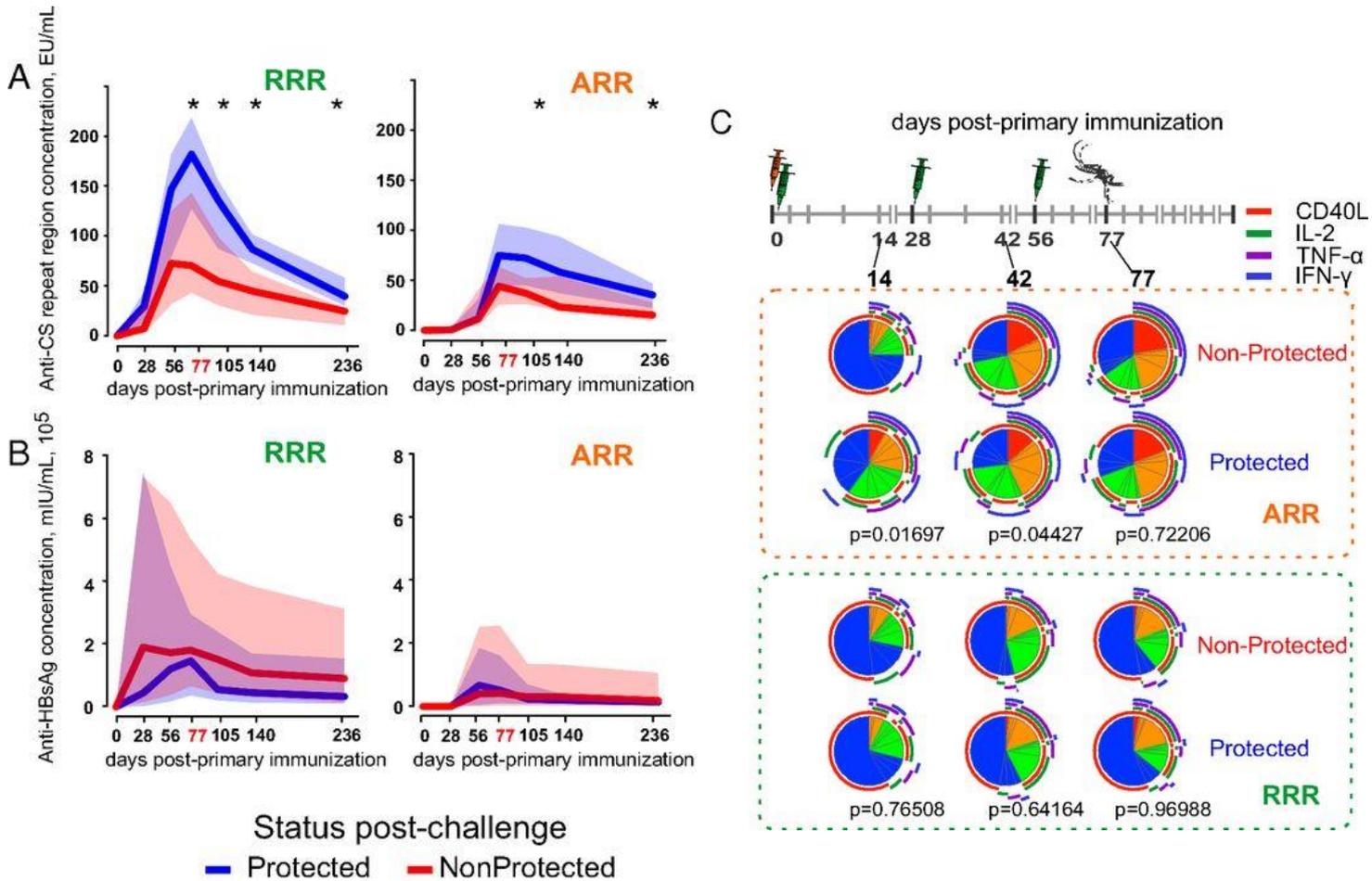
Fonte: KAZMIN *et. al*, 2017 (Adaptado do artigo)

As respostas imunes do tipo TCD4⁺ e TCD8⁺ específicas para a CSP após a vacinação também foi verificada, tendo uma indução muito baixa de resposta TCD8⁺ pelo grupo RRR e uma indução modesta pelo grupo ARR. Em paralelo, houve uma indução significativa de resposta TCD4⁺ específicas para CSP pelo grupo ARR, e em um grau muito fraco pelo grupo RRR (KAZMIN *et. al*, 2017).

Conforme relatado, os indivíduos do grupo de estudo RRR (vacina RTS,S) que não desenvolveram a parasitemia dentro de 28 dias após o desafio, foram denominados como “protegidos” por apresentarem uma maior concentração de anticorpos anti-CSP (isotipo IgG) no momento do desafio (Figura 8 a). As concentrações de anticorpos anti-HBsAg não foram tão diferentes entre indivíduos protegidos e não protegidos (Figura 8 b). No grupo ARR que foi vacinado com a AdVac, teve-se uma maior frequência de células TCD4⁺ polifuncionais específicas para CSP, onde essas células produziram diversos marcadores como CD40L, IL-2, TNF- α e IFN- γ , que foram monitoradas pela análise de FACS, se correlacionando com a

proteção. A frequência dessas células T polifuncionais foi semelhante entre os grupos protegidos (vacinados) e não protegidos (não vacinados) (Figura 8 c) (KAZMIN *et. al*, 2017).

Figura 8: Associações sorológicas e celulares de proteção após a vacinação



Fonte: KAZMIN *et. al*, 2017 (Adaptado do artigo)

Os estudos de implementação da RTS,S/AS01 em andamento fornecerão muitas informações práticas sobre a viabilidade da vacina em áreas endêmicas, já que a OMS (Organização Mundial da Saúde) liberou seu uso para uso emergencial no ano de 2021. Esquemas de dosagens alternativos para a RTS,S e uso de adjuvantes alternativos estão sendo estudados, a fim de se aumentar os títulos e duração dos anticorpos anti-CSP, sem aumentar o risco de convulsão febril em crianças (LAURENS, 2019).

- **Vacina R21**

A vacina contra a malária mais avançada no momento nos ensaios clínicos é a RTS,S/AS01, que se baseia em partículas da proteína circunsporozoíta (CSP) fundidas na proteína HBsAg. Quando administrada com o adjuvante AS01 é altamente imunogênica, porém em estudos de fase III feitos recentemente foi verificado que a vacina foi parcialmente protetora (COLLINS *et.al*, 2021).

Durante um estudo realizado no ano de 2021, observou-se que 3 doses administradas da RTS,S induziram uma eficácia protetora contra a malária de 46% em crianças de 5 a 17 meses, e de 27% em bebês de 6 a 12 semanas. Essa proteção foi diminuindo durante o acompanhamento de 38 a 48 meses, e no final do estudo foi demonstrado que a imunidade foi de 28,3% para as crianças e de 18,3% para os lactentes (COLLINS *et. al*, 2021).

Visando aumentar a eficácia protetora contra a malária, foi desenvolvida uma vacina de próxima geração baseada na CSP fundida na proteína de superfície da hepatite B (HBsAg), sendo essa proteína uma matriz transportadora da CSP, recebendo o nome de R21. Esta se difere da RTS,S por conter apenas a proteína de fusão CSP-HBsAg, enquanto que a RTS,S tem um excesso molar de quatro vezes mais de HBsAg. Portanto, a R21 apresenta maior expressão da CSP (COLLINS *et. al*, 2021).

As vacinas anti-esporozoítas (anti-CSP) são consideradas “vazantes” mesmo apresentando níveis altos de anticorpos, pois muitas vezes o sistema imune sofre uma evasão por apenas um único esporozoíta, resultando em uma infecção no estágio sanguíneo, não conferindo uma proteção estéril completa. Portanto, é possível que uma estratégia de vacinação heteróloga e multicompetente seja necessária, a fim de alcançar altos níveis de proteção (COLLINS *et. al*, 2021).

Um ensaio clínico feito por Collins e colaboradores em 2021, avaliou a vacina R21 combinada com outro imunizante em estágio pré-eritrocitário clinicamente avançado, que se baseia em vetor adenoviral símio (ChAd63) com vírus *vaccínia Ankara* modificado (MVA) que codifica ME.TRAP (cadeia de epítomos múltiplos + proteína de adesão relacionada à trombospondina), que são moléculas que induzem as células T (COLLINS *et. al* 2017; 2021).

A vacina R21 de próxima geração é composta por uma porção C-terminal da proteína circunsporozoíta (CSP) da estirpe NF54 de *Plasmodium falciparum*, sendo fundida com a porção N-terminal da proteína de superfície HBsAg, e pela porção central, que contém 19 repetições da sequência de aminoácidos NANP, que são conhecidos por terem epítomos dominantes de células B, enquanto que a região C-terminal contém alguns epítomos

dominantes de células T (Figura 9 a), sendo essa proteína de fusão R21 expressa na levedura *Pichia pastoris* (COLLINS *et. al.*, 2017).

As partículas proteicas de R21 têm aproximadamente 22 nm de tamanho, podendo ser vistas em microscopia eletrônica (Figura 9 b). A realização de Western Blot utilizando anticorpos anti-CSP com a utilização do sistema eletroforético descontínuo (eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida) e coloração de prata, demonstraram a presença de monômeros e dímeros de CSP-HBsAg que indicam que as partículas utilizadas são puras (Figura 9 e), sendo isso confirmado por cromatografia de exclusão de tamanho analítico (Figura 9 d) (COLLINS *et. al.*, 2017).

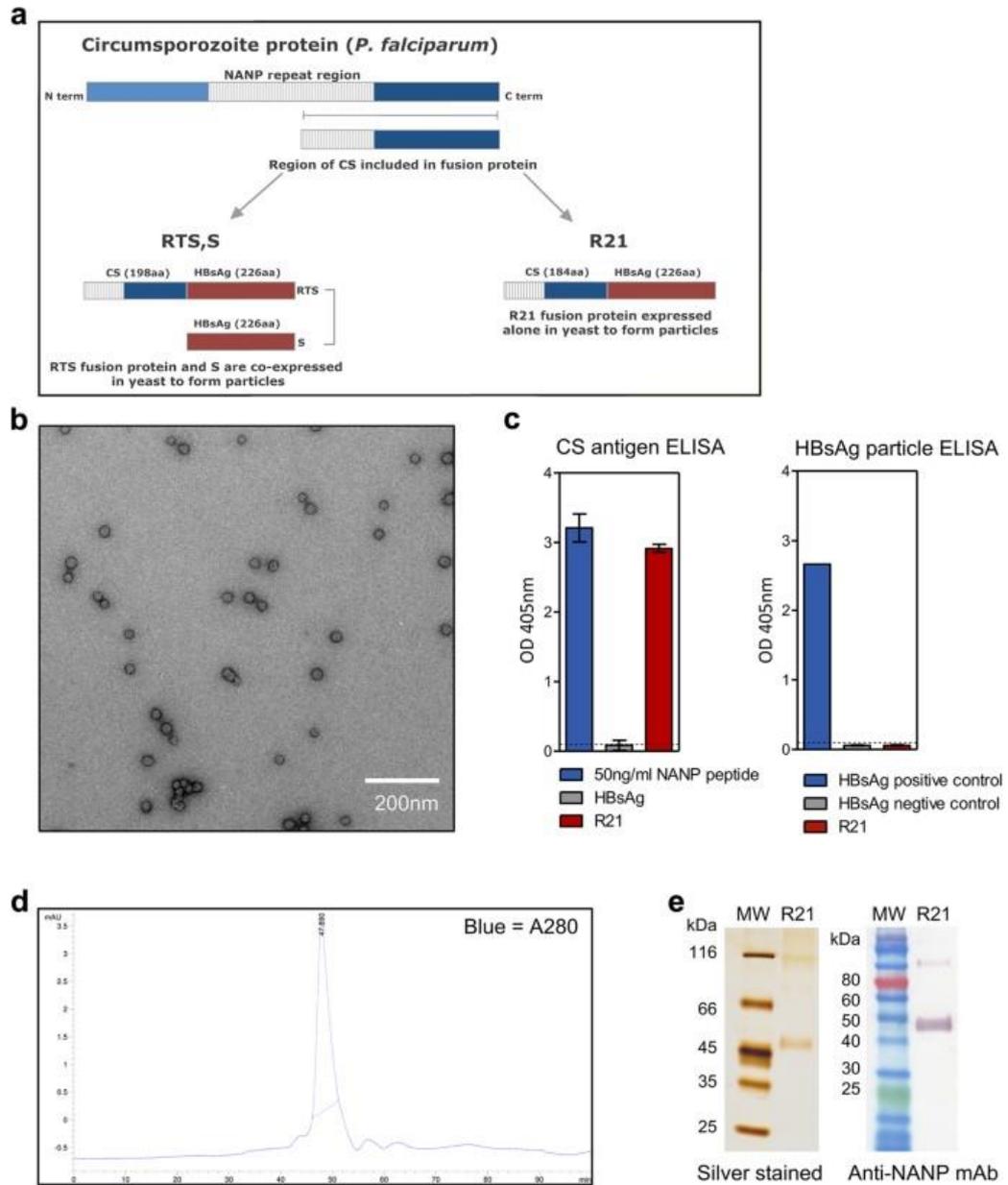
A presença da região de repetição NANP da CSP na superfície da R21 foi confirmada em ELISA, tendo uma alta concentração, enquanto que HBsAg está relativamente inacessível na superfície da R21, como sugerido por um sinal mínimo em ELISA (Figura 9 c) (COLLINS *et. al.*, 2017).

