

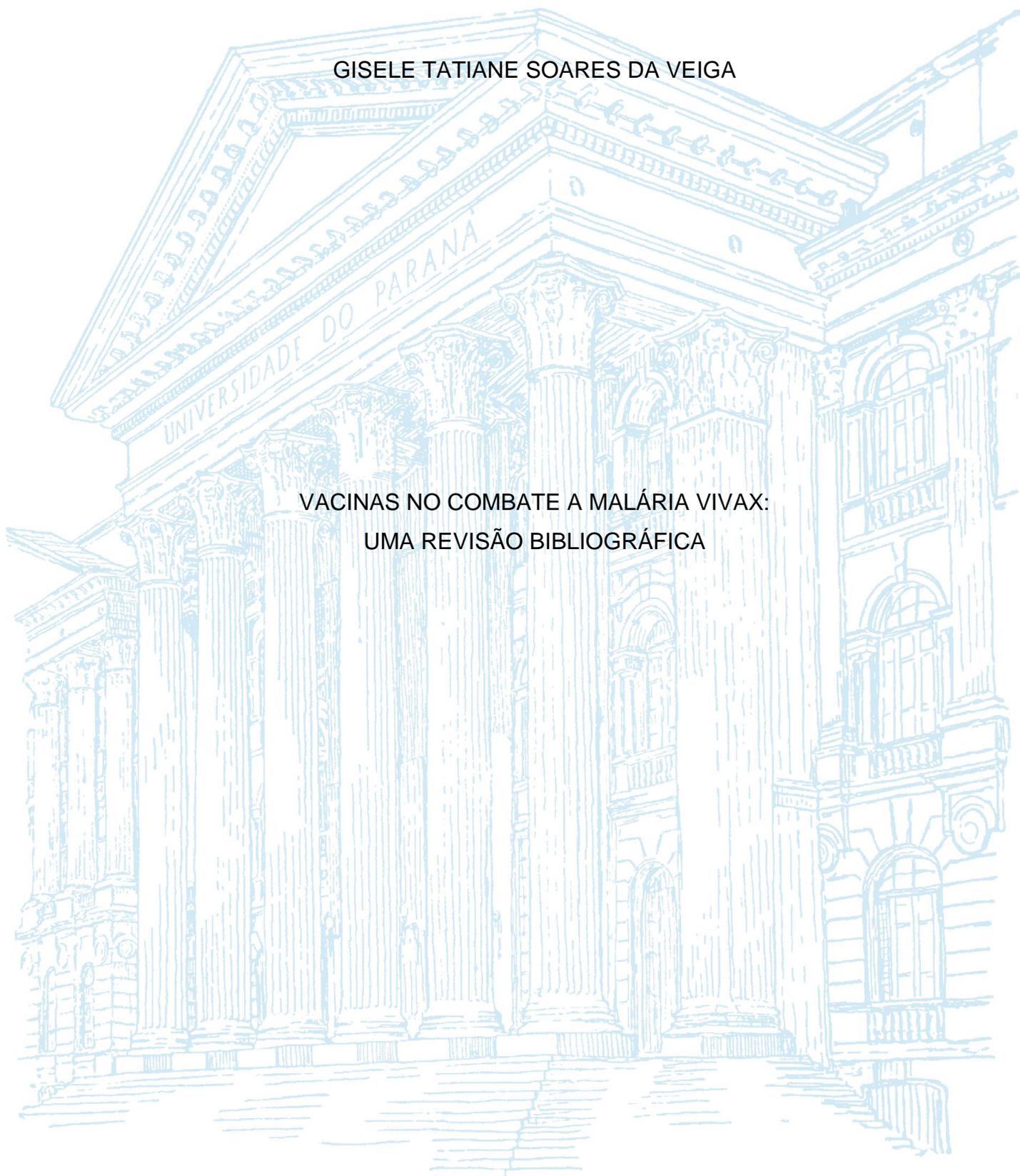
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISELE TATIANE SOARES DA VEIGA

VACINAS NO COMBATE A MALÁRIA VIVAX:  
UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CURITIBA

2021



GISELE TATIANE SOARES DA VEIGA

VACINAS NO COMBATE A MALÁRIA VIVAX:  
UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Ciências Biológicas, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Marcelo Müller-Santos  
Coorientadora: Dra. Letusa Albrecht

CURITIBA

2021

*À minha família, por todo o apoio, amor e incentivo!*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por todas as graças recebidas ao longo da minha vida, pela força e consolação nos momentos difíceis

Aos meus orientadores. Marcelo, por aceitar a minha orientação, contribuir com a realização desse trabalho e com a minha formação acadêmica. Letusa, por me acolher em seu grupo de pesquisa, por todo apoio e amizade. Sou imensamente grata e honrada por fazer parte do seu grupo e admiro muito a pessoa e profissional que és.

A minha família, meu pai Antônio (*in memoriam*) e minha mãe Rosana, por todo o apoio, amor e dedicação. Mãe, sou imensamente grata por ter você em minha vida e por tudo o que você faz por mim, eu te amo infinitamente. Aos meus irmãos, Willian e Patrícia, ao meu cunhado, Felipe, e a minha avó Ana, por todo o apoio e carinho durante toda a minha vida. Amo vocês.

A minha amiga Fernanda, pela amizade e companhia durante todo o curso, por todos os trabalhos em grupo e tudo o que vivenciamos. Sou imensamente grata por ter te conhecido e por ter sua amizade. Agradeço a amizade e todo o apoio das amigas: Carolaine, Letícia, Taina, Sabrina, Katia, Maria, Yasmin, Ingrid, Luiza e todos que estiveram ao meu lado durante toda a minha trajetória.

A todos professores e orientadores que tive durante a minha formação. Sou grata por todo o conhecimento compartilhado, por todo o apoio e incentivo. Em especial, agradeço aos professores Adriana Mercadante e Andrey Andrade por aceitarem participar da Banca de Avaliação desse trabalho e por todo o aprendizado que me oportunizaram.

A UFPR, por me possibilitar um ensino superior gratuito e de qualidade, pelas inúmeras experiências e oportunidades que tive e por ser excelência em tudo o que faz. Sou imensamente grata e honrada por fazer parte dessa Instituição.

Ao Instituto Carlos Chagas (ICC), FIOCRUZ-PR, e a toda equipe da malária, por me receberem de modo tão acolhedor, por todo conhecimento compartilhado e por todo auxílio durante a minha Iniciação Científica.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma me apoiaram, motivaram, incentivaram e sempre estiveram ao meu lado.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

A malária é um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo. Ela é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida durante o repasto sanguíneo da fêmea do mosquito *Anopheles* infectada. As espécies mais prevalentes são o *P. falciparum* e o *P. vivax*. Durante décadas a malária vivax foi negligenciada, portanto, a biologia do *P. vivax* ainda é pouco conhecida e complexa, apresentando alta diversidade genética. Devido a essas características, a identificação e caracterização de novos candidatos vacinais é extremamente dificultada, o que reflete diretamente no atraso no desenvolvimento de vacinas. Contudo, nos últimos anos, o *P. vivax* tem sido associado a diversas complicações, o que têm motivado a busca de novos candidatos. Para isso, são investigadas proteínas específicas expressas nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasito, as quais podem ser classificadas como: i. vacinas de estágio pré-eritrocito; ii. vacinas de estágio sanguíneo e; iii. vacinas de bloqueio de transmissão. Nesse trabalho foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o desenvolvimento de vacinas de estágio pré-eritrocítico e de estágio sanguíneo no combate à malária vivax. Para isso, foram identificados e discutidos os principais candidatos vacinais com o objetivo de analisar os avanços e desafios para obtenção de uma vacina. De acordo com os resultados, apenas seis estudos clínicos foram iniciados, os quais utilizam somente um dos três antígenos em suas formulações: PvCSP, PvDBP e Pvs25. No entanto, observa-se uma baixa eficácia e a indução de uma proteção parcial, com a redução da parasitemia e com o bloqueio parcial da invasão das células hospedeiras. Já em fase pré-clínica são avaliados diferentes sistemas e plataformas vacinais, no entanto, poucos destes candidatos avançarão para a fase clínica. No estágio pré-eritrocítico os principais candidatos são a PvCSP e a PvTRAP, as quais tem apresentado resultados promissores ao induzir a produção de anticorpos que bloqueiam ou reduzem a invasão dos hepatócitos. Já no estágio sanguíneo os principais alvos são as proteínas PvDBP, PvAMA1, PvRBPs e PvMSPs, as quais induzem anticorpos capazes de impedir ou reduzir a invasão dos reticulócitos. Além destas, existem outras candidatas investigadas, ainda pouco caracterizadas, mas que desempenham um papel no processo de invasão do parasito. Entre as maiores dificuldades para a obtenção de uma vacina eficaz está a alta taxa de polimorfismo das proteínas do *P. vivax* e, em consequência, a indução de uma imunidade heterogênea e específica a cepa. No entanto, estratégias como a identificação de epítomos específicos, a imunização heteróloga e a utilização de vacinas com múltiplos antígenos têm apresentado resultados promissores que podem superar algumas dessas limitações. Porém, mais estudos são necessários com o objetivo de identificar os melhores candidatos, sistemas, plataformas e formulações para se obter uma vacina segura e eficaz que possa, de fato, contribuir com a prevenção e controle da malária. No presente estudo foram compilados os principais achados sobre o desenvolvimento de vacinas no combate à malária vivax, que poderão auxiliar futuras investigações.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium vivax*. Vacinas de estágio pré-eritrocítico. Vacinas de estágio sanguíneo.