Para verificação de imunogenicidade da vacina foram utilizados grupos de camundongos BALB/c que foram imunizados com 3 doses de 0,5 µg de R21 formulada com adjuvante, que no caso foram usados o Alhydrogel (à base de hidróxido de alumínio), Carbopol (carbômero polianiónico), Abisco-100 (à base de saponina) e AddaVax (emulsão de óleo em água à base de esqualeno) (COLLINS *et. al.*, 2017).

Todos os camundongos desenvolveram altos títulos de anticorpos do isotipo IgG para a região de repetição NANP, porém os grupos que receberam a R21+Abisco-100 e R21+AddaVax, desenvolveram as respostas imunológicas mais altas (Figura 10 a). As respostas de células T também foram avaliadas após a imunização final, onde os grupos que receberam R21+Abisco-100 ou R21+Abisco-100 e AddaVax, tiveram uma alta indução de células T produtoras de IFN γ (Figura 10 b) (COLLINS *et. al.*, 2017).

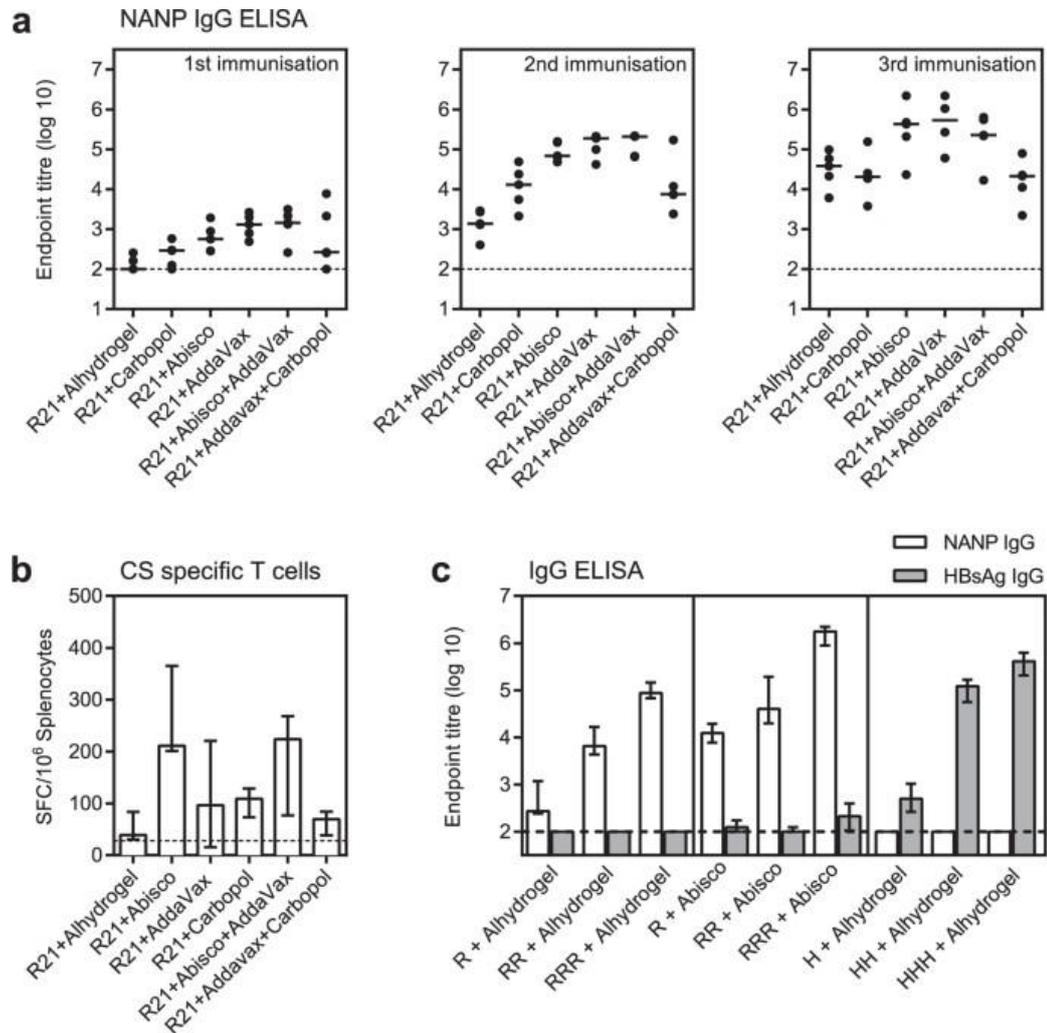
Para determinar se a R21 induzia algum tipo de resposta imune contra o HBsAg presente na vacina, grupos de camundongos BALB/c foram divididos em três grupos: (1) R21+Alhydrogel; (2) R21+Abisco-100 e (3) HBsAg+Alhydrogel. Como esperado, os anticorpos do isotipo IgG específicos para HBsAg foram detectados em todos os camundongos do grupo 3 que receberam as 3 doses do antígeno com o adjuvante. Já nos grupos 1 e 2 não foram detectados títulos de anticorpos anti-HBsAg, fornecendo evidências de que o HBsAg é inacessível na superfície da partícula R21 (Figura 10 c) (COLLINS *et. al.*, 2017).

Figura 9: Projeto e caracterização da vacina R21



Fonte: COLLINS *et. al.*, 2017 (Adaptado do artigo)

Figura 10: Imunogenicidade da vacina R21



Fonte: COLLINS *et. al.*, 2017 (Adaptado do artigo)

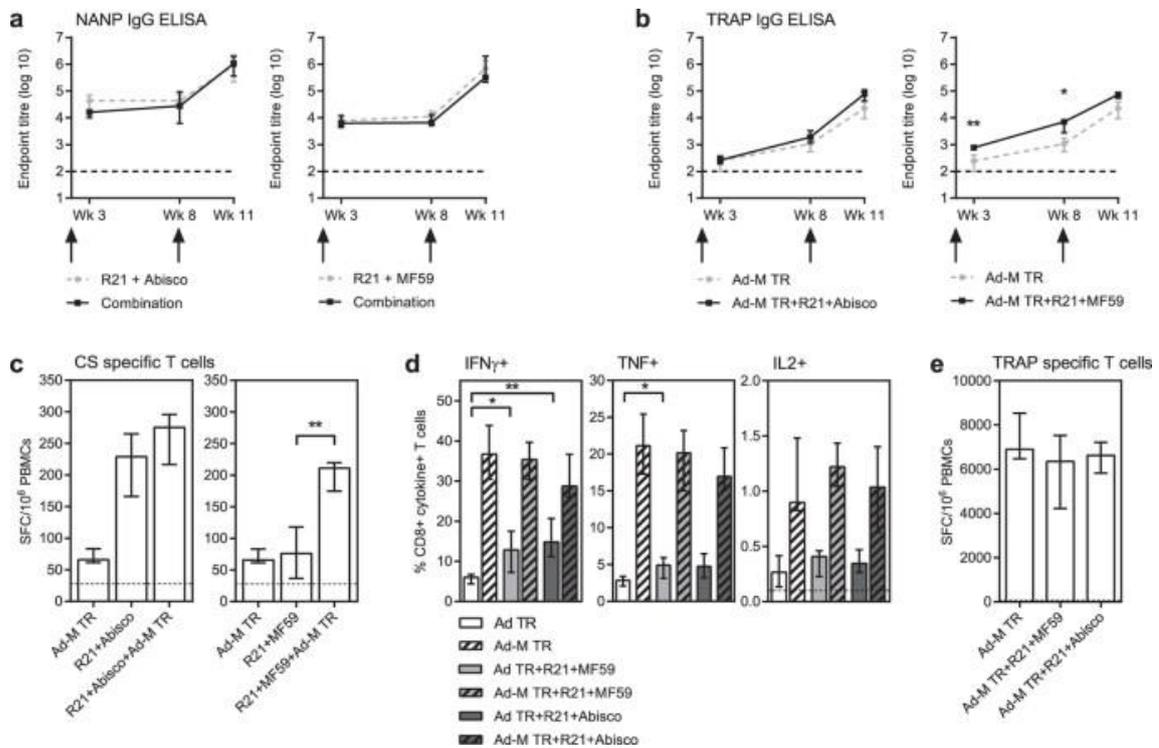
A administração da combinação entre R21+ adjuvante (Abisco-100 ou MF59) e o imunizante ChAd63-MVA ME-TRAP como prime-boost (primeira dose), com dose de reforço após 8 semanas, apresentou respostas medianas de anticorpos específicos para NANP, enquanto que resposta imune específica para CSP pela R21 não apresentou interferência (Figura 11 a). O grupo em que foi administrado apenas a ChAd63-MVA ME-TRAP teve-se baixos níveis de IgG específicas para a região de repetição NANP e de células T específicas para CSP. Já no grupo onde teve a coadministração da vacina de vetor viral com a R21, teve-se altos níveis de células T específicas para CSP (Figura 11 c) (COLLINS *et. al.*, 2017).

A coadministração desses dois imunizantes após duas semanas gerou uma frequência mais alta de células TCD8+ e da citocina IFN- γ . A mesma tendência foi observada nos níveis de células TCD8+ e TNF, e TCD8+ e IL-2 (Figura 11 d). Mesmo após a aplicação da dose de reforço com a vacina ChAd63-MVA ME-TRAP, não houve diferença significativa nos níveis

da resposta das células T detectadas em qualquer grupo após 3 semanas da dose de reforço (Figura 11 e) (COLLINS *et. al*, 2017).

A combinação das vacinas não reduziu a magnitude de anticorpos IgG específicos para a molécula TRAP (proteína de adesão relacionada à trombospondina) (Figura 11 b). Após a imunização de reforço, os títulos de anticorpos nos grupos que receberam a combinação vacinal foram aproximadamente três vezes maiores do que o grupo com apenas o regime de vetor viral. Outro ponto importante observado foi que a combinação vacinal gera uma tendência aumentada à indução de IgG específicas para a molécula TRAP (Figura 11 c) (COLLINS *et. al*, 2017).

Figura 11: R21 e imunogenicidade do vetor viral em regime de combinação



Fonte: COLLINS *et. al*, 2017 (Adaptado do artigo)

A R21 formulada com os adjuvantes Abisco-100 e Matrix-M que são à base de saponina, induziram níveis significativos de eficácia estéril contra o desafio com esporozoítos transgênicos. O nível de eficácia estéril foi de 100% quando os camundongos receberam a R21 + Abisco-100, e de 87,5% com a R21+ Matrix-M (Figura 12 a). Ambos os adjuvantes

são adequados para uso com a R21, já que não houve diferença no nível de IgG específicas para a região NANP e não houve redução na eficácia da vacina (Figura 12 b) (COLLINS *et. al*, 2017).

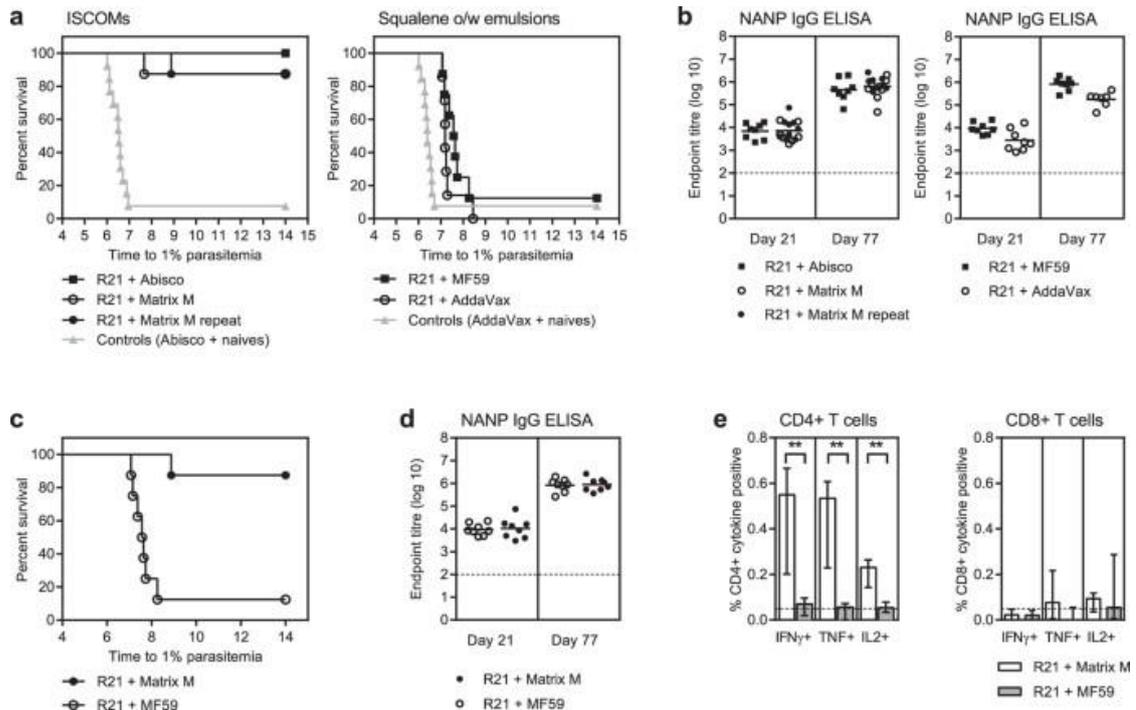
Outros dois adjuvantes foram utilizados na formulação com a R21, sendo o MF59 e o AddaVax, que são uma emulsão de óleo em água à base de esqualeno, onde ambos conseguiram induzir uma proteção parcial significativa após o desafio com esporozoítos transgênicos. A R21+ AddaVax não induziu proteção estéril em nenhum camundongo (0/7), porém foi capaz de atrasar o desenvolvimento da parasitemia no estágio sanguíneo de forma significativa. Em contrapartida, a associação de R21 com o MF59 apresentou uma proteção estéril de 12,5% nos camundongos vacinados (1/8) e retardou a parasitemia no estágio sanguíneo em 7 camundongos (Figura 12 a) (COLLINS *et. al*, 2017).

Apesar dos títulos de anticorpos anti-CSP serem elevados com ambas as formulações, a R21 com a AddaVax ou com o MF59 não se tem a indução de proteção estéril em mais do que um camundongo, não se tratando de adjuvantes com boa eficácia (Figura 12 b) (COLLINS *et. al*, 2017).

A formulação de R21 com o adjuvante Matrix-M produziu uma proteção estéril em 87,5% dos camundongos vacinados (7/8), enquanto que a R21 com o MF59 protegeu apenas 12,5% dos camundongos (1/8), constando que a R21/Matrix-M teve uma eficácia estéril superior (Figura 12 c), porém não houve diferença nos títulos de IgG específicos para a repetição de aminoácidos NANP antes e após o desafio para ambas as formulações (Figura 12 d) (COLLINS *et. al*, 2017).

Notavelmente, a quantidade de células TCD4+ específicas para CSP detectadas no sangue antes do desafio foram maiores no grupo com R21/Matrix-M do que com MF59, tendo uma imunização estéril, com produção das citocinas IFN, TNF + e IL-2+ por essa população de células (Figura 12 e). Os níveis de células TCD8+ também foram medidos e, como esperado foram baixos e não diferente entre os grupos com Matrix-M e MF59 (Figura 12 e) (COLLINS *et. al*, 2017).

Figura 12: Eficácia protetora da vacina R21



Fonte: COLLINS *et. al.*, 2017 (Adaptado do artigo)

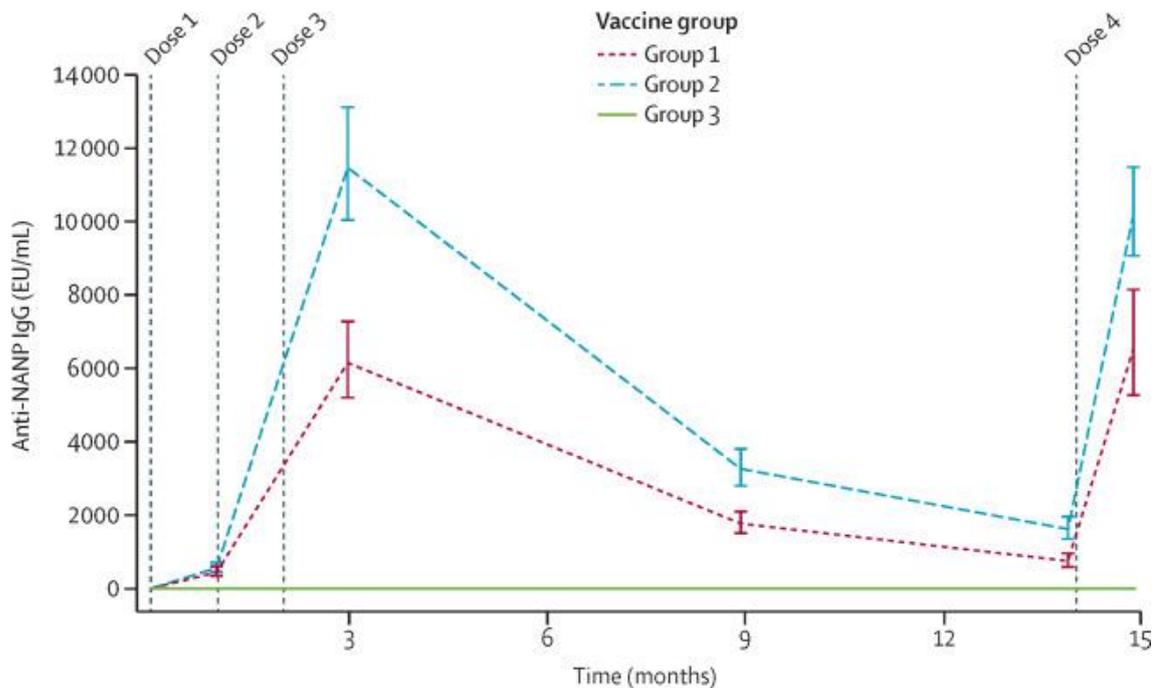
Como mostrado anteriormente, a R21 quando formulada com o adjuvante Matrix-M apresenta uma alta imunogenicidade, já que o adjuvante utilizado é à base de saponina, que estimula respostas imunes humoral e celular em ensaios clínicos de fase II a. Com a finalidade de verificar a segurança, imunogenicidade e eficácia da candidata à vacina, foi realizado um novo estudo de fase II b em Nanoro, Burkina Faso, com crianças de 5 a 17 meses (DATOO *et. al.*, 2021).

O estudo com 450 crianças foi randomizado, duplo-cego e controlado, sendo realizado no Institut de Recherche en Sciences de la Santé em Nanoro, Burkina Faso. Os participantes com idade entre 5 e 17 meses foram divididos em três grupos, onde o grupo 1 recebeu 3 doses de 5 μ g R21/25 μ g MM, o grupo 2 recebeu 3 doses de 5 μ g R21/50 μ g MM e o grupo 3, grupo controle, recebeu 3 doses de vacinas antirrábicas. As vacinas foram administradas antes do pico sazonal de transmissão da malária, com uma dose de reforço 12 meses após a terceira vacinação (DATOO *et. al.*, 2021).

No início do estudo, nenhum dos participantes tinha níveis detectáveis de anticorpos do tipo IgG para a região de repetição NANP. Após 28 dias da terceira dose da vacina, o grupo 1 atingiu uma quantidade de 6.133 EU/mL, enquanto que o grupo 2 que recebeu uma dose mais alta do adjuvante Matrix-M, o nível de anticorpos detectáveis foi de 11.438 EU/mL, sendo significativamente maior quando comparado com o grupo 1 que recebeu uma

dose menor do adjuvante. Os títulos de anticorpos anti-NANP caíram ao longo dos 12 meses, mas após a dose de reforço ambos os grupos 1 e 2, após 28 dias da vacinação, os anticorpos aumentaram para níveis semelhantes aos após da terceira vacinação (Figura 13) (DATOO *et.al*, 2021).

Figura 13: Respostas de anticorpos anti-NANP a R21/Matrix-M



Fonte: DATOO *et. al*, 2021 (Adaptado do artigo)

O estudo desenvolvido concluiu que a vacina R21/Matrix-M atinge a meta de eficácia especificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de 75% ou mais na população-alvo, ao longo de 12 meses de acompanhamento. Foi observado uma eficácia de 77% nos grupos onde as crianças receberam a R21 com a dose mais alta de adjuvante Matrix-M, tendo um aumento de 86% nos títulos de anticorpos para a região de repetição NANP da proteína circunsporozoíta (CSP) (Figura 13) (DATOO *et. al*, 2021).

Os eventos adversos foram menos frequentes com a R21/Matrix-M do que com a RTS,S/AS01, sendo relatado apenas dor e febre pelos grupos de estudo. Um estudo de fase III para a vacina está andamento em cinco locais africanos com alta transmissão de malária, com o objetivo de avaliar e licenciar uma vacina segura e de alta eficácia para reduzir a carga da doença (DATOO *et. al*, 2021).

Estágio eritrocitário

- **Vacina PfRH5**

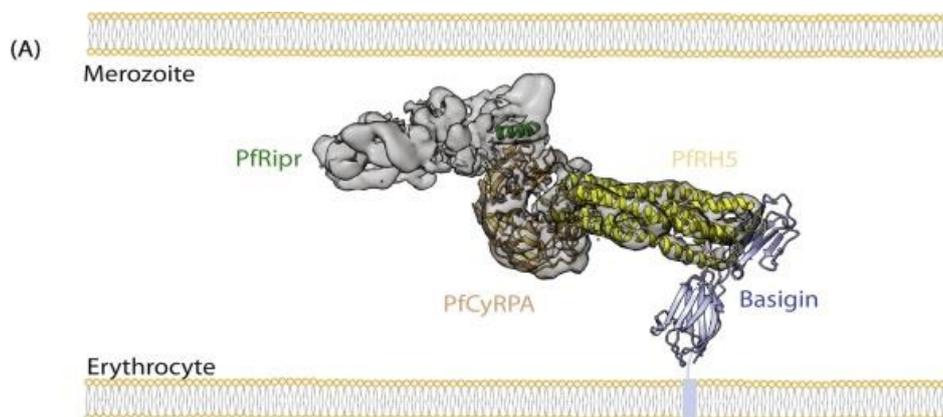
O estágio sanguíneo da malária ocorre quando os merozoítos invadem os eritrócitos e se multiplicam até que a célula se rompa, liberando milhares de merozítos na circulação sanguínea, ocorrendo assim, os sintomas clínicos da doença. Os merozoítos de *P. falciparum* podem invadir os eritrócitos através de duas vias principais: a via dependente do ácido siálico e as vias independentes do ácido siálico (ORD *et. al*, 2014).

A via dependente do ácido siálico contém os receptores de glicoforina (GP), que são as principais proteínas sialiladas presentes na superfície das hemácias, onde as adesinas do parasita se ligam, promovendo a invasão dos eritrócitos. Dentre os ligantes de ligação a eritrócitos (as adesinas) se destacam a EBA-175 e a PfRH1. Já a via independente do ácido siálico é composta pelas proteínas homólogas de ligação a reticulócitos (RH), sendo a RH2a, RH2b, RH4 e RH5 (ORD *et. al*, 2014).

O antígeno PfRH5 é essencial para a invasão das hemácias, já que ele se liga a proteína basigina, que atua como receptor presente nas hemácias, promovendo a ligação PfRH5-basigina, que culmina na invasão dos eritrócitos (ORD *et. al*, 2014).

Um estudo recentemente descrito por Ragotte e colaboradores (2020), mostrou que o complexo proteico PfRH5-PfCyRPA-PfRipr (RCR) presente na superfície dos merozoítos de *Plasmodium falciparum* que ajudam a se ligarem às hemácias, é um candidato promissor para uma vacina de próxima geração em estágio sanguíneo. O complexo RCR como é chamado, é descrito como um trímero proteico que se liga a proteína basigina que está presente nos eritrócitos, promovendo a invasão dos mesmos (Figura 14 a).

Figura 14: Ilustração do complexo RCR ligado à basigina



Fonte: RAGOTTE *et. al*, 2020 (Adaptado do artigo)

Atualmente o principal antígeno candidato a vacina de estágio sanguíneo é a proteína homóloga de ligação a reticulócitos 5 (PfRH5), que é expressa durante os estágios maduros dos esquizontes, se localizando nas róprias, que são organelas secretoras presentes nos protozoários. Trata-se de uma proteína indispensável para a invasão de eritrócitos humanos, sendo específica da espécie de *Plasmodium falciparum* (RAGOTTE *et. al*, 2020).

Nos humanos, a ligação da proteína PfRH5 à basigina desempenha um papel essencial na invasão, já que ela consegue deformar a membrana eritrocitária, formando um poro. A ligação da PfRH5+PfRipr à basigina é necessária para a indução de um pico de cálcio dentro do eritrócito, promovendo a invasão pelos merozoítos. Uma vez que esse pico de cálcio é inibido pelos anticorpos anti-PfRH5 ou anti-PfRipr, a entrada dos merozoítos é bloqueada (RAGOTTE *et. al*, 2020).

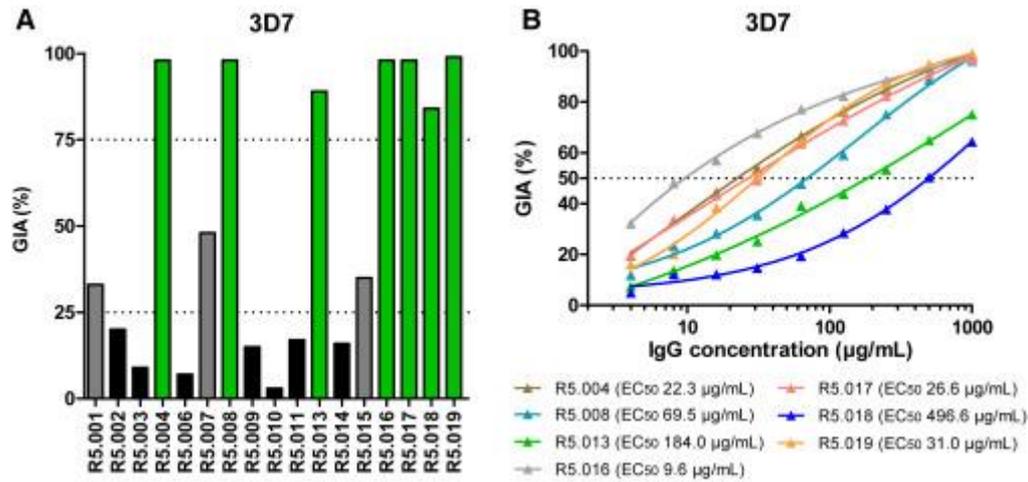
No atual momento, os anticorpos monoclonais anti-PfRH5 (mAbs) são os mais imunogênicos quando comparados com os outros antígenos dentro do complexo RCR. Em um ensaio clínico de fase I a, foi administrado uma vacina via intramuscular de adenovírus de chimpanzé recombinante do sorotipo 63 (ChAd63) expressando o antígeno PfRH5 completo (RAGOTTE *et. al*, 2020).

Os anticorpos monoclonais anti-PfRH5 produzidos foram isolados de plasmoblastos triados de células únicas de voluntários vacinados com a vacina usando vetor viral. Os genes responsáveis por codificar a região variável do anticorpo foram isolados e ampliados por PCR (Reação de Cadeia da Polimerase) e clonados em um pré-molde de IgG humano. Uma vez que os anticorpos monoclonais de cadeia pesada e cadeia leve foram produzidos, os mesmos são transferidos para células HEK293 (células embrionárias de rim humano). Os anticorpos monoclonais reconhecem prontamente com alta afinidade a proteína PfRH5 (ALANINE *et. al*, 2019).