## ABSTRACT

Malaria is one of the biggest public health problems in the world. It is caused by protozoa of the genus *Plasmodium* and transmitted during the blood repast of the female of the infected *Anopheles*. The most prevalent species are *P. falciparum* and *P. vivax*. For many decades vivax malaria has been neglected, so the biology of *P. vivax* is still little known and complex, presenting high genetic diversity. Due to these characteristics, the identification and characterization of new vaccine candidates is extremely difficult, which directly reflects the delay in the development of vaccines. However, in recent years, *P. vivax* has been associated with several complications, which have motivated the search for new candidates. For this purpose, specific proteins expressed in the different stages of the life cycle of the parasite are investigated, which can be classified as: i. pre-erythrocytic stage vaccines; ii. blood stage vaccines and; iii. transmission blocking vaccines. This work presents a review about the development of pre-erythrocytic and blood stage vaccines against the *Plasmodium vivax*. For this, the main vaccine candidates were identified and discussed to analyze the advances and challenges to obtain a vaccine. According to the results, only six clinical studies were initiated, which used only one of the three antigens in their formulations: PvCSP, PvDBP and Pvs25. However, there is a low efficacy and induction of partial protection, with the reduction of parasitemia and with partial blockage of host cell invasion. In the pre-clinical phase, different vaccination systems and platforms are evaluated, however, few of these candidates will advance to the clinical phase. To the pre-erythrocytic stage, the main candidates are PvCSP and PvTRAP, which have shown promising results in inducing the production of antibodies that block or reduce the invasion of hepatocytes. To the blood stage, the main targets are the proteins PvDBP, PvAMA1, PvRBPs and PvMSPs, which induce antibodies capable of preventing or reducing the invasion of reticulocytes. In addition to these, there are other candidates investigated, still little characterized, but who play a role in the parasite invasion process. Among the greatest difficulties in obtaining an effective vaccine are the high rate of polymorphism of *P. vivax* proteins and, consequently, the induction of a heterogeneous and strain-specific immunity. However, strategies such as the identification of specific epitopes, heterologous immunization and the use of multiantigen vaccines have shown promising results that may overcome some of these limitations. However, further studies are needed to identify the best candidates, systems, platforms and formulations to obtain a safe and effective vaccine that could, in fact, contribute to malaria prevention and control. In this study, the main findings on the development of vaccines against vivax malaria were compiled, which may help future investigations.

Keywords: Malaria. *Plasmodium vivax*. Pre-erythrocytic stage vaccines. Blood stage vaccines.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DA SELEÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS ESTUDOS..	18
FIGURA 2 - CICLO DE VIDA DO <i>Plasmodium vivax</i> .....	22
FIGURA 3 - PROTEÍNAS DE INTERAÇÃO COM RETICULÓCITOS.....	39

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - VACINAS PARA MALÁRIA VIVAX EM FASE CLÍNICA .....	27
---	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 OBJETIVO GERAL .....	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A MALÁRIA.....	20
3.2 CARACTERÍSTICAS DA MALÁRIA VIVAX.....	21
3.3 CICLO DE VIDA DO <i>Plasmodium vivax</i> .....	22
3.4 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS PARA A MÁLARIA .....	23
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>26</b>
4.1 VACINAS DE ESTÁGIO PRÉ-ERITROCÍTICO.....	28
4.1.1 PvCSP.....	28
4.1.2 PvTRAP.....	34
4.2 VACINAS DE ESTÁGIO SANGUÍNEO .....	38
4.2.1 PvDBP.....	39
4.2.2 Família de PvRBP .....	45
4.2.3 PvAMA1 .....	48
4.2.4 Família de PvMSP .....	52
4.2.5 Outros candidatos vacinais .....	59
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A malária é uma das doenças infecciosas mais devastadoras da espécie humana, provocando grande impacto na morbidade e na mortalidade das populações que residem nas regiões endêmicas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, só em 2019 foram registrados 229 milhões de casos, dos quais 409 mil foram a óbito, sendo principalmente crianças africanas menores de cinco anos (WHO, 2020). Além disso, mais de 3 bilhões de pessoas estão diariamente sob risco de infecção nas áreas endêmicas (WHO, 2020). Estas, estão localizadas nas regiões tropicais e subtropicais, onde concentram-se países mais pobres com menor disponibilidade de recursos para atuar frente a doença. A malária é classificada como uma Doença Tropical Negligenciada, no Brasil, é uma das Doenças de Notificação Compulsória. Em 2019, foram notificados cerca de 157 mil casos, dos quais 99,9% ocorreram na Região Amazônica (BRASIL, 2020).

A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida durante o repasto sanguíneo de uma fêmea de *Anopheles* spp. infectada. Existem sete espécies de *Plasmodium* responsáveis pela doença em humanos, dos quais *P. falciparum* e *P. vivax* são responsáveis por mais de 95% dos casos, sendo o primeiro o mais virulento e o mais prevalente e o segundo o principal nas Américas e no Brasil, com a maior distribuição geográfica (GREENWOOD et al., 2008; WHO, 2020). Apesar da ampla distribuição do *P. vivax* ao redor do mundo, esse parasito foi por décadas negligenciado porque acreditava-se que ele era responsável por uma doença mais branda (BAIRD, 2007). Contudo, nos últimos anos diversos estudos tem relatado casos graves relacionados a esta espécie, o que tem despertado investigações a respeito de sua biologia (COSTA et al., 2012; RAHIMI et al., 2014; BOURGARD et al., 2018).

Devido a esse cenário e da necessidade de controlar e eliminar a malária, a busca por novos candidatos vacinais se tornou um dos principais objetivos desses estudos. Infelizmente, após décadas de negligência, o que se observa é um grande atraso no desenvolvimento de vacinas para o *P. vivax* quando comparado com o *P. falciparum*. Além do baixo investimento em pesquisa, o *P. vivax* apresenta um ciclo de vida complexo, o que dificulta o estabelecimento de um sistema cultivo celular *in vitro* e, conseqüentemente, o estudo de potenciais candidatos (MUELLER et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; TOTINO; LOPES, 2017). Não obstante, o parasito é

altamente polimórfico, principalmente nas suas proteínas de superfície, o que facilita a evasão do sistema imune e dificulta a aquisição de uma imunidade coletiva (SU; ZHANG; JOY, 2020; ANTONELLI et al., 2020).