A fim de caracterizar a capacidade dos anticorpos monoclonais humanos (mAbs) para bloquear a entrada de merozoítos nos eritrócitos, foi feita uma atividade de inibição de crescimento *in vitro* contra o clone 3D7 de *P. falciparum*. Os mAbs foram distribuídos em três categorias: “alta atividade inibitória” (acima de 75% - barra de cor verde), “baixa atividade inibitória” (entre 25 e 75% - barra de cor cinza) e “atividade inibitória negativa” (abaixo de 25% - barra de cor preta) (Figura 15 a), onde os mAbs R5.004, R5.008, R5.013, R5.016, R5.017, R5.018 e R5.019 apresentaram alta atividade (ALANINE *et. al*, 2019).

As linhagens de anticorpos monoclonais que apresentaram alta atividade inibitória foram a R5.016 e a R5.004, que tiveram valores de EC₅₀ em um sistema de diluição com IgG (Figura 15 b) (ALANINE *et. al*, 2019).

Figura 15: Propriedades inibitórias do crescimento de mAbs específicos para a PfrRH5



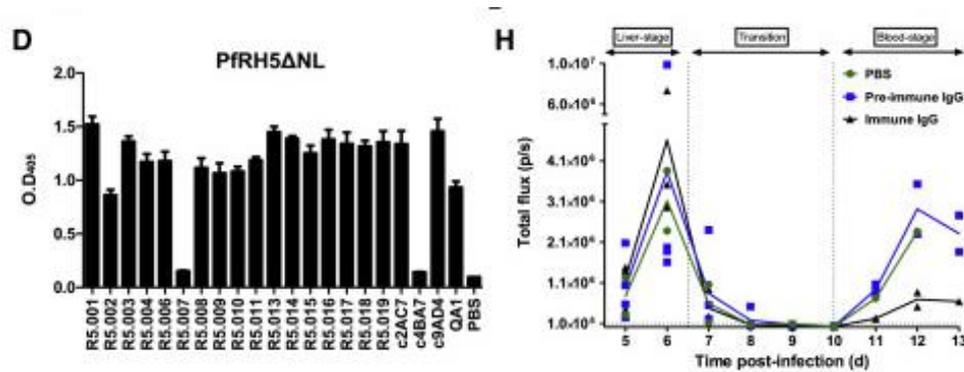
Fonte: ALANINE *et. al*, 2019 (Adaptado do artigo)

Para melhor compreender a relação entre o local de ligação e a função dos anticorpos monoclonais frente à PfrRH5, foi feita a cristalização da proteína PfrRH5, que visa criar retículos estruturados e organizados, a fim de se ter maior estabilidade, tendo a remoção de duas seções de sequência desordenada (M1-Y139 e N248-M296), resultando em uma proteína sem presença de 188 resíduos, denominada PfrRH5ΔNL (ALANINE *et. al*, 2019).

Todos os anticorpos monoclonais com alta atividade inibitória e dois dos três mAbs de baixa atividade inibitória se ligaram a proteína cristalizada PfrRH5ΔNL, sugerindo que a proteína contém os principais epítomos neutralizados pelos anticorpos (Figura 16 d). Em seguida, foi avaliado a atividade inibitória *in vitro* dos anticorpos IgG (purificados a partir de anticorpos policlonais retirados do soro de vacinados com a proteína PfrRH5) sobre a proteína PfrRH5ΔNL, que se mostrou altamente potente.

Em ensaios *in vivo*, com a transferência de anticorpos do isotipo IgG de coelhos imunizados com a proteína cristalizada PfrRH5ΔNL para camundongos humanizados (com hepatócitos e eritrócitos humanos), que foram infectados por picadas de mosquitos infectados com *P. falciparum*, observou-se uma redução significativa da carga parasitária em estágio sanguíneo, ressaltando que a IgG induzida pela vacina para essa proteína cristalizada PfrRH5ΔNL é capaz de retardar ou interromper efetivamente a parasitemia em estágio sanguíneo *in vivo* (Figura 16 h) (ALANINE *et. al*, 2019).

Figura 16: Epítomos de neutralização inseridos na proteína PfrH5ΔNL



Fonte: ALANINE *et. al.*, 2019 (Adaptado do artigo)

Esses dados relatados, portanto, fornecem uma estratégia diferente de vacinação eficaz para a malária em estágio sanguíneo baseada no antígeno PfrH5, que fornece imunidade anti-merozoíta funcional em concentrações baixas de IgG humana, sendo um importante candidato vacinal (ALANINE *et. al.*, 2019).

- **Vacina AMA1-RON 2**

Ainda dentro das vacinas para estágio sanguíneo, tem-se o antígeno de membrana apical 1 (AMA 1), que já foi considerado um dos principais candidatos a vacina, pois os anticorpos anti-AMA 1 recombinante são altamente eficientes em bloquear a entrada dos merozoítos nas hemácias, tanto em ensaios *in vitro* quanto em ensaios *in vivo* com primatas não humanos imunizados. Porém, infelizmente, esse sucesso inicial não foi observado em testes humanos, já que a eficácia foi de moderada a nula (SRINIVASAN *et. al.*, 2014).

Dois estudos de fase II realizados por Ouattara e colaboradores, não relataram uma eficácia significativa para uma vacina AMA 1 bivalente com o adjuvante hidróxido de alumínio, contra parasitas homólogos, enquanto que um estudo paralelo feito por Thera e colaboradores, com uma vacina AMA 1 monovalente com um sistema de adjuvante diferente, obteve-se uma eficácia de 64% (SRINIVASAN *et. al.*, 2014).

Estudos apontam que a AMA 1 interage com uma região conservada composta por 49 aminoácidos, chamada de RON 2, que é uma proteína residente das róprias do parasita, sendo muito útil durante a invasão dos merozoítos. A análise da estrutura cristalina do complexo revelou que o peptídeo RON 2 (RON 2L) se liga a um sulco hidrofóbico conservado em AMA 1, resultando em extensas mudanças conformacionais em certas regiões. Anticorpos

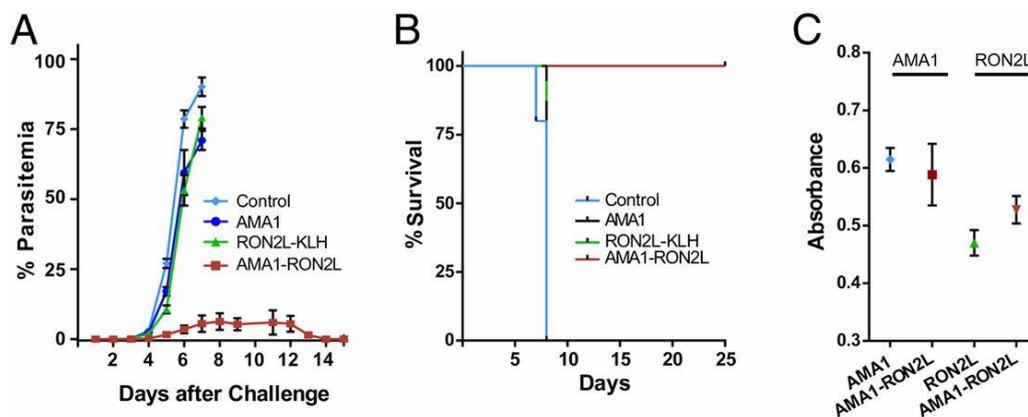
que se ligam perto ou dentro desse sulco hidrofóbico bloqueiam a invasão parasita, inibindo assim, a ligação da RON 2 (SRINIVASAN *et. al*, 2014).

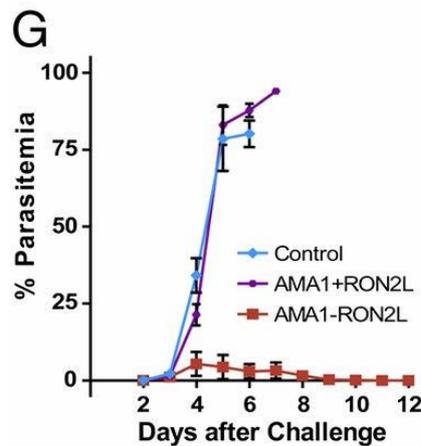
Um estudo feito para avaliar a eficácia da vacina AMA 1-RON 2L expressa em *Escherichia coli* e com 50 µl do adjuvante de Freund (composto por bactérias inativadas do gênero *Mycobacterium*), usando um modelo de camundongos BALB/c, mostrou que todos os animais imunizados com o complexo AMA 1-RON 2L foram protegidos contra o desafio com hemácias infectadas por *Plasmodium yoelli* altamente virulento, enquanto que os animais vacinados apenas com um dos antígenos (AMA 1 ou RON 2) não resistiram à infecção (Figura 17 a/b) (SRINIVASAN *et. al*, 2014).

As quantidades de anticorpos anti-AMA 1 foram semelhantes tanto no grupo imunizado apenas com AMA 1, como no grupo vacinado com o complexo (Figura 17 c). Para determinar se a proteção do imunizante estava relacionada apenas a um efeito aditivo da imunização com dois antígenos ou se é necessário um complexo, foram imunizados os camundongos BALB/c com o complexo AMA 1-RON 2L e com os dois antígenos (AMA 1 + RON 2L), injetados em locais separados (SRINIVASAN *et. al*, 2014).

Os camundongos BALB/c imunizados com o complexo AMA 1-RON 2L foram protegidos, enquanto que aqueles imunizados com os dois antígenos separadamente não estavam protegidos contra o *P. yoelli* (Figura 17 g). Os dados obtidos indicam que a proteção contra espécies letais como o *P. yoelli*, requer uma vacinação com um complexo AMA 1-RON 2L pré-formado (SRINIVASAN *et. al*, 2014).

Figura 17: A imunização com o complexo AMA 1-RON 2L protege camundongos contra o desafio letal com *P. yoelli*



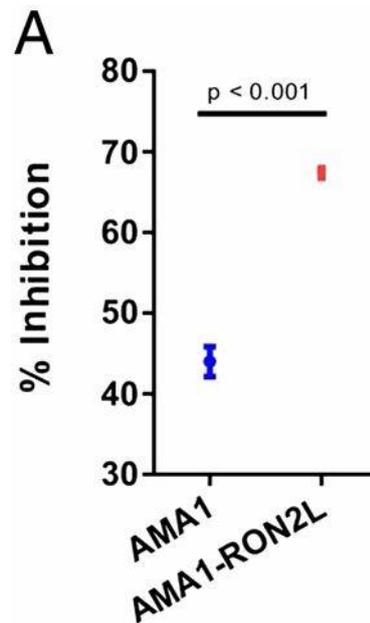


Fonte: SRINIVASAN *et. al*, 2014 (Adaptado do artigo)

Foi avaliado também, a proteção induzida por anticorpos ou células T por meio de estudos de transferência passiva, onde anticorpos do isotipo IgG total (cerca de 400 µg) e células T (2×10^6) de animais imunizados com o complexo AMA 1-RON 2L foram injetados em camundongos BALB/c virgens nos dias -1, 0 e +1 (um dia antes do desafio, no dia do desafio e um dia após o desafio), e feito o desafio com *P. yoelli* no dia 0. Os dados obtidos sugerem que a proteção dependente do complexo foi amplamente mediada por anticorpos, sendo a IgG total a responsável por induzir uma proteção parcial, enquanto que as células T não conseguiram (SRINIVASAN *et. al*, 2014).

O ensaio de atividade de inibição de crescimento *in vitro* foi feito para medir a eficácia de anticorpos anti-PfAMA 1 e anti-PfAMA 1-RON 2L no bloqueio da invasão dos merozítos nas hemácias. Os ratos Sprague-Dawley imunizados com o complexo AMA 1-RON 2L da cepa 3D7 de *P. falciparum*, apresentaram uma quantidade significativa de IgG que inibiu a invasão de merozoítos quando infectados pelo cepa homóloga 3D7 de *P. falciparum* (Figura 18 a). Curiosamente, foi relatado também, que na ausência do antígeno AMA 1 não se observa a produção de anticorpos IgG no ensaio de inibição de crescimento em *in vitro*, ressaltando que os anticorpos produzidos são direcionados em maior quantidade para a AMA 1 (SRINIVASAN *et. al*, 2014).

Figura 18: Complexo AMA 1-RON 2L gera anticorpos inibidores



Fonte: SRINIVASAN *et. al*, 2014 (Adaptado do artigo)

Estudos recentes sugerem que a imunização com apenas quatro ou cinco alelos do antígeno AMA 1 é suficiente para cobrir seus polimorfismos e bloquear a invasão de múltiplas cepas em ensaios *in vitro*, sendo um passo inovador para a geração de uma vacina em estágio sanguíneo (SRINIVASAN *et. al*, 2014).

- **Vacina VAR2CSA**

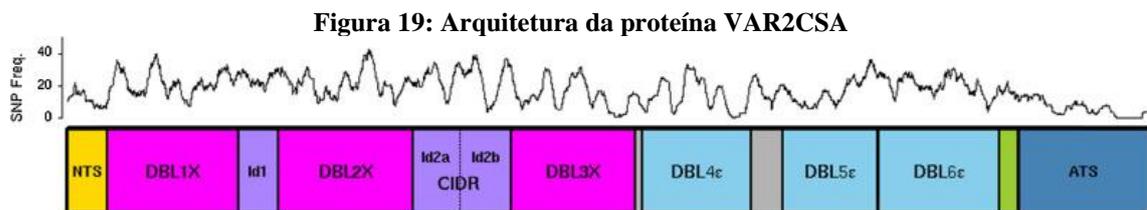
A malária placentária causada pelo *Plasmodium falciparum* é uma das principais causas de mortalidade materna, fetal e infantil, mas em contrapartida, os mecanismos de patogênese e imunidade protetora são bem compreendidos, fornecendo um caminho para o desenvolvimento de uma vacina. Mulheres grávidas são suscetíveis à malária placentária e aos graves desfechos clínicos associados, já que a mesma é caracterizada pelo acúmulo de parasitas nos eritrócitos e monócitos presentes nos espaços intervilosos placentários, levando à um quadro de anemia materna, hipertensão, natimortos e bebês com baixo peso ao nascer devido ao parto prematuro e retardo no crescimento fetal (FRIED *et. al*, 2015; GAMAIN *et. al*, 2021).