Os principais antígenos utilizados nas formulações vacinais são proteínas expressas especificamente em cada estágio do ciclo de vida do parasito na tentativa de interrompê-lo. Assim, elas podem ser classificadas como: vacinas de estágio pré-eritrocítico, vacinas de estágio sanguíneo e vacinas de bloqueio de transmissão (FRIMPONG et al., 2018). As vacinas de estágio pré-eritrocítico visam impedir a invasão dos hepatócitos e a formação das formas latentes do parasito, prevenindo o estabelecimento de uma infecção primária (WHITE; AMINO; MUELLER, 2017). Já as vacinas de estágio sanguíneo visam interromper a invasão das células sanguíneas, sendo capazes de prevenir os sintomas clínicos da doença (MUELLER; SHAKRI; CHITNIS, 2015). Enquanto que as vacinas de bloqueio de transmissão buscam impedir o desenvolvimento das formas sexuais nos mosquitos buscando evitar ou reduzir a transmissão (CARTER et al., 2000).

Devido a imensa lacuna nos estudos de vacinas para malária vivax e na necessidade de obter uma vacina eficaz contra esse parasito, esse trabalho buscou identificar os principais candidatos vacinais dos estágios pré-eritrocíticos e sanguíneo, analisar seus principais achados e verificar os principais avanços e desafios no desenvolvimento de vacinas para o *P. vivax*, a fim de compilar os dados existentes em uma revisão bibliográfica, que possa auxiliar futuras investigações.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Elucidar o panorama atual do desenvolvimento de vacinas no combate à malária vivax.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar os principais candidatos vacinais contra o *P. vivax*;
- b) Analisar os principais resultados obtidos em estudos pré-clínicos e clínicos;
- c) Verificar as principais estratégias, avanços e desafios no desenvolvimento de vacinas para a malária vivax;
- d) Elaborar uma revisão bibliográfica sobre o tema.

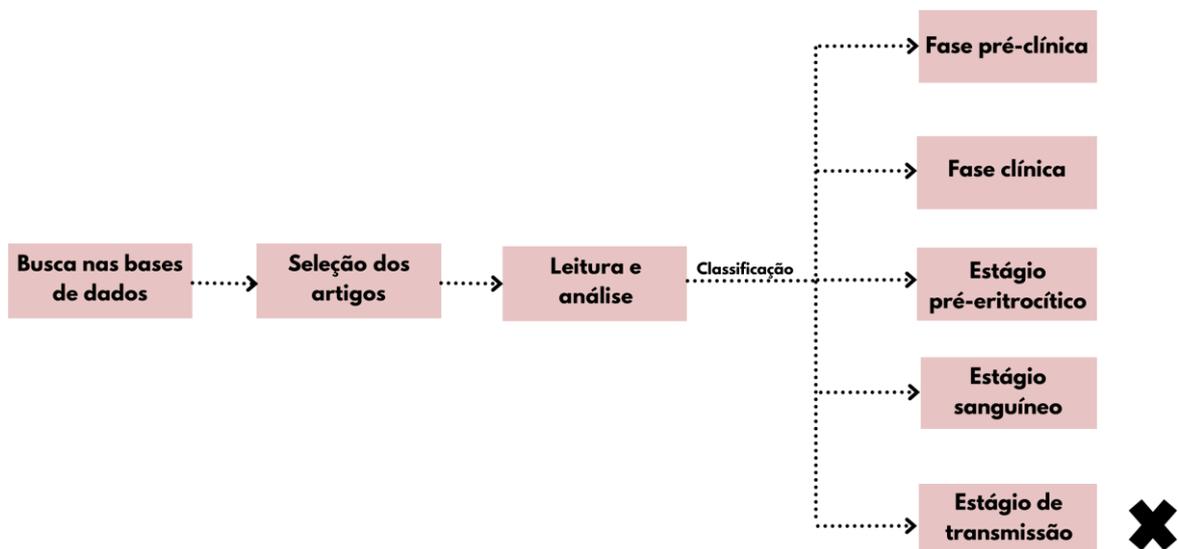
## 2 METODOLOGIA

No presente estudo foi elaborada uma revisão bibliográfica narrativa sobre o estado atual do desenvolvimento de vacinas no combate à malária vivax, tendo como objetivo principal a identificação e descrição dos principais achados científicos nesta área. Inicialmente, foi elaborada uma breve revisão de literatura sobre a epidemiologia, a patologia e o desenvolvimento de vacinas para a malária.

Em seguida, foram realizadas buscas por via eletrônica durante o período de abril a novembro de 2021 nas bases de dados da *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (Medline), *National Library of Medicine* (Pubmed), *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), *Web of Science* e Google Acadêmico, utilizando os termos “vaccine”, “malaria”, “subunit vaccines” e “*Plasmodium vivax*”. Foram selecionados tanto revisões bibliográficas como trabalhos experimentais, que apresentavam informações estatísticas ou históricas relevantes e condizentes, e principalmente, aqueles desenvolvidos nos últimos 5 anos.

De acordo com essa seleção, os artigos foram classificados como estudos pré-clínicos e estudos clínicos com o objetivo de verificar o avanço no desenvolvimento de vacinas para a malária vivax. Além disso, os estudos foram classificados de acordo com as diferentes etapas do ciclo de vida do *P. vivax*. A FIGURA 1 ilustra o fluxograma para a seleção e classificação dos estudos.

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DA SELEÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS ESTUDOS



FONTE: A autora (2021).

Neste trabalho, foram apresentados apenas os candidatos a vacinas de estágio pré-eritrocítico e de estágio sanguíneo. Uma vez que essas vacinas são desenvolvidas com o intuito de bloquear a infecção e impedir o aparecimento dos sintomas clínicos, respectivamente, evitando os efeitos patológicos no hospedeiro. Em contrapartida, as vacinas de bloqueio de transmissão têm como objetivo evitar a fertilização e desenvolvimento das formas sexuais no vetor e não tem como foco proteger o indivíduo da infecção. Por isso, os trabalhos sobre vacinas de bloqueio de transmissão foram excluídos das análises e discussões.

Após as devidas classificações e leitura dos artigos, foram apresentados e descritos seus principais resultados e conclusões. Finalmente, após a identificação e descrição de cada candidato, foi realizada uma breve conclusão sobre o estado atual do desenvolvimento de vacinas para a malária vivax e suas principais limitações e estratégias. Como resultado, foi elaborado um artigo científico, que até o presente momento não foi submetido para publicação.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A MALÁRIA

A malária é uma Doença Tropical Negligenciada, sendo um dos principais problemas de saúde pública mundial e responsável por diversos impactos sociais e econômicos. As regiões endêmicas se localizam em áreas tropicais e subtropicais, como África Subsaariana, Sudeste Asiático, Mediterrâneo Oriental, Pacífico Ocidental e América, onde as condições climáticas propiciam o desenvolvimento do agente etiológico e do vetor (SNOW et al., 2005; WHO, 2020). Nessas regiões concentram-se países mais pobres com menor disponibilidade de recursos para atuar frente a doença, motivo pelo qual acaba sendo ainda mais negligenciada.

A infecção é provocada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida durante o repasto sanguíneo da fêmea do mosquito *Anopheles* spp. infectada. Em humanos, sete espécies de *Plasmodium* spp. podem ser responsáveis pela doença, são eles: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgy* e *P. simium*. Destes, o *P. falciparum* e o *P. vivax* são responsáveis pela imensa maioria dos casos, em que o primeiro está associado a maior virulência enquanto que o segundo é o mais distribuído geograficamente (GREENWOOD et al., 2008; WHO, 2020).

Os primeiros sintomas da infecção aparecem cerca de 10 a 15 dias após a picada do mosquito, como febre aguda, dor de cabeça e calafrios, sendo, portanto, de difícil reconhecimento. Se não for tratada adequadamente pode progredir para uma doença grave e inclusive à óbito. Entre os sintomas mais graves estão a anemia grave, síndrome respiratória, malária cerebral e falência de múltiplos órgãos. Nas áreas endêmicas podem ocorrer múltiplas infecções em um mesmo indivíduo e o desenvolvimento de uma imunidade parcial, permitindo a ocorrência de infecções assintomáticas. Alguns grupos populacionais tais como recém-nascidos, crianças, grávidas e imunossuprimidos constituem grupos de maior risco de contrair uma doença grave e progredir ao óbito (WHO, 2020).

Os maiores desafios relacionadas ao controle e eliminação da malária estão relacionadas com a ausência de políticas públicas eficientes; o declínio no investimento em pesquisas; a resistência aos inseticidas e medicamentos; a

toxicidade dos antimaláricos existentes; as lacunas sobre a biologia dos parasitos; a dificuldade de controle e eliminação dos vetores; a ausência de testes diagnósticos sensíveis e rápidos e a ausência de uma vacina segura e eficaz contra as diferentes formas de vida e espécies de *Plasmodium* spp. (KROGSTAD, 1996; ALONSO; TANNER, 2013).

### 3.2 CARACTERÍSTICAS DA MALÁRIA VIVAX

Por muito tempo a malária causada pelo *P. vivax* foi negligenciada, uma vez que não havia relatos associados à gravidade, tal como havia para o *P. falciparum*, e, portanto, ele não era o foco dos estudos. Contudo, nos últimos anos, o *P. vivax* tem se destacado devido aos grandes impactos econômicos, sociais e de saúde pública nas áreas endêmicas (PRICE et al., 2007), principalmente pelo aparecimento de complicações como anemia grave, malária cerebral, trombocitopenia, síndrome respiratória aguda, entre outros (BOURGARD et al., 2018).

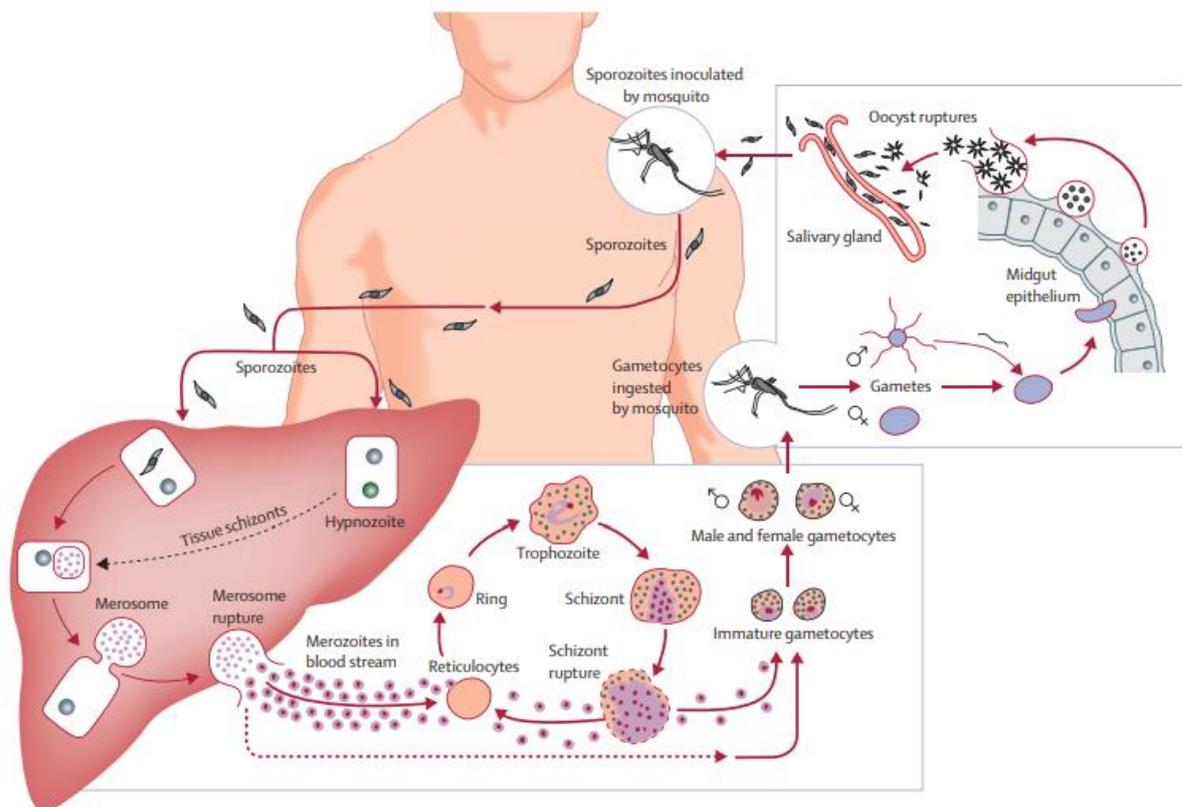
Além disso, diversos estudos demonstraram a capacidade desse parasito em citoaderir ao endotélio do hospedeiro e de formar rosetas. Rosetas são caracterizadas pela adesão do eritrócito infectado à eritrócitos não infectados, formando agregados celulares que interferem na microcirculação sanguínea (COSTA et al., 2012; BITTENCOURT; BERTOLLA; ALBRECHT, 2021). Suspeita-se que esses fenótipos adesivos possam contribuir para o agravamento da doença, tal como ocorre nas infecções com *P. falciparum* (COSTA et al., 2012; PRICE et al., 2020).

O *P. vivax* apresenta um complexo ciclo de vida e uma alta diversidade genética, apresentando alta taxa de polimorfismos em suas proteínas, em particular nas proteínas de superfície. Essas características propiciam uma grande capacidade de evasão ao sistema imune do hospedeiro. Com a exposição de diferentes antígenos o sistema imune não produz anticorpos de maneira eficientemente rápida para eliminá-lo (ANTONELLI et al., 2020). Uma das consequências disso é que as respostas imunes são heterogêneas entre os pacientes com malária, dificultando o desenvolvimento de uma imunidade coletiva (SU; ZHANG; JOY, 2020). Essas características são alguns dos desafios para o desenvolvimento e obtenção de vacinas eficazes contra o parasito.

### 3.3 CICLO DE VIDA DO *Plasmodium vivax*

O ciclo de vida do *P. vivax* caracteriza-se como um ciclo heteroxênico, isto é, necessita de dois hospedeiros para o seu completo desenvolvimento. No hospedeiro invertebrado (*Anopheles* spp.) ocorre a fase sexuada, e no hospedeiro vertebrado, (*Homo sapiens sapiens*) ocorre a fase assexuada do ciclo, como representado na FIGURA 2.

FIGURA 2 - CICLO DE VIDA DO *Plasmodium vivax*



FONTE: MUELLER et al. (2009).

LEGENDA: O ciclo do *Plasmodium vivax* pode ser dividido em três etapas principais, como ilustrado na figura: I) a infecção hepática, II) a infecção sanguínea; e III) a infecção da fêmea de *Anopheles* sp. (ou estágio sexual).

Durante o repasto sanguíneo da fêmea de *Anopheles* spp. infectada, os esporozoítos são inoculados no sistema circulatório humano e rapidamente são direcionados para o fígado. Neste órgão, ocorre a invasão dos hepatócitos e se inicia a esquizogonia para a formação de merozoítos. Alguns esporozoítos se diferenciam em hipnozoítos, que são formas latentes responsáveis por inúmeras recaídas, mesmo

após anos da infecção. Após a diferenciação, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, onde invadem seletivamente os reticulócitos, o que facilita a evasão do sistema imune. Estas células correspondem a menos de 2% do total de eritrócitos no sangue, conseqüentemente, a doença é caracterizada por uma baixa parasitemia, e isso constitui uma das principais dificuldades para cultivar o parasito *in vitro*. Essa fase é a principal responsável pelos sintomas clínicos característicos da malária, devido a ruptura das hemácias. Nessas células ocorre nova diferenciação em formas de anéis e, posteriormente, em trofozoítos. Alguns trofozoítos se diferenciam em novos merozoítos e outros em gametócitos femininos e masculinos, que permanecem na circulação sanguínea. Caso ocorra um novo repasto sanguíneo essas formas são ingeridas pelo anofelino. No mosquito, ocorre a fusão dos gametócitos originando os oocinetos no intestino médio. Estes por sua vez, invadem o epitélio intestinal e darão origem aos oocistos, os quais se diferenciam em esporozoítos na glândula salivar e podem iniciar um novo ciclo de infecção (GREENWOOD et al., 2008; PHILLIPS et al., 2017; ADAMS; MUELLER, 2017).