A prevalência de malária placentária diminui acentuadamente com sucessivas gestações, pois a proteção está associada ao desenvolvimento de anticorpos direcionados à superfície dos eritrócitos infectados, que expressam a proteína VAR2CSA que se liga ao

sulfato de condroitina A (CSA), que é um receptor placentário presente na superfície do sincitiotrofoblasto e nos espaços intervilosos. Em mulheres grávidas não infectadas, as hemácias se ligam a receptores como CD36 e ICAM-1, não se ligando a CSA (FRIED *et. al*, 2015; GAMAIN *et. al*, 2021).

A proteína VAR2CSA é pertencente a família de antígenos de superfície de eritrócitos (EMP1), sendo exclusiva de *Plasmodium falciparum*. A VAR2CSA possui as regiões extracelulares, transmembranares e intracitoplasmáticas, onde a região extracelular é estruturada de forma única, apresentando uma sequência N-terminal, seis domínios de ligação Duffy (DBL) que são ricos em cisteína, regiões de interdomínios (ID), que desempenham um papel fundamental na adesão e imunogenicidade, e a cauda intracitoplasmática (sequência terminal ácida – ATS) (Figura 19) (FRIED *et. al*, 2015).

O fato da proteína VAR2CSA ter um alto peso molecular, múltiplos domínios extracelulares e extensa variação de sequência, faz com que se tenha um desafio no desenvolvimento de uma vacina, que proporcione uma imunidade adquirida neutralizante.



Fonte: FRIED *et. al*, 2015 (Adaptado do artigo)

Estudos realizados por Tuikue Ndam *et. al*, relataram a presença de anticorpos para os domínios DBL5 e DBL6 em gestantes durante o segundo trimestre ou no parto. Já em outro estudo, observou-se que a presença de anticorpos para os domínios DBL1-ID1-DBL2 e DBL3 foram maiores entre mulheres multigrávidas (gestações recorrentes) do que em primigestas, durante a gravidez e no momento do parto, enquanto que os anticorpos medidos para as regiões DBL4 DBL5 foram encontrados apenas em mulheres multigrávidas tanto durante a gestação como no parto (FRIED *et. al*, 2015).

A VAR2CSA é uma proteína com grande peso molecular difícil de ser produzida comercialmente, além de se ter a dificuldade de identificar os fragmentos menores que induzam a produção de anticorpos funcionais semelhantes aos induzidos por uma infecção natural. Os fragmentos imunodominantes já reconhecidos foram o NTS-DBL1-ID1-DBL2, DBL3-DBL4 e DBL5-DBL6 do alelo FCR3, pois induziram altos níveis de anticorpos. Para o mapeamento de epítomos, foi feito o desenvolvimento de anticorpos monoclonais a partir de

células B de mulheres multigrávidas imunes, tendo a produção de 8 anticorpos monoclonais (FRIED *et. al*, 2015).

Os 8 anticorpos monoclonais produzidos reagiram com a superfície de isolados de CSA selecionados, onde destes, 3 anticorpos monoclonais reagiram com o domínio DBL3 recombinante e 4 anticorpos reagiram com o domínio DBL5 de VAR2CSA. Já o oitavo anticorpo monoclonal denominado PAM1.4 não reagiu com os domínios DBL recombinantes e reagiu mal com a proteína VAR2CSA de comprimento total porém, ele reconheceu a superfície de parasitas placentários e inibiu a adesão dos mesmos à CSA (FRIED *et. al*, 2015).

As vacinas PRIMVAC e PAMVAC são baseadas na proteína VAR2CSA e foram projetadas para gerar anticorpos capazes de inibir a adesão de eritrócitos infectados às células placentárias. Recentemente, ambas as vacinas foram avaliadas em dois ensaios clínicos de fase I de maneira separada. A vacina PAMVAC se baseia nas regiões de interdomínio 1 e 2 (ID1 e ID2a) e no domínio de ligação tipo Duffy 2 (DBL2) da proteína VAR2CSA, formando o complexo ID1-DBL2x-ID2a proveniente da variante FCR3, sendo expressa nas células de *Drosophila Schneider 2*, enquanto que a PRIMVAC é baseada no multidomínio DBL1x-2x da proteína VAR2CSA da cepa de *P. falciparum* 3D7, sendo expressa em *Escherichia coli* (GAMAIN *et. al*, 2021).

O ensaio clínico em questão foi desenhado com um ensaio randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, a fim de avaliar a segurança e a imunogenicidade de três vacinações intramusculares com doses progressivamente altas. A PRIMVAC foi formulada com o adjuvante Alhydrogel (GLA-SE), enquanto que a PAMVAC foi com o adjuvante Alhydrogel (GLA-SE) combinado com a formulação lipossômica QS21 (GLA-LSQ). As voluntárias receberam três doses sequenciais de 20 µg, 50 µg e 100 µg das vacinas nos dias 0, 28 e 56 (GAMAIN *et. al*, 2021).

Ambas as vacinas foram imunogênicas em todas as participantes e os níveis de anticorpos foram maiores para a vacina PRIMVAC, em todas as dosagens. Todas as voluntárias vacinadas com a PRIMVAC apresentaram títulos de anticorpos após duas doses e uma alta proporção deles após um ano da terceira vacinação, sendo indicativo de uma imunidade duradora. Os anticorpos detectados para essa vacina são do isotipo IgG, apresentando principalmente as subclasses IgG1 e IgG3, apontando que a PRIMVAC consegue imitar a resposta imune natural adquirida em mulheres multigrávidas (GAMAIN *et. al*, 2021).

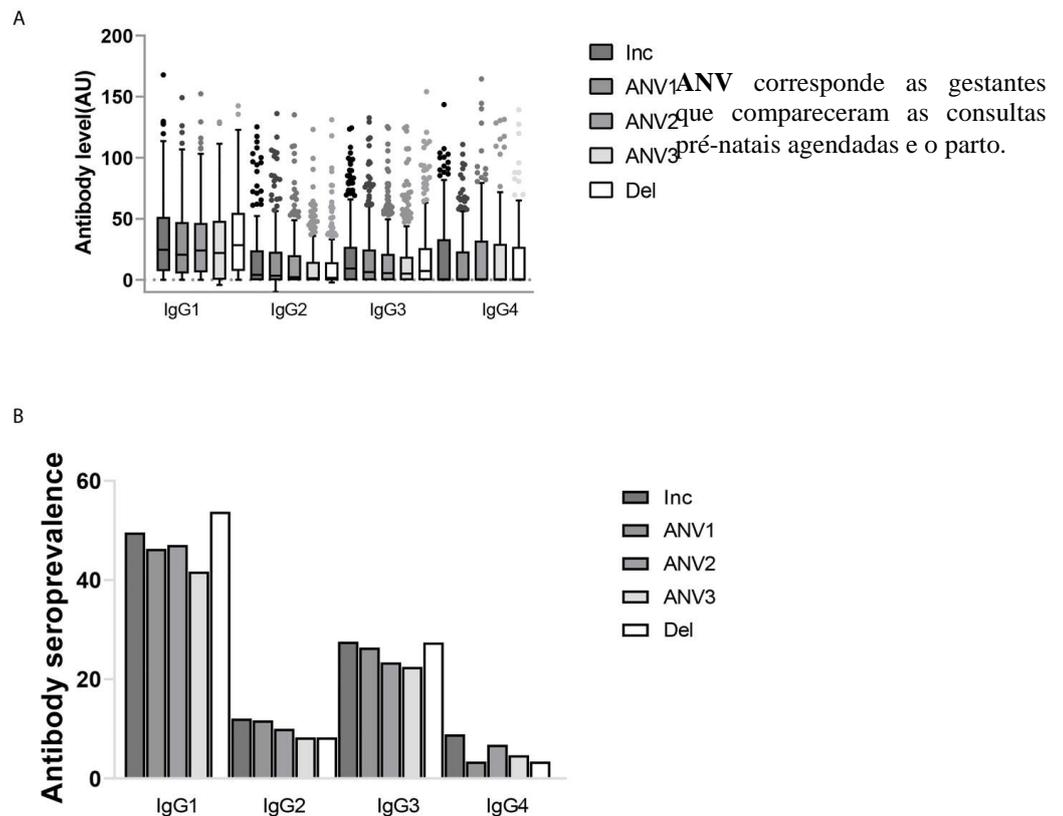
Um estudo executado com vacina PAMVAC visando o antígeno recombinante ID1-ID2a da proteína VAR2CSA pertencente a variante FCR3 de *P. falciparum*, analisou a

presença de anticorpos através de amostras de plasma de mulheres grávidas, com o intuito de verificar as subclasses do anticorpo IgG. Para o trabalho, foram recrutadas 470 mulheres grávidas, onde os subgrupos incluíam mulheres que tiveram infecção placentária no parto, mulheres anêmicas (cujos bebês tiveram baixo peso ao nascer ou nasceram prematuros) e gestantes sem desfecho patológico no parto (TORNIGAH *et al.*, 2021).

Para medir a resposta dos anticorpos com especificidade para a proteína recombinante, foi utilizado o protocolo de ELISA indireto, onde a placa com 96 poços era impregnada com o antígeno ID1-ID2a (0,5 µg/mL) e albumina de soro bovino, sendo incubados com 100 µL de plasma das voluntárias do estudo. As reações foram reveladas com anticorpos de cabra do isotipo IgG anti-IgG humana conjugado com a enzima peroxidase de rábano seguido do substrato TMB. A leitura das reações foi feita em espectrofotômetro a 450 nm (TORNIGAH *et al.*, 2021).

O ELISA para as subclasses de IgG seguiu o mesmo protocolo de execução, exceto que o anticorpo secundário pertencia ao camundongo do isotipo IgG anti-IgG humana conjugado com HRP. A distribuição das respostas das subclasses de IgG foram medidas, mostrando que a IgG1 (variando de 49,6% a 53,8%) e IgG3 (variando de 27,4% a 27,6%) citofílicas foram maiores em comparação com a IgG2 (variando de 8,3% a 12,1%) e IgG4 (variando de 3,4% a 8,9%) (Figura 20 a/b).

Figura 20: Perfil das subclasses de IgG para a proteína recombinante ID1-ID2a



Fonte: TORNYIGAH *et. al*, 2021 (Adaptado do artigo)

Ao comparar os níveis de IgG totais entre as gestantes, constatou-se que os níveis mais altos foram detectados nas mulheres multigestas em comparação com as primigestas. Em conclusão, o estudo ressalta que as vacinas contra malária placentária devem se direcionar aos anticorpos IgG3 e IgG4 para se obter uma proteção ideal (TORNYIGAH *et. al*, 2021).

Novas estratégias devem ser buscadas para aumentar a imunogenicidade das candidatas vacinais contra malária placentária e maximizar a reatividade cruzada por anticorpos contra diferentes variantes da proteína VAR2CSA (GAMAIN *et. al*, 2021).

Vacinas bloqueadoras de transmissão vetorial

- **Vacina Pfs230**

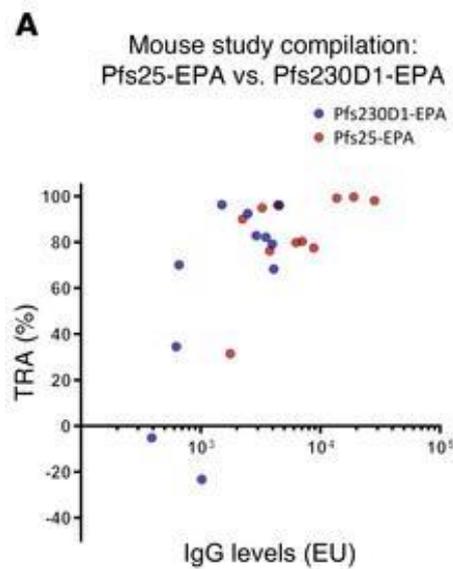
As vacinas bloqueadoras de transmissão vetorial têm como alvo infecções humanas e de mosquitos. Os esforços para desenvolver uma vacina que interrompa a infecção do mosquito estão em andamento desde 1976, quando foi relatado imunidade em galinhas contra *Plasmodium gallinaceum* induzido por uma vacina bloqueadora (SINGH *et. al*, 2020).

Os ensaios clínicos atualmente tem se limitado a proteínas de estágio sexual expressadas pelo parasita *P. falciparum*, se destacando a Pfs48/45, Pfs25 e a Pfs230. Até o momento, a proteína Pfs230 vem ganhando destaque, já que a mesma apresenta um domínio rico em cisteína, sendo uma proteína de estágio sexual de 230 kDa. O domínio recombinante de Pfs230 (Pfs230D1M) foi bem caracterizado e mostrou ser capaz de induzir anticorpos em pequenos animais (SINGH *et. al*, 2020).

A fim de avaliar essa indução anticorpos, foi utilizado um fragmento (Ser₅₄₂ a Gly₇₃₆) abrangendo o domínio 1 de Pfs230 clonado e expresso em levedura *Pichia pastoris* (Pfs230D1M), sendo quimicamente conjugado com EPA, um mutante não tóxico da exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa*. Foram usados camundongos CD-1, que foram imunizados com duas doses (dia 0 e 28) por injeção intramuscular com Pfs230D1M e Pfs230D1M-EPA, ambos formulados com o adjuvante Alhydrogel (HEALY *et. al*, 2021).

Os níveis de anticorpos induzidos por Pfs230D1M-EPA foram aproximadamente 100 vezes maiores do que aqueles induzidos pelo monômero Pfs230D1M. Experimentos usando camundongos BALB/c e CD-1 com comparações diretas de Pfs25-EPA/Alhydrogel e Pfs230D1M-EPA/Alhydrogel para medir a atividade de anticorpo funcional através de um ensaio de alimentação de membrana padrão de gametócitos de *P. falciparum* da estirpe NF54 para mosquitos *Anopheles stephensi*, onde a redução na contagem média de oocistos por mosquito versus anticorpos de controle (TRA) não apresentou muita diferença entre os camundongos vacinados com Pfs230D1M-EPA e Pfs25-EPA (Figura 21 a) (HEALY *et. al*, 2021).

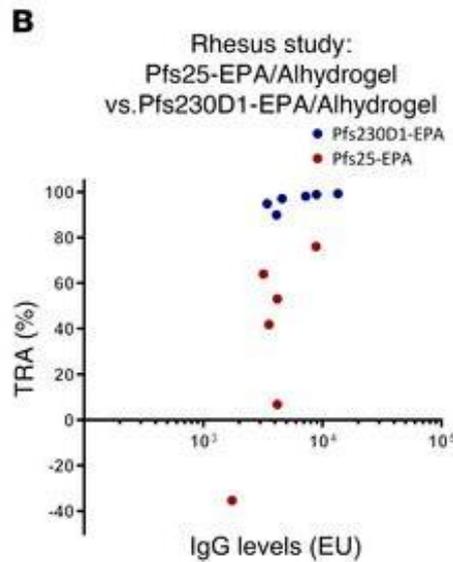
Figura 21: Estudos em camundongos comparando Pfs25-EPA/Alhydrogel com Pfs230D1M-EPA/Alhydrogel



Fonte: HEALY *et. al*, 2021 (Adaptado do artigo)

Como os estudos em camundongos não distinguiram um antígeno superior ao outro para a atividade funcional do anticorpo, foi utilizado um modelo de primata não humano, que no caso foi em macacos rhesus, usando as formulações Pfs230D1M-EPA/Alhydrogel (40 µg) e Pfs25-EPA/Alhydrogel (47 µg) administradas por injeção intramuscular em um cronograma de 0, 2 e 6 meses. As respostas dos anticorpos foram monitoradas através de amostras de soros coletadas após 2 semanas da terceira vacinação, confirmando que os títulos mais altos foram de anti-Pfs230D1M, reduzindo a densidade de oocistos em mais de 80% (Figura 22 b) (HEALY *et. al*, 2021).

Figura 22: Estudos em macacos rhesus comparando Pfs25-EPA/Alhydrogel com Pfs230D1M-EPA/Alhydrogel



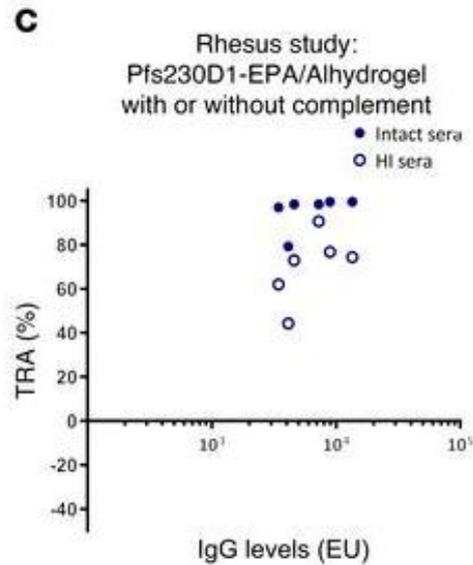
Fonte: HEALY *et. al.*, 2021 (Adaptado do artigo)

Para medir a contribuição do sistema complemento na atividade imunológica, amostras de soro de macacos rhesus vacinados com o antígeno Pfs230D1M foram testadas novamente através do ensaio de alimentação de membrana padrão utilizando gametócitos de *P. falciparum*. Foi observada que a atividade imunológica sem o sistema complemento foi significativamente menor, porém, mesmo sem complemento, 5 de 6 macacos tinham mais de 50% de redução na contagem média de oocistos, sugerindo que os anticorpos produzidos podem bloquear o parasita, indicando que a Pfs230D1M é um ótimo alvo vacinal (Figura 23 c) (HEALY *et. al.*, 2021).

Visto que a formulações de Pfs230D1M-EPA/Alhydrogel e Pfs25-EPA/Alhydrogel foram bem toleradas em ensaios pré-clínicos, um primeiro ensaio clínico de fase 1 em humanos nos Estados Unidos foi iniciado para avaliar a segurança. Os adultos foram vacinados de maneira escalonada, onde 5 indivíduos receberam duas imunizações por braço (nos intervalos de 0 e 28.º dia) com os um dos imunizantes ou ambos coadministrados em braços separados (HEALY *et. al.*, 2021).

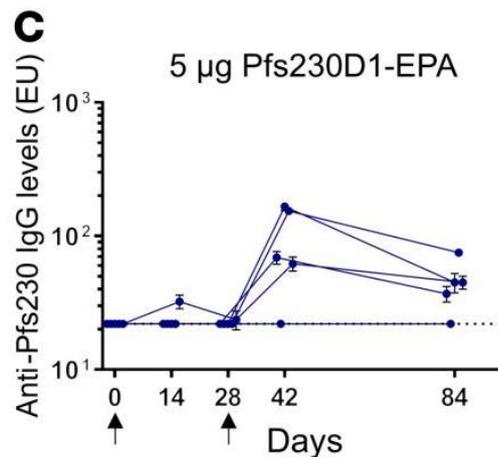
Os imunizantes foram bem tolerados, tendo uma reatogenicidade local e sistêmica mínima e nenhum evento adverso grave relatado. Os anticorpos anti-Pfs230 foram mensuráveis mesmo em uma dose mais baixa de Pfs230D1M-EPA/Alhydrogel (5 µg), ao contrário da vacina Pfs25-EPA, sendo sugestivo de melhor imunogenicidade intrínseca (Figura 24 c) (HEALY *et. al.*, 2021).

Figura 23: Estudos em macacos rhesus com e sem o sistema complemento



Fonte: HEALY *et. al*, 2021 (Adaptado do artigo)

Figura 24: Níveis de anticorpos por ELISA em humanos



Fonte: HEALY *et. al*, 2021 (Adaptado do artigo)

Ao comparar os resultados observados em macacos rhesus, o Pfs230D1M induziu alta atividade funcional em humanos, tendo uma redução na contagem média de oocistos superior a 90% em 2 de 5 indivíduos, e superior a 50% em 2 outros indivíduos. Os dados obtidos nesse estudo mostram duas conclusões: a primeira é que o antígeno Pfs230D1M tem a capacidade de bloquear a transmissão em modelo de macacos rhesus, e segundo, que os resultados desse estudo fornecem informações valiosas para estudos futuros, a fim de entender a resposta imune ao Pfs230D1M e melhorias no desenvolvimento de novas vacinas (HEALY *et. al*, 2021).

- **Vacina Pfs25**

Os antígenos bloqueadores de transmissão da malária são classificados em dois grupos, sendo os antígenos de pré-fertilização e os antígenos de pós-fertilização. Os antígenos de pré-fertilização são expressos durante o desenvolvimento dos gametócitos nos humanos, contribuindo para a viabilidade dos parasitas no estágio sexual (no mosquito), tendo como exemplos os antígenos P48/45 e P230. Dentre os antígenos de pós-fertilização se destacam o P25 e P28, que são expressos apenas no intestino médio do mosquito vetor (MULAMBA *et. al*, 2022).

A proteína Pfs25 de *P. falciparum* é rica em cisteína, e a sua expressão começa a partir do momento em que os gametas saem dos glóbulos vermelhos ingeridos no intestino médio do mosquito, sendo expressos nos estágios de zigoto e oocineto. A vacina Pfs25-EPA formulada com o adjuvante Alhydrogel foi avaliada em um estudo de fase I, com um regime de duas, três e quatro doses, administradas em zero, dois, quatro e dez meses (MULAMBA *et. al*, 2022).

A vacina demonstrou um perfil de segurança nos trinta voluntários norte-americanos, onde na dose mais alta, as respostas específicas de IgG foram observadas após a segunda e terceira vacinação, atingindo o pico duas semanas depois da quarta dose de reforço. Um estudo realizado ainda nos Estados Unidos, avaliou a segurança e imunogenicidade do candidato vacinal com partícula semelhante a vírus o Pfs25-VLP-FhCMB (MULAMBA *et. al*, 2022).

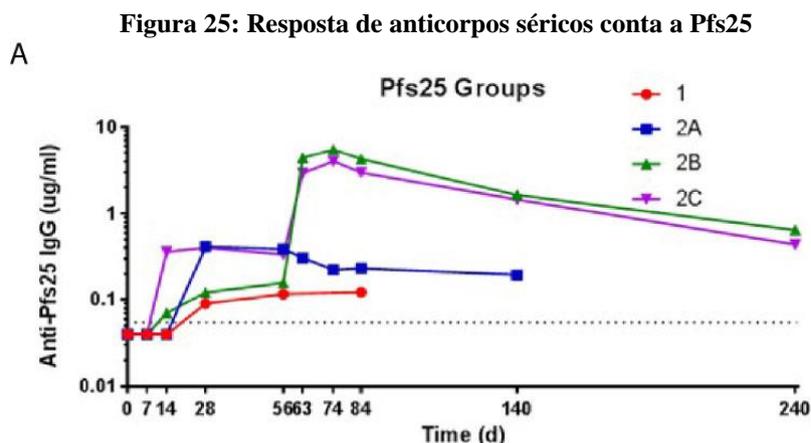
A vacina Pfs25 VLP-FhCMB consiste na proteína Pfs25 geneticamente fundida à proteína de revestimento do vírus mosaico da alfafa, juntamente com o adjuvante Alhydrogel. A segurança e imunogenicidade foi avaliada através de administrações escalonadas nos dias 0, 56 e 168, em 44 voluntários saudáveis. A vacina foi bem tolerada em todas as doses e foram observadas respostas do tipo IgG específicas um mês após a segunda e terceira vacinação (MULAMBA *et. al*, 2022).

Uma nova candidata vacinal foi desenvolvida recebendo o nome de Pfs25-IMX313, se tratando de uma vacina de nanopartículas, na qual a proteína Pfs25 da cepa 3D7 de *P. falciparum* é geneticamente fundida ao domínio de oligomerização IMX313, formando uma proteína nanoparticulada recombinante que é expressa e secretada pela levedura *Pichia pastoris*. O IMX313 é um híbrido do domínio de oligomerização da proteína de ligação C4 de galinha, com 21% de homologia com a sequência da proteína humana (MULAMBA *et. al*, 2022).

Junto a essa proteína nanoparticulada recombinante foi adicionado o adjuvante Matrix-M, que é a base de saponina e demonstrou ativar e recrutar eficientemente células imunes, dentre elas as células T, B, NK, dendríticas e granulócitos em camundongos BALB/c. Para se qualificar a viabilidade, segurança e tolerabilidade em humanos, foi aberto um teste de vacinação de fase I na Tanzânia com 52 voluntários, a fim de avaliar esses parâmetros (MUAMBA *et. al*, 2022).

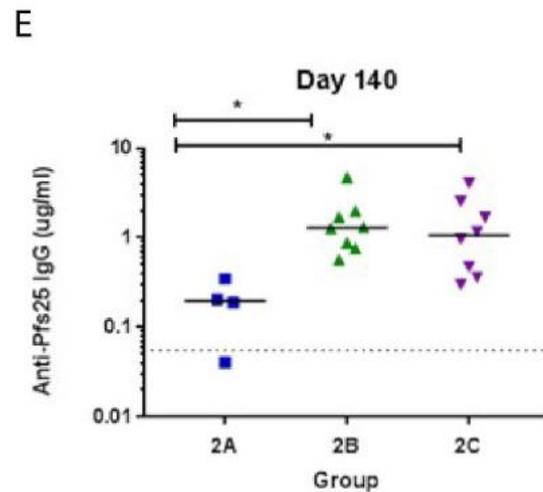
Outra abordagem de imunizante utilizando a proteína Pfs25 é ela fundida a IMX313, sendo expressa em adenovírus de chimpanzé recombinante com deficiência de replicação do sorotipo 63 (ChAd63) e com o vetor viral de ortopoxvírus atenuado (MVA), em modelo murino se mostrou altamente capaz de reduzir a transmissão. Após esse ensaio ter sido promissor, um ensaio de fase I no Reino Unido com adultos saudáveis foi feito, a fim de se relatar a segurança e imunogenicidade da vacina, através de um esquema *prime-boost* heterólogo, sendo a primeira dose com o adenovírus (Pfs25-IMX313/ChAd63), seguida da dose de reforço com vetor viral (Pfs25-IMX313/MVA) (DE GRAAF *et. al*, 2021).

A vacina mostrou ter um perfil de segurança favorável, já que não houve relatos de eventos adversos graves. A vacinação com ChAd63/MVA Pfs25-IMX313 induziu respostas de células T antígeno-específicas em todos os voluntários. Anticorpos do isotipo IgG anti-Pfs25 no soro dos voluntários foram avaliados ao longo do tempo, se apresentando em altos níveis (Figura 25 a). As respostas imunológicas nos grupos 2B e 2C foram significativamente maiores do que no grupo 2A, no dia 140 após a dose de reforço (Figura 26 e) (DE GRAAF *et. al*, 2021).