O tratamento indicado pelo Ministério da Saúde tem como objetivo interromper o ciclo evolutivo do parasito. Para isso, utiliza-se a combinação de dois medicamentos: cloroquina e primaquina, que atuam na eliminação das formas sanguíneas e das formas hepáticas (hipnozoíto), e assim podem prevenir a recrudescência e a recaída, respectivamente (BRASIL, 2020). No entanto, apesar de serem uma das principais estratégias para controle da doença, esses medicamentos estão relacionados a uma alta toxicidade e podem contribuir para a seleção de parasitos resistentes (BRASIL, 2020). Por esse motivo, o estudo de potenciais candidatos vacinais é fundamental.

### 3.4 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS PARA A MÁLARIA

O desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra a malária é considerado uma das estratégias mais relevante para prevenção e controle da doença. Nas últimas décadas tem-se buscado candidatos capazes de interromper as diferentes etapas do ciclo de vida do parasito, a fase pré-eritrocítica (direcionada aos esporozoítos e formas hepáticas), a fase eritrocítica (direcionada aos merozoítos) e a fase de transmissão (direcionado as formas sexuais) de acordo com os antígenos

específicos expressos em cada estágio (FRIMPONG et al., 2018; KURTOVIC et al., 2021). Dessa forma, as vacinas são classificadas como i. vacinas de estágio pré-eritrocítico; ii. vacinas de estágio sanguíneo e; iii. vacinas de bloqueio de transmissão.

A maioria das investigações sobre vacinas maláricas são direcionadas ao combate do *P. falciparum*, já que este é o mais virulento e o mais prevalente. Conseqüentemente, o desenvolvimento de vacinas para a malária falciparum está muito mais avançado do que em relação a malária vivax. Inclusive, para este parasito já existe uma vacina aprovada para imunização de crianças menores de cinco anos, a RTS,S. Essa vacina foi aprovada para uso emergencial nas regiões mais acometidas pela malária falciparum com o objetivo de diminuir a mortalidade infantil provocada pela doença, o que, de fato, tem sido observado (LAURENS, 2020).

A RTS,S é uma vacina recombinante quimérica, de estágio pré-eritrocítico, constituída pela proteína de superfície do circunsporozoítio (CSP) fusionada a uma sequência do envelope viral da hepatite B (HBsAg) (LAURENS, 2020). Nos primeiros estudos clínicos de fase III, foi observado uma eficácia, após 4 doses da vacina, de 25,9% em recém-nascidos (6 a 12 semanas) e 36,3% em crianças (5 a 17 meses), em média, durante 48 meses contra episódios clínicos de malária (RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP, 2015). Infelizmente, após 7 anos de acompanhamento, a eficácia dessa vacina diminuiu drasticamente, para cerca de 4,4% (OLOTU; FEGAN; WAMBUA, 2016). No entanto, recentemente, uma nova formulação vacinal contendo a CSP fusionada a uma porção menor da sequência viral, a R21, tem apresentado resultados animadores em estudos clínicos, com cerca de 76% de eficácia (DATOO et al., 2021). Possivelmente, muito em breve, essa vacina será utilizada no combate ao *P. falciparum*. Além dessas candidatas, existem diversos outros estudos clínicos e pré-clínicos que tem apresentado resultados promissores (DRAPER et al., 2018; ZHENG et al., 2019; KURTOVIC et al., 2021). Ao contrário do que tem se observado para a malária vivax. Neste caso, existem poucos candidatos em investigação e nenhuma vacina aprovada.

Diversos são os fatores que contribuíram para esse atraso. Além de décadas de negligência e baixo investimento em pesquisa, que culminaram numa imensa lacuna no conhecimento sobre a biologia do *P. vivax*, esse parasito apresenta uma alta complexidade. Um dos principais obstáculos é a dificuldade de estabelecer um sistema de cultivo celular *in vitro* de longa duração, que além de dificultar a identificação de potenciais candidatos, também dificulta a realização de ensaios

clínicos (MUELLER et al., 2009; REYES-SANDOVAL, 2021). Uma das estratégias mais eficientes adotadas para o estudo de candidatos para a malária vivax é a vacinologia reversa. Essa metodologia permite a identificação *in silico* de proteínas antigênicas e imunogênicas para posterior caracterização em sistema recombinante heterólogo e utilização em sistemas de imunização para análise da resposta de anticorpos (PATARROYO; ARÉVALO-PINZÓN; MORENO-PÉREZ, 2020).

As vacinas de estágio pré-eritrocítico e de estágio sanguíneo são vacinas desenvolvidas com o intuito de bloquear a infecção e impedir o aparecimento dos sintomas clínicos, respectivamente, evitando os efeitos no hospedeiro. Em contrapartida, as vacinas de bloqueio de transmissão não têm como objetivo proteger o indivíduo da infecção. Por esse motivo, no presente estudo, foram compilados os principais achados sobre o desenvolvimento de vacinas de estágio pré-eritrocítico e de estágio sanguíneo para a malária vivax, buscando analisar o estado da arte e elaborar uma revisão bibliográfica que possa auxiliar futuras investigações.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção de uma vacina segura e eficaz contra o *P. vivax* tem se tornado, cada vez mais, um dos principais objetivos para controle e eliminação da malária, dada a amplitude de sua distribuição geográfica e aos severos impactos sociais, econômicos e de saúde pública. Em geral, os pesquisadores buscam identificar candidatos conforme o que já se conhece para o *P. falciparum*, utilizando as proteínas ortólogas.

Diante da dificuldade para cultivar este parasito, a vacinologia reversa é a principal estratégia de estudo. Por meio dela, após diversas análises ômicas e de bioinformática são avaliadas e selecionadas as proteínas de interesse, ou epítomos específicos, para expressão em sistema recombinante heterólogo e caracterização *in vitro*. Para a expressão são utilizados organismos procariotos, como a *Escherichia coli*, ou eucariotos, como a *Pichia pastoris*. Após a expressão e purificação dessas proteínas são realizados ensaios *in vitro* a fim de analisar sua interação com as células hospedeiras ou são utilizadas em sistema de imunizações para avaliar a resposta imune e a eficácia por meio de desafios com parasitos transgênicos.

As formulações vacinais variam de acordo com cada estudo. São compostas pelo antígeno e o adjuvante, os quais são substâncias capazes de ampliar a estimulação do sistema imunológico (como as saponinas e os ligantes de *toll-like receptor*) ou atuar como sistema de entrega (como os vetores virais, as nanopartículas e as emulsões). Existem diferentes maneiras de apresentação e entrega desses antígenos. Para a malária vivax, já foram descritas vacinas de subunidades, de vetores virais recombinantes (principalmente de adenovírus e de Vaccinia Ankara vírus), de partículas virais (VLP), de DNA, de peptídeos longos sintéticos (LSP) e de parasito inteiro irradiado (RAS). Além disso, existem diferentes estratégias de imunizações. Um dos sistemas utilizados é o de *prime-boost* heterólogo, em que se utilizam diferentes tipos de vacinas na primeira dose e no reforço. Outra metodologia é a imunização com vacinas multiantigênicas, que agregam mais de um antígeno em sua composição ou que são direcionadas às diferentes etapas do ciclo de vida.

Para o desenvolvimento de uma vacina eficaz, espera-se dessas formulações tanto a indução de uma resposta humoral como de uma resposta celular. A resposta de anticorpos é fundamental para o reconhecimento e eliminação dos parasitos circulantes no sistema sanguíneo e a resposta celular é necessária para a eliminação

dos hepatócitos infectados pela ação das células T citotóxicas (ANTONELLI, 2020). Dessa maneira, os estudos de vacinas avaliam tanto a indução de respostas do tipo Th1, relacionada a resposta celular, como a resposta do tipo Th2, relacionada a resposta humoral, buscando obter uma vacina capaz de induzir uma resposta Th1/Th2 balanceada (ANTONELLI, 2020).

De acordo com a plataforma “ClinicalTrials.gov”, existem apenas três proteínas de *P. vivax* como candidatas vacinais em estudos clínicos, são elas: a PvCSP (vacina de estágio pré-eritrocítico), a PvDBP (vacina de estágio sanguíneo) e a Pvs25 (vacina de bloqueio de transmissão), cuja descrição e identificação consta na TABELA 1. Esses estudos ainda estão em fases iniciais, I ou II e, de modo geral, apesar de induzirem uma resposta de anticorpos, apresentam uma baixa eficácia e uma proteção parcial, conforme será discutido nos próximos tópicos.

TABELA 1 - VACINAS PARA MALÁRIA VIVAX EM FASE CLÍNICA

Candidato	Fase	Descrição	Identificação	Período
VMP001	I/IIa	PvCSP recombinante com adjuvante AS01B. Redução da parasitemia, 0% de eficácia.	NCT01157897	2010 - 2019
PvCSP-LPS (N, R&C)	Ib/II	PvCSP derivada de peptídeos longos sintéticos (LSP) com adjuvantes Montanide ISA 720 e 51. Resposta de anticorpos longa e duradoura, com 36,6% de eficácia em voluntários <i>naive</i> .	NCT0108184 NCT02083068 NCT04739917	2010 - em andamento
PvRAS	I/IIa	Esporozoíto inteiro irradiado de <i>P. vivax</i> . Fraca resposta celular e 42% de eficácia.	NCT01082341	2010 - 2018
ChAd63/MVA-PvDBP-II	Ia/IIa	<i>Prime-boost</i> heterólogo com vetores virais recombinantes (ChAd63-MVA-PvDBP-II). Indução de anticorpos capazes de inibir a interação com reticulócitos, resposta humoral e celular, 50% de imunidade cepa-transcendente.	NCT01816113 NCT04009096	2013 - em andamento
PvDBP-II-GLA-SE	I	PvDBP-II recombinante com adjuvante GLA-SE. Alta produção de anticorpos específicos, capazes de inibir a interação com reticulócitos e resposta cepa-transcendente.	CTRI/2016/09/007289	2016 - 2017
Pvs25	I	Pvs25 recombinante com adjuvantes Montanide ISA 51. Boa indução de anticorpos e redução de 30% no número de mosquitos infectados. Alta reatogenicidade.	NCT00295581	2006 - 2017

FONTE: ClinicalTrials.gov (2021).

Em relação aos estudos pré-clínicos existem estudos utilizando diferentes candidatos, plataformas e sistemas de imunização. No entanto, poucos desses candidatos avançam para a etapa clínica devido à baixa eficácia e as dificuldades de avaliação clínica. Dessa forma, o desenvolvimento de novos estudos e a identificação de novos candidatos é fundamental. Os principais candidatos de estágio pré-eritrocítico e de estágio sanguíneo, são discutidos nos tópicos seguintes.

#### 4.1 VACINAS DE ESTÁGIO PRÉ-ERITROCÍTICO

Os principais alvos das vacinas de estágio pré-eritrocítico são as proteínas de superfície dos esporozoítos. Essas vacinas podem reduzir infecções primárias ao prevenir a invasão dos hepatócitos e o estabelecimento dos hipnozoítos no fígado. Dessa maneira, pode bloquear a infecção e diminuir o risco de recaídas e de transmissão (WHITE; AMINO; MUELLER, 2017). Atualmente, os principais antígenos candidatos dessa etapa são a proteína de superfície do circunsporozoíto (CSP) e a proteína anônima relacionada à trombospondina (TRAP), as quais têm sido utilizadas em diferentes plataformas vacinais. Além dessas candidatas, existe uma vacina de esporozoíto inteiro irradiado (PvRAS), no entanto, a eficácia dessa vacina foi de apenas 42% (ARÉVALO-HERRERA et al., 2016) e a indução de resposta celular e humoral foi muito menor do que se observa com as vacinas de subunidades. Um dos maiores obstáculos para as vacinas de estágio pré-eritrocítico é a presença de hipnozoítos latentes no fígado. Logo, a identificação e caracterização de antígenos derivados dessas formas, tal como a proteína 2 específica do fígado (PvLISP-2), poderia ser uma excelente estratégia para o desenvolvimento de vacinas (GUPTA et al., 2019).

##### 4.1.1 PvCSP

A principal candidata dessa etapa é a proteína de superfície do circunsporozoíto (PvCSP). Essa proteína é formada por três domínios: região N-terminal e C-terminal, que são duas sequências conservadas não repetitivas, e a região central, que contem sequências de repetição *in tandem* e são descritas três variantes, a VK210, a VK247 e a *P. vivax*-like (ARNOT et al., 1985; ROSENBERG et al., 1989; QARI et al., 1993). Ela é expressa na superfície dos esporozoítos e nos

estágios hepáticos iniciais e atua na formação dos esporozoítos, na invasão dos hepatócitos e da glândula salivar dos mosquitos (SINNIS; NARDIN, 2002). Assim, as vacinas derivadas de CSP podem fornecer uma alta proteção e uma resposta duradoura que previne uma infecção inicial e o estabelecimento de uma infecção latente (BENNETT et al., 2016).

Um estudo avaliou a eficácia da PvCSP na vacina VMP001 em associação com o adjuvante AS01B. Essa vacina consiste em uma proteína quimérica que incorpora as regiões N e C terminais e uma curta sequência derivada das variantes VK210 e VK247 (YADAVA et al., 2007). Os resultados dos estudos pré-clínicos demonstraram uma proteção estéril em *Aotus nancymaae* e uma alta indução de anticorpos específicos (YADAVA et al., 2014). No entanto, esse nível de proteção não foi observado nos estudos clínicos de fase I. Nesse estudo, verificou-se uma redução no tempo de parasitemia e uma associação entre a presença de anticorpos específicos e a redução do período pré-patente (BENNETT et al., 2016). Infelizmente, esse estudo demonstrou baixos níveis de eficácia, mas impulsionou o desenvolvimento de novas investigações. Yadava e Waters (2017), discutem que a alta resposta observada nos estudos pré-clínicos possivelmente foram provocados pelos fortes adjuvantes utilizados, então, novos estudos com diferentes formulações e outras plataformas vacinais são necessários.

Moon et al. (2012), conjugaram a proteína recombinante da vacina VMP001 a nanopartículas de poli(ácido lactídeo-coglicolídeo) com envelope lipídico (PLGA) na tentativa de melhorar a eficácia dessa vacina. Esse sistema induziu um alto título e duração de anticorpos antígeno-específicos e uma resposta balanceada do tipo Th1 e Th2 em camundongos (MOON et al., 2012). Segundo os autores, esses anticorpos podem aumentar a avidéz e afinidade aos domínios da PvCSP, o que está relacionado com uma maior proteção e adesão aos esporozoítos vivos. De acordo com esses resultados, as nanopartículas são promissoras como sistema de entrega e poderiam ser uma estratégia oportuna para aumentar a eficácia das vacinas de subunidades, contudo, os estudos ainda são preliminares.

Ainda na tentativa de melhorar a eficácia das vacinas derivadas de PvCSP e comparar a imunogenicidade com a VMP001, um ensaio foi desenvolvido com a vacina CSV-S, S. Essa vacina contém a mesma sequência da proteína recombinante da vacina VMP001, mas fusionada a uma partícula viral de hepatite B. Os resultados mostraram que ambas as vacinas foram capazes de induzir uma forte resposta celular

e humoral nos estudos pré-clínicos (VANLOUBBEECK et al., 2013). No entanto, a nova formulação foi melhor ao induzir títulos mais altos de anticorpos.