Fonte: DE GRAAF *et. al*, 2021 (Adaptado do artigo)

Figura 26: Resposta de anticorpos séricos contra Pfs25 no dia 140



Fonte: DE GRAAF *et. al*, 2021 (Adaptado do artigo)

O estudo ressalta que o regime de imunização *prime-boost* heterólogo ChAd63/MVA induziu respostas de células B e T, e um nível modesto de títulos de IgG séricos anti-Pfs25. Além disso, o imunizante demonstrou induzir uma resposta de células TCD4+ e TCD8+ específicas para o antígeno. Embora ela apresente dados promissores, a sua eficácia ainda é baixa, porém a Pfs25 pode ser combinada com outras vacinas bloqueadoras de transmissão, ou pré-eritrocitárias e/ou eritrocitárias, permitindo a confecção de uma proteção contra a malária (DE GRAAF *et. al*, 2021).

4.6 DEMAIS VACINAS EM ESTUDO

Estágio pré-eritrocitário

- **Vacina de CSP completa**

A proteína circunsporozoíta (CSP) de *P. falciparum* é uma importante proteína de superfície expressa pelos esporozoítas, e é um alvo chave no desenvolvimento de vacinas para a malária na fase pré-eritrocitária. Recentemente, um ensaio clínico de fase I foi executado e o mesmo se utilizou da estratégia baseada em CSP recombinante de comprimento total (rCSP), já que este antígeno inclui uma região crítica que auxilia na invasão dos hepatócitos (FRIEDMAN-KLABANOFF *et. al*, 2021).

O imunizante foi formulado com o adjuvante GLA-LQS que é extraído da árvore *Quillaja saponaria* 21, funcionando como um agonista de TLR4, promovendo a resposta por células T citotóxicas. O ensaio clínico foi de escalonamento de dose em humanos, onde se aplicou uma dose mais baixa da vacina com o adjuvante, atingindo uma média geométrica de IgG anti-CSP de 4 vezes mais após a primeira dose da vacina, enquanto que após a terceira dose (depois de 28 dias), esse aumento foi de aproximadamente 90 vezes (FRIEDMAN-KLABANOFF *et. al*, 2021).

O estudo apresentou resultados favoráveis de segurança e imunogenicidade, confirmando que o adjuvante utilizado na formulação é capaz de gerar uma resposta imunoestimuladora, porém há muitos pontos que ainda devem ser melhor estudados para que a vacina evolua para uma próxima fase de estudo e se torne um produto clínico (FRIEDMAN-KLABANOFF *et. al*, 2021).

- **Vacina PfSPZ**

Atualmente, tem em desenvolvimento a vacina Sanaria (nome comercial), composta por esporozoítos de *Plasmodium falciparum* inteiros coletados das glândulas salivares de mosquitos assépticos, que são infectados por parasitas cultivados em laboratório, sendo atenuados por radiação, purificados e criopreservados. A vacina já foi avaliada em 21 estudos concluídos ou em andamento nos Estados Unidos, União Europeia e África, e demonstrou ser segura e bem tolerada nos voluntários (JONGO *et. al*, 2022).

Testes feitos em humanos mostram que a eficácia dessa vacina é dependente da dose. Estudos feitos em camundongos vacinados com a PfsSPZ foi observado uma resposta de subconjunto de células T $\gamma\delta$, que são necessárias para a indução de células TCD8⁺ protetoras, que medeiam a morte de parasitas intra-hepáticos, porém, em contrapartida, essas células não foram capazes de garantir a proteção contra o desafio de esporozoítas (DUFFY *et. al*, 2020).

Para que a vacina confira uma imunidade estéril, é necessário que ela seja administrada via intravenosa, sendo um dos desafios para sua implementação clínica. Além deste, tem os desafios logísticos e de custo que incluem a cadeia fria de nitrogênio líquido para a criopreservação e a sua ampla fabricação (DUFFY *et. al*, 2020).

- **Vacina de quimioprofilaxia (CVac)**

Esta terapia imunológica se baseia no esporozoítio inteiro quimioatenuado, pois tem-se a administração concomitante de antimalárico, tratando-se de uma vacina de quimioprofilaxia. Um estudo feito com indivíduos virgens para a malária usando a vacina de quimioprofilaxia (PfSPZ-CVac) juntamente com o antimalárico cloroquina, conferiu altos níveis de imunidade estéril que durou 2 anos contra o desafio com esporozoítios infectantes (DUFFY *et. al*, 2020; SULYOK *et. al*, 2021).

Alguns ensaios clínicos com a PfSPZ-CVac foram concluídos ou estão em andamento, porém os resultados ainda estão sendo publicados. As abordagens utilizando a PfSPZ-CVac são valiosos modelos de pesquisa para estudar a imunidade estéril humana. Um destes estudos acredita que a PfSPZ-CVac será uma excelente vacina para viajantes para o continente africano, pois geralmente mais de 90% dos viajantes viajam por menos de 12 semanas (SULYOK *et. al*, 2021).

O próximo passo nos estudos é desenvolver uma estratégia vacinal que seja mais duradora e que seja eficiente também para crianças de 2 a 12 anos, já que se trata de um grupo que sofre maior risco de morbidade e mortalidade por malária, e é o responsável pela maior parte da transmissão (SULYOK *et. al*, 2021).

- **Vacina com parasita geneticamente atenuado (GAP)**

Este tipo de vacina se baseia em uma atenuação genética, onde se tem a deleção de genes importantes que atuam em diferentes fases do estágio hepático, tendo-se apenas os genes necessários para induzir a resposta imune. Estudos feitos com roedores demonstraram uma imunidade protetora, ao passo que em humanos, a imunidade protetora é um desafio (BIJKER *et. al*, 2015).

Para que o gene seja considerado um candidato à atenuação genética, o mesmo deve atender alguns critérios: a proteína a ser codificada não pode ser essencial para a replicação do estágio sanguíneo; a mesma não pode ter função essencial no desenvolvimento sexual do parasita no mosquito e deve ser essencial para o desenvolvimento do estágio hepático (BIJKER *et. al*, 2015).

As vacinas mais avançadas com este tipo de metodologia consistem em mutantes de *P. falciparum*, onde os genes *p52*⁻, *p36*⁻, *sap1*⁻, Δ *b9*⁻ e Δ *slarp*⁻ são deletados, pois não

ofereceram evidências de maturação completa no fígado de camundongos, sendo um ótimo ponto que deve ser avaliado agora em humanos (BIJKER *et. al*, 2015).

Estágio eritrocitário

- **Vacina PfSEA-1**

O *Schizont Egress Antigen-1*, traduzido para o português “antígeno-1 de saída de esquizonte” de *P. falciparum* (PfSEA-1) é uma fosfoproteína ácida de 244 kDa expressa por glóbulos vermelhos infectados por esquizontes, sendo essencial para a sua replicação no estágio sanguíneo, tornando-se assim, um antígeno candidato a vacina (PARK *et. al*, 2019).

Estudos realizados *in vitro*, mostram que os anticorpos anti-PfSEA-1 detêm a saída dos merozítos das hemácias para a corrente sanguínea. Por sua vez, um estudo realizado em humanos mostrou que os anticorpos recombinantes para PfSEA-1 foram capazes de diminuir a incidência de malária grave em crianças na Tanzânia, e reduziu significativamente a densidade de parasitas em adolescentes e adultos quenianos (PARK *et. al*, 2019).

Além disso, foi relatado também que altos níveis de anticorpos anti-PfSEA-1 derivados da mãe estão no cordão umbilical do bebê, sendo altamente correlacionados com a redução de malária grave em bebês de até 12 meses de idade. A partir dessa observação, muitos estudos vêm sendo feitos com essa vacina durante a gestação, a fim de se observar se há proteção para os bebês (PARK *et. al*, 2019).

- **Vacina PfGARP**

O *P. falciparum* apresenta uma proteína única da sua espécie que é rica em ácido glutâmico, sendo conhecida como PfGARP, que por sua vez está presente nos trofozoítos precoces e tardios, secretando essa proteína que é expressa na superfície de eritrócitos infectados. Alguns estudos demonstram que a PfGARP desempenha um papel funcional no aumento das propriedades adesivas do plasmódio nos eritrócitos (ATAPOUR *et. al*, 2022).

Em um estudo recente de cultura de células, foi identificado que essa proteína induziu anticorpos protetores, onde os mesmos conseguiram romper a integridade da membrana mitocondrial eritrocitária e induziram a morte celular programada dessas hemácias infectadas. No entanto, para se confirmar a imunogenicidade desta vacina, são necessários experimentos *in vivo* (ATAPOUR *et. al*, 2022).

- **Vacina de parasita quimicamente atenuado**

Na busca por novos antígenos para vacinas, um grupo de cientistas da Griffith University, na Austrália, estão explorando uma nova vacina que utiliza o parasita inteiro atenuado por uma droga que se liga ao seu DNA, que no caso é a Tafuramicina-A. Ensaios realizados em camundongos, foi possível se ter a indução de uma imunidade homóloga e heteróloga, onde a resposta foi dependente de células TCD4+ (DUFFY *et. al*, 2020).

Já na espécie de macacos *Aotus nancymae*, a vacina quimioatenuada não foi capaz de atrasar a parasitemia após o desafio, porém, induziu respostas de células TCD8+. Em humanos, ela é bem tolerada e gera uma resposta de células T, mas não produz anticorpos. Novos estudos com esta vacina vêm sendo feitos, a fim de se avaliar a segurança, eficácia e imunogenicidade com uma estratégia vacinal viável (DUFFY *et. al*, 2020).

- **Vacina PvDBP (*Plasmodium vivax*)**

O *Plasmodium vivax* causa cerca de 14,3 milhões de casos de malária a cada ano na Ásia e América Latina, sendo considerado uma ameaça à saúde pública por causar morbidade e mortalidade. O desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax* apresenta muitos desafios, mas atualmente, os ensaios clínicos estão focando na proteína PvDBP, que é a proteína de ligação Duffy (DUFFY *et. al*, 2020).

Esta proteína se liga ao receptor de antígeno Duffy para quimiocinas presentes nos eritrócitos, ocasionando na invasão de merozoítos. Duas candidatas vacinais de DBP já completaram os ensaios clínicos de Fase I, onde uma estratégia utiliza vetor viral e a outra proteína recombinante. Ambas as candidatas conseguiram induzir anticorpos funcionais e foi possível também, identificar os epítomos imunodominantes, fornecendo uma base para melhorar o design dessa vacina (DUFFY *et. al*, 2020).

Vacinas bloqueadoras de transmissão vetorial

- **Vacina Pfs48/45**

O Pfs48/45 é um antígeno de superfície de gameta, que é expresso durante os estágios posteriores do desenvolvimento dos gametócitos nos eritrócitos humanos. Uma vez que esses gametócitos são ingeridos pelos mosquitos, eles saem dos eritrócitos como gametas, para que ocorra a fase sexuada no hospedeiro invertebrado (DUFFY *et. al*, 2020).

Esta proteína é composta por três domínios 6-cys (cisteína), dos quais a região de domínio C-terminal contém um epítipo conformacional imunodominante, sendo uma região importante para a indução de anticorpos. Estudos recentes utilizaram o domínio C-terminal 6-Cys da proteína Pfs48/45 juntamente com a região R0 de uma outra proteína rica em glutamato, formando o antígeno recombinante R0.6C, que é expresso na bactéria *Lactococcus lactis* DUFFY *et. al*, 2020).

Em modelo *in vitro*, o antígeno resultante reagiu com anticorpos monoclonais funcionais, induzindo a produção de anticorpos de bloqueio de transmissão. Pesquisadores acreditam que nos próximos anos esta vacina saia dos ensaios pré-clínicos e vá para os ensaios em humanos (DUFFY *et. al*, 2020).

- **Vacina Pvs230 (*Plasmodium vivax*)**

Estudos exploram a candidatura da vacina Pvs230 contra o *Plasmodium vivax*, cujo antígeno é ortólogo a proteína Pfs230 de *Plasmodium falciparum*, que é expressa pelos gametócitos/gametas na pré-fertilização, apresentando um baixo nível de polimorfismo, tornando-se uma vacina promissora na Ásia e América Latina (TENTOKAM *et. al*, 2019).

Um estudo feito no Brasil e Camboja avaliou a soroprevalência para o primeiro domínio do antígeno Pvs230 (Pvs230D1M), demonstrando que há uma soroprevalência de anticorpos do isotipo IgG nos indivíduos com malária (TENTOKAM *et. al*, 2019).

Os resultados obtidos pelo estudo fornecem uma primeira caracterização das respostas de anticorpos para o antígeno Pvs230 entre indivíduos infectados por *P. vivax* em regiões com diferentes intensidades de transmissão, ajudando em melhorias futuras para imunizante (TENTOKAM *et. al*, 2019).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho se propôs, como objetivo geral, conhecer as principais vacinas em desenvolvimento para malária atualmente. A vacina RTS,S/AS01 (Mosquirix - nome comercial) é o imunizante mais avançado nos estudos clínicos com melhor perfil imunológico observado, sendo o primeiro imunizante a ser liberado para uso emergencial pela OMS (Organização Mundial de Saúde). Além deste, outros ensaios clínicos vêm sendo realizados com outras potenciais candidatas vacinais, a fim de se ampliar as opções de imunizantes contra malária, já que se trata de uma doença negligente e com altas taxas de mortalidade em regiões endêmicas.