Salman et al. (2017), avaliaram uma formulação utilizando a plataforma *virus-like particles* (VLP) para apresentação do antígeno PvCSP, chamada Rv21. Essa vacina consiste em uma fração da vacina CSV-S,S com uma menor proporção da partícula viral de hepatite B, fusionada a uma sequência das variantes VK210 e VK247, expressa em *Pichia pastoris*. A vacinação foi associada ao adjuvante Matrix-M, como resultado foi observado a indução de uma proteção estéril e duradoura após o desafio com esporozoítos, mesmo em doses muito baixas. Além disso, após a imunização, os anticorpos contra ambas as variantes foram capazes de reconhecer a PvCSP na superfície dos esporozoítos nativos de *P. vivax* (SALMAN et al., 2017). Devido aos resultados promissores dessa vacina, ela está em fase de aprovação para iniciar os estudos clínicos e provavelmente será uma das principais vacinas antimaláricas. Importante ressaltar que quando foi administrada em conjunto com a proteína anônima relacionada a trombospondina (PvTRAP), em uma vacina multiantigênica, os resultados foram ainda melhores (ATCHESON et al., 2018).

Para avaliar a eficácia de uma vacina multiantigênica contra as três variantes da PvCSP, Gimenez et al. (2017), construíram diferentes proteínas recombinantes baseadas nas sequências de VK210, VK247, e *P. vivax-like*, e expressaram em *Pichia pastoris*. Uma das proteínas obtidas foi chamada de *yPvCS-All epitopes*, que continha epítomos das três variantes e a região C-terminal. Esse polipeptídeo híbrido foi utilizado na imunização de camundongos em conjunto com o adjuvante Poly (I: C). Foi observado uma forte indução de resposta humoral, mas uma baixa resposta celular, contra as três regiões repetitivas e a região C-terminal. Além disso, foi observada uma redução da presença de parasitos no fígado (GIMENEZ et al., 2017). Esse estudo indicou que apenas uma proteína é capaz promover uma proteção contra diferentes variantes da PvCSP, o que facilitaria o reconhecimento dos esporozoítos pelo sistema imune.

De maneira similar, De Camargo et al. (2018), avaliaram duas proteínas recombinantes multialélicas, chamadas: *yPvCSP-All<sub>CT</sub>* (contendo a região C-terminal) e *yPvCSP-All<sub>NL</sub>* (contendo as regiões N e C-terminal), ambas com alelos das regiões das três variantes de PvCSP. Quando utilizadas na imunização, tanto com os adjuvantes Poly (I: C) e Montanide ISA720, foi observada uma alta indução de anticorpos IgG. Além disso, foi avaliado a eficácia dessas formulações, com Poly (I:

C), em um sistema homólogo e heterólogo de imunização. Em ambos os sistemas, a imunização conferiu proteção e reduziu o tempo de parasitemia em camundongos quando desafiados com esporozoítos *P. berghei* transgênicos expressando a CSP de *P. vivax* (DE CAMARGO et al., 2018).

Outro estudo construiu duas proteínas recombinantes, ambas contendo as regiões N e C flanqueando uma região de repetição truncada do VK210/VK247, chamada rPvCS127, ou VK247/VK210, chamada rPvCS712 (SHABANI et al., 2017). Essas proteínas foram reconhecidas por anticorpos monoclonais e pelo soro de pacientes infectados com *P. vivax*. Além disso, os anticorpos produzidos pela imunização dos camundongos foram capazes de reconhecer a proteína nativa na superfície dos esporozoítos de *P. vivax* (SHABANI et al., 2017). Esses resultados motivaram novos estudos de imunogenicidade com diferentes adjuvantes. Nesses estudos, ambas as proteínas foram testadas com os adjuvantes: Naloxano (NLX), oligodeoxinucleotídeos (CpG-ODNs) e saponina derivada de *Quillaja saponaria* (QS21), sozinhos ou em combinação, na imunização de camundongos (SHABANI et al., 2019). De acordo com os resultados, todas as proteínas e adjuvantes foram capazes de induzir uma forte resposta imune, com a produção de anticorpos antígeno-específicos e resposta celular. Quando a imunização foi realizada com uma das proteínas e a combinação de todos os adjuvantes, a resposta de IgG2b, IgG2c e IFN- $\gamma$  foi mais alta. Por outro lado, quando administrados individualmente, os adjuvantes CpG e QS21 induziram uma resposta maior de avidéz de anticorpos do que o NLX. Além disso, a proteína PvCS712 induziu uma resposta humoral maior do que a PvCS127 (SHABANI et al., 2019).

Marques et al. (2020) desenvolveram uma vacina derivada da proteína do nucleocapsídeo viral da caxumba (NP). Para isso, as variantes alélicas de PvCSP (VK210, VK247 e *P. vivax*-like) foram fusionadas com essa proteína do NP na ausência (NLP-CSP<sub>R</sub>) e na presença (NLP-CSP<sub>CT</sub>) do domínio conservado C-terminal. Após a imunização dos camundongos, em combinação com o adjuvante Poly (I: C), foi observado uma alta indução de IgG contra as diferentes variantes, especialmente com a vacina NLP-CSP<sub>CT</sub> (MARQUES et al., 2020). Além disso, essa vacina foi capaz de induzir a produção de anticorpos tanto contra as regiões repetitivas como contra as regiões não-repetitivas, o que não foi observado com a NLP-CSP<sub>R</sub> (MARQUES et al., 2020). Neste estudo também foi avaliado a proporção de células secretoras de anticorpos antígeno-específicos (ASCs) no baço e na medula óssea dos

camundongos imunizados (MARQUES et al., 2020). Em geral, foi observado um aumento do número de ASCs específico para NLP-CSP<sub>CT</sub> e para algumas porções específicas da proteína no baço e na medula óssea após a terceira imunização (MARQUES et al., 2020). Segundo os autores, isso contribui para a geração de uma resposta imune prolongada e duradoura, sendo, portanto, fundamental a terceira imunização para a geração da memória imunológica. Finalmente, a eficácia da vacina foi avaliada por meio de um desafio com esporozoítos Pb/PvVK210 transgênicos. De acordo com o estudo, foi observado uma diminuição da parasitemia e aproximadamente 30% dos camundongos que foram imunizados adquiriram uma proteção estéril (MARQUES et al., 2020). Recentemente, Gimenez et al. (2021) investigaram a eficácia das vacinas NLP-CSP<sub>CT</sub> e NLP-CSP<sub>R</sub> contra as outras variantes (VK247 e *P. vivax*-like) que não foram avaliadas no estudo anterior. Para isso, os camundongos foram imunizados, em um sistema de imunização *prime-boost* homólogo, com três doses das proteínas recombinantes, na presença de Poly (I:C) ou Montanide ISA750 como adjuvantes e, posteriormente, foram desafiados com parasitos transgênicos Pb/PvVK210, Pb/PvVK247 e Pb/PvCSP-like G10 (GIMENEZ et al., 2021). O estudo revelou uma alta indução de anticorpos IgG contra as três variantes do parasito, a qual intensificou-se após a segunda e a terceira dose, em todas as formulações vacinais. No entanto, na presença do adjuvante Montanide ISA750 a resposta foi significativamente maior. Além disso, após o desafio foi observado um efeito protetor e uma redução significativa da parasitemia nos camundongos imunizados em relação aos controles (GIMENEZ et al., 2021). Esses resultados indicam que essas candidatas são promissoras.

Atcheson e Reyes-Sandoval, utilizaram uma plataforma viral baseada na partícula Q $\beta$  buscando maximizar e testar a eficácia de peptídeos derivados de PvCSP. Foram identificados e testados diferentes epítomos de VK210 e VK247 e aqueles mais imunogênicos foram selecionados e inseridos na partícula Q $\beta$  para imunização de camundongos (ATCHESON; REYES-SANDOVAL, 2020). Um tetrâmero, chamado AGDR, pertencente a uma região da cepa VK210, é alvo de anticorpos neutralizantes e foi o único epítomo capaz de gerar anticorpos que reconhecem a PvCSP nativa (ATCHESON; REYES-SANDOVAL, 2020). Além disso, foi capaz de conferir 100% de proteção contra um desafio homólogo. Diferentemente, os epítomos derivados das regiões N e C terminal não foram capazes de conferir proteção (ATCHESON; REYES-SANDOVAL, 2020). A vacina Q $\beta$ -(AGDR) foi testada

em combinação com a proteína PvCSP completa e truncada. Essas proteínas, completa e truncada, quando utilizadas na imunização individualmente foram capazes de conferir 100% de proteção, no caso da proteína truncada, e 0%, no caso da proteína completa. Já quando utilizadas em combinação com a partícula Q $\beta$ -(AGDR) foi verificado um aumento de 83% de eficácia, para a proteína completa, e uma diminuição da eficácia para a proteína truncada (ATCHESON; REYES-SANDOVAL, 2020). De acordo com esses resultados, as vacinas de subunidade podem conferir uma proteção maior do que vacinas com a proteína inteira.