Com os resultados alcançados com este trabalho, foi possível notar que mesmo com toda a tecnologia existente nos dias atuais, ainda há muitos obstáculos no desenvolvimento de vacinas, principalmente no âmbito da resposta imunológica no hospedeiro. Atualmente, tem-se 18 imunizantes sendo testados em ensaios clínicos, porém destes 18, 7 imunizantes estão em fases avançadas de estudos, sendo que a RTS,S/AS01 é a única vacina liberada para uso na África Subsaariana, já que ela foi capaz de induzir uma resposta imunológica eficaz de curta proteção, reduzindo o risco de malária clínica. O fato da RTS,S/AS01 apresentar um declínio de anticorpos, fez com que outros imunizantes fossem desenvolvidos, a fim de se aumentar essa resposta imunológica, como é o caso da R21/Matrix-M, que nos estudos vem apresentando uma produção de altos títulos de anticorpos.

Outra vacina que vem ganhando espaço nos ensaios clínicos é a PfRH5, onde os anticorpos apresentam alta afinidade à proteína, tendo uma redução significativa da carga parasitária em estágio sanguíneo. Já a vacina AMA1-RON 2, apresenta um nível de alta proteção em camundongos BALB/c imunizados, sendo um passo inovador para a geração de uma vacina em estágio sanguíneo. Para a malária placentária, ou seja, para as gestantes, tem-se as vacinas PRIMVAC e PAMVAC, que são baseadas na proteína VAR2CSA. Ambas as vacinas são imunogênicas, tendo altos níveis de anticorpos.

As vacinas bloqueadoras de transmissão vetorial como a Pfs230 e a Pfs25, vêm ganhando cada vez mais espaço nos ensaios clínicos, pois conseguem reduzir em até 80% a densidade de oocistos, tendo a produção de anticorpos que bloqueiam o parasito. Como mencionado acima, o principal objetivo do trabalho era abordar todas as vacinas em desenvolvimento e seus aspectos imunológicos, mostrando que ainda há muito o que estudar e descobrir nesse âmbito, uma vez que é imprescindível se ter vacinas contra a malária distribuídas em larga escala.

Através deste trabalho foi possível compreender os aspectos importantes sobre a doença como ciclo biológico do parasito, epidemiologia, fisiopatologia, manifestações clínicas e desenvolvimento de vacinas, e a partir disso, compreender seu papel, composição, e sua resposta imune no organismo, sempre visando a importância da vacina e seu potencial em salvar vidas.

REFERÊNCIAS

- ALANINE, Daniel GW, et al. Human antibodies that slow erthrocyte invasion potentiate malária-neutralizing antibodies. **Cell**, v. 178, n. 1, p. 216-228, e. 21, 2019. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(19\)30553-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867419305537%3Fshowall%3Dtrue#gr3](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(19)30553-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867419305537%3Fshowall%3Dtrue#gr3). Acesso em: 02 jul. 2022.
- ATAPOUR, Amir et al. A multi-epitope vaccine designed against blood-stage of malaria: na immunoinformatic and structural approach. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-15956-3>. Acesso em: 15 jul. 2022.
- BETTENCOURT, Paulo. Current challenges in the identification of pre-erythrocytic malária vaccine candidate antigens. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 190, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00190/full>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- BIJKER, Else M et al. Novel approaches to whole sporozoite vaccination aganist malaria. **Vaccine**, v. 33, n. 52, p. 7462-7468, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15013857?via%3Dihub>. Acesso em: 14 jul. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde MS. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**, 2005. Disponível em: https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/malaria_diag_manual_final.pdf. Acesso em: 26 fev. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde de A a Z. Malária. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria>. Acesso em: 04 mai. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico da Malária. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**, 2020. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2020/boletim_especial_malaria_1dez20_final.pdf. Acesso em: 13 abr. 2022.
- COLLINS, Katharine A., et al. Enhancing protective immunity to malária with a highly immunogenic vírus-like particle vaccine. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep46621>. Acesso em: 29 jun. 2022.
- COLLINS, Katharine A., et al. Ultra-low dose immunization and multi-component vaccination strategies enhance protection against malária in mice. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-90290-8#Fig4>. Acesso em: 29 jun. 2022.
- CRISTALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS. **Mettler Toledo**. Disponível em: https://www.mt.com/br/pt/home/applications/L1_AutoChem_Applications/L2_Crystallization/protein-crystallization.html. Acesso em: 02 jul. 2022.

DATOO, Mehreen S., et al. Efficacy of a low-dose candidate malária vaccine, R21 in adjuvante Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 397, n. 10287, p. 1809-1818, 2021. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)00943-0/fulltext#gr3](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)00943-0/fulltext#gr3). Acesso em: 30 jun. 2022.

DE GRAAF, Hans, et al. Safety and immunogenicity of ChAd63/MVA Pfs25-IMX313 in a Phase I first-in-human trial. **Frontiers in Immunology**, p. 2823, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.694759/full>. Acesso em: 12 jul. 2022.

DE GREGORIO, Ennio; RAPPUOLI, Rino. From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 505-514, 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri3694.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2022.

DUFFY, Patrick E.; GORRES, J. Patrick. Malaria vaccines since 2000: progress, priorities, products. **npj Vaccines**, v. 5, n. 48, p. 1-9, jun 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41541-020-0196-3.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2022.

FERREIRA, Marcelo Urbano. **Parasitologia Contemporânea**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020. Disponível em: <file:///C:/Users/usuario/Documents/Livros%20de%20microbiologia-virologia-micologia%20e%20parasitologia/Parasitologia%20contempor%C3%A2nea%2020ed.%20-%20www.meulivro.biz.pdf>. Acesso em: 05 mai. 2022.

FRIED, Michal, DUFFY, Patrick E. Designing a VAR2CSA-based vaccine to prevent placental malária. **Vaccine**, v. 33, n. 52, p. 7483-7488, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X1501422X?via%3Dihub>. Acesso em: 06 jul. 2022.

FRIEDMAN-KLABANOFF, DeAnna J. et al. Low dose recombinant full-length circumsporozoite protein-based *Plasmodium falciparum* vaccine is well-tolerated and highly immunogenic in phase 1 first-in-human clinical testing. **Vaccine**, v. 39, n. 8, p. 1195-1200, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X20315905?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jul. 2022.

FRIMPONG A; KUSI KA; OFORI MF e NDIFON W (2018) Novel Strategies for Malaria Vaccine Design. **Frente. Immunol** . 9:2769. doi: 10.3389/fimmu.2018.02769. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02769/full>. Acesso em: 23 jun. 2022.

GAMAIN, Benoît, et al. Progress and insights toward an effective placental malaria vaccine. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 634508, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.634508/full>. Acesso em: 07 jul. 2022.

HEALY, Sara A., et al. Pfs230 yields higher malaria transmission-blocking vaccine activity than Pfs25 in humans but not mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 7, 2021. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/146221#top>. Acesso em: 11 jul. 2022.

HERÓDOTO. Pensar o passado para compreender o presente e idealizar o futuro. **Pensador**. Disponível em: <https://www.pensador.com/autor/herodoto/> Acesso em: 13 fev. 2022.

HILL, Adrian. Malaria vaccine becomes first to achieve WHO-specified 75% efficacy goal. [Entrevista cedida a] Oxford University News & Events. **Oxford University**, 23 abr. 2021. Disponível em: <https://www.ox.ac.uk/news/2021-04-23-malaria-vaccine-becomes-first-achieve-who-specified-75-efficacy-goal>. Acesso em: 26 fev. 2022.

JENNER, Edward. *An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox.* printed, for the author, by Sampson Low...; and sold by Law... and Murray and Hihghley, 1802. Disponível em: <https://collections.nlm.nih.gov/ext/mhl/2559001R/PDF/2559001R.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2022.

JONGO, Said Abdallah et al. Multi-dose priming regimens of PfSPZ vaccine: safety and efficacy against controlled human malaria infection in Equatoguinean adults. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 4, p. 1215, 2022. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tjpm/106/4/article-p1215.xml#d74368024e1034>. Acesso em: 13 jul. 2022.

KAZMIN, Dmitri et al. Systems analysis of protective immune responses to RTS,S malária vaccination in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 9, p. 2425-2430, 2017. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1621489114#fig01>. Acesso em: 28 jun. 2022.

LAURENS, Matthew B. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): na overview. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 16, n. 3, p. 480-489, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2019.1669415>. Acesso em: 27 jun. 2022.

MENDES, Gustavo. É enganoso que a imunogenicidade da CoronaVac ofereça risco. [Entrevista cedida a] Uol Notícias. **Uol Notícias**, 26 jan. 2021. Disponível em: <https://noticias.uol.com.br/comprova/ultimas-noticias/2021/01/26/e-enganoso-que-imunogenicidade-da-coronavac-ofereca-risco.htm#:~:text=O%20que%20C3%A9%20imunogenicidade%3F%20Imunogenicidade%20C3%A9%20a%20capacidade,%28MIP%29%20da%20Universidade%20Federal%20de%20Santa%20Catarina%20%28UFSC%29>. Acesso em: 26 fev. 2022.

MULAMBA, Charles, et al. Evaluation of the Pfs25-IMX313/Matrix-M malaria transmission-blocking candidate vaccine in endemic settings. **Malaria Journal**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2022. Disponível em: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-022-04173-y>. Acesso em: 11 jul. 2022.

NETO, Vicente A. *et. al. Parasitologia: Uma abordagem clínica*. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Disponível em:

file:///C:/Users/usuario/Documents/Livros%20de%20microbiologia-virologia-micologia%20e%20parasitologia/[Parasito]%20Parasitologia%20-%20Amato%20Neto.pdf. Acesso em: 05 mai. 2022.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. Disponível em: file:///C:/Users/usuario/Documents/Livros%20de%20microbiologia-virologia-micologia%20e%20parasitologia/neves_-_parasitologia_humana_-_11ed.pdf. Acesso em: 26 fev. 2022.

NOE, Amy R. et al. Bridging computational vaccinology and vaccine development through systematic identification, characterization, and downselection of conserved and variable circumsporozoite protein CD4 T cell epitopes from diverse *Plasmodium falciparum* strains. **Frontiers in Immunology**, p. 1929, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.689920/full>. Acesso em: 24 jun. 2022.

O QUE É O ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND?. **Netinbag.com**. Disponível em: <https://www.netinbag.com/pt/health/what-is-freunds-complete-adjuvant.html>. Acesso em: 05 jul. 2022.

ORD, Rosalynn L., et al. A malária vaccine candidate based on an epitope of the *Plasmodium falciparum* RH5 protein. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2014. Disponível em: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-13-326>. Acesso em: 02 jul. 2022.

PARK, Sangshin et al. Impacto de maternamente derivadas anticorpos para *Plasmodium falciparum* Schizont Egress Antigen-1 on the endogenous production of anti-PfSEA-1 in offspring. **Vaccine**, v. 37, n. 35, p. 5044-5050, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X19308722?via%3Dihub>. Acesso em: 15 jul. 2022.

RAGOTTE, Robert J; HIGGINS, Matthew K; DRAPER, Simon J. The RH5-CyRPA-Ripr complex as a malária vaccine target. **Trends in parasitology**, v. 36, n. 6, p. 545-559, 2020. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922\(20\)30099-4?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492220300994%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922(20)30099-4?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492220300994%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 02 jul. 2022.

RIEDEL, Stefan. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. **Baylor University Medical Center Proceedings**, Dallas, v. 18, n. 1, p. 21-25, jan. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1200696/pdf/bumc0018-0021.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2022.

SINGH, Kavita, et al. Structure and function of a malaria transmission blocking vaccine targeting Pfs230 and Pfs230-Pfs48/45 proteins. **Communications biology**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s42003-020-01123-9>. Acesso em: 11 jul. 2022.

SRINIVASAN, Prakash, et. al. Immunization with a functional protein complex required for erythrocyte invasion protects against lethal malária. **Proceedings of the National Academy**

of Sciences, v. 111, n. 28, p. 10311-10316, 2014. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1409928111>. Acesso em: 05 jul. 2022.

SULYOK, Zita et al. Heterologous protection against malaria by a simple chemoattenuated PfSPZ vaccine regimen in a randomized trial. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-22740-w>. Acesso em: 13 jul. 2022.

TENTOKAM, Bergeline C. Nguemwo et al. Naturally acquired antibody response to malaria transmission blocking vaccine candidate Pvs230 domain 1. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2295, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02295/full>. Acesso em: 19 jul. 2022.

TINTO, Halidou. Finalmente vacina contra malária é aprovada em ensaios clínicos importantes. [Entrevista cedida a] National Geographic. **National Geographic**, 21 mai. 2021. Disponível em: <https://www.nationalgeographicbrasil.com/ciencia/2021/05/finalmente-vacina-contra-malaria-e-aprovada-em-ensaios-clinicos-importantes>. Acesso em: 13 fev. 2022.

TORNYIGAH, Bernard, et al. *Plasmodium falciparum* VAR2CSA-specific IgG subclasse responses reflect protection against low birth weight and pregnancy-associated malaria. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 610305, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.610305/full>. Acesso em: 07 jul. 2022.

WHITE, Michael T. et al. Immunogenicity of the RTS,S/AS01 malaria vaccine and implications for duration of vaccine efficacy: secondary analysis of data from a phase 3 randomised controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 12, p. 1450-1458, 2015. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(15\)00239-X/fulltext#](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(15)00239-X/fulltext#). Acesso em: 28 jun. 2022.

WHO (World Health Organization). WHO recommends groundbreaking malaria vaccine for children at risk, Geneva, Switzerland, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/06-10-2021-who-recommends-groundbreaking-malaria-vaccine-for-children-at-risk>. Acesso em: 13 fev. 2022.

WHO (World Health Organization). **World malária report 2021**. Geneva, Switzerland, 2021. Disponível em: <file:///C:/Users/usuario/Downloads/9789240040496-eng.pdf> . Acesso em: 13 abr. 2022.

ZAVALA, Fidel et. al. RTS,S: the first malária vaccine. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 132, n. 1, 2022. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/156588>. Acesso em: 27 jun. 2022.