Outra estratégia utilizada no desenvolvimento de vacinas para a malária são os peptídeos longos sintéticos (LSP). Herrera et al. (2004) observaram uma alta antigenicidade em indivíduos naturalmente expostos a malária e uma alta imunogenicidade em primatas não humanos contra peptídeos longos derivados de PvCSP. Esses peptídeos foram utilizados em ensaios clínicos de fase I, para avaliar a segurança e imunogenicidade em humanos, com Montanide ISA 720 e com Montanide 51 (HERRERA et al., 2005, 2011). Nestes estudos, três polipeptídios foram sintetizados: o peptídeo N, com a sequência do domínio N terminal; o peptídeo C, com a sequência do domínio C terminal; e o peptídeo R, contendo epítomos de células B e T da região central (HERRERA et al., 2004). Quando utilizados na imunização de voluntários colombianos demonstram boa segurança e tolerabilidade. Além disso, todos os peptídeos induziram altos índices de anticorpos específicos e produção de IFN- $\gamma$  em altas doses, os quais permaneceram altos por três meses quando a dose de 100  $\mu$ g foi utilizada (HERRERA et al., 2005). No entanto, o peptídeo C foi menos imunogênico do que o N e o R, mas, após as doses de reforço o peptídeo R foi o mais reconhecido pelo soro dos voluntários. Ainda, o peptídeo N provocou uma resposta mais homogênea e mais forte do que os outros (HERRERA et al., 2005, 2011). Os dois adjuvantes utilizados foram seguros, antigênicos, imunogênicos e capazes de induzir a produção de IFN- $\gamma$ . Em geral, 95% dos voluntários apresentaram indução de soroconversão e 86% foram capazes de reconhecer a proteína nativa nos esporozoítos. Além disso, o adjuvante Montanide ISA 51 apresentou uma resposta anti-esporozoíto levemente melhor do que o Montanide ISA 720 (HERRERA et al., 2011).

Recentemente, esses peptídeos também foram avaliados quanto a segurança e eficácia em fase clínica II, em combinação com o adjuvante Montanide ISA 51, em voluntários saudáveis nunca expostos a malária e voluntários semi-ímmunes

(AREVALO-HERRERA et al., 2021). Neste estudo, os participantes receberam três doses da vacina, contendo uma mistura dos LSP ou o placebo. A primeira dose foi realizada apenas com os peptídeos N e C, enquanto a segunda e a terceira dose continham a mistura dos três. Após a imunização os voluntários foram desafiados com esporozoítos em uma infecção controlada de malária em humanos (CHMI) e então foi analisada a resposta imune. As vacinas foram seguras, bem toleradas e induziram proteção estéril em cerca de 36,6% dos voluntários *naive* e em 27,3% dos semi-imune. Além disso, foi observada uma soroconversão desde a primeira imunização em ambos os grupos, mas após a terceira, o aumento foi significativamente maior, principalmente no grupo *naive*, os quais também apresentaram melhor indução de anticorpos. Ainda, um aumento da produção de células produtoras de IFN- $\gamma$  foi observado durante a imunização, mas, uma diminuição foi verificada após o CHMI, principalmente no grupo *naive* (AREVALO-HERRERA et al., 2021). Esse estudo apresentou algumas limitações devido a dificuldades de acompanhamento dos voluntários. No entanto, um novo estudo (identificado na plataforma “ClinicalTrial.gov” como: [NCT04739917](#)) está sendo conduzido na tentativa de obter um número amostral maior, em regiões endêmicas e não endêmicas e avaliar outros fatores que podem interferir na vacinação.

Outros estudos construíram diferentes formulações derivadas de LSP, tais como o PvCS-NRC e o PvNR.R<sub>2</sub> e os caracterizaram em ensaios pré-clínicos. Ambas apresentaram significativa imunogenicidade e antigenicidade em camundongos imunizados. Além disso, os anticorpos foram capazes de reconhecer e bloquear a invasão dos esporozoítos *in vitro* (CÉSPEDES et al., 2013, 2014). No entanto, mais estudos são necessários para analisar suas potencialidades como candidatas vacinais. Todos esses estudos sugerem que as vacinas derivadas de PvCSP-LSP podem ser candidatas interessantes contra a malária e mostram a importância de testar diferentes estratégias e formulações no design experimental de estudos clínicos.

#### 4.1.2 PvTRAP

A proteína adesiva relacionada à trombospondina (PvTRAP) é uma proteína transmembrana caracterizada por um ectodomínio formado por um domínio A, uma região de trombospondina tipo 1 (TSR) e uma região repetitiva, variável entre

diferentes espécies. Ela é expressa nos micronemas dos esporozoítos e é translocada para a superfície celular durante a invasão dos hepatócitos, já que atua na motilidade e na interação com as células do hospedeiro. Além disso, também é importante no processo de invasão da glândula salivar dos mosquitos (SINNIS; NARDIN, 2002; OGUNBANWO et al., 2006). Alguns estudos mostraram que essa proteína está relacionada com a indução de resposta de células T e com altos níveis de proteção contra a malária em modelos animais e em humanos (MCCONKEY et al., 2003; WEBSTER et al., 2005; REYES-SANDOVAL et al., 2010). Tais características sugerem que a PvTRAP pode ser uma candidata vacinal ideal contra a malária.

Castellanos et al. (2007), interessados em elucidar a imunogenicidade e a eficácia PvTRAP, conduziram um estudo com BALB/c e *Aotus* utilizando LSPs derivadas de TRAP. Os peptídeos foram construídos contendo o motivo II da região N-terminal, o qual é importante para interação com as células hospedeiras. Esse peptídeo foi administrado com o adjuvante Freund nos camundongos e com Montanide ISA 720 ou Freund nos macacos. Os resultados mostraram alta imunogenicidade em ambas as espécies. No entanto, a resposta de anticorpos foi maior e dose-dependente nos camundongos desde a primeira imunização, enquanto, nos macacos foram necessárias várias doses de reforço. Ainda, apenas com o adjuvante Freund foi observado uma reação cruzada com o parasito. Em ambos os casos, a produção de IFN- $\gamma$  não foi significativa (CASTELLANOS et al., 2007).

Com o mesmo objetivo, Bauza et al. (2014), construíram dois vetores recombinantes expressando PvTRAP, o adenovírus de chipanzé (ChAd63) e o vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA) e testaram seu potencial vacinal. Essas vacinas foram aplicadas em um sistema heterólogo do tipo dose-reforço usando ChAd63-PvTRAP sucedido por MVA-PvTRAP. A eficácia da vacina foi analisada por meio de um desafio com *P. berghei* transgênicos. Foi observado uma alta indução de anticorpos e de resposta de células T nos camundongos imunizados (BAUZA et al., 2014). Os resultados indicam que tanto a resposta celular como a de anticorpos medeiam a proteção contra a malária. Esse sistema ChAd63/MVA-PvTRAP apresentou grande potencial como candidato vacinal, contudo, são necessários estudos clínicos que avaliem a segurança e imunogenicidade.

Cabral-Miranda e colaboradores (2017) analisaram o potencial da tirosina microcristalina (MCT) como adjuvante de uma formulação vacinal composta pela PvTRAP em sistema VLP. A PvTRAP foi fusionada a uma partícula derivado do vírus

do mosaico do pepino fundido a um epítopo universal de células T da toxina do tétano (CMVtt). Essa formulação foi utilizada para imunização de camundongos em coadministração com os adjuvantes MCT ou Alum, para comparar a resposta imune. Após a imunização, foi realizado um desafio com parasitos transgênicos, a fim de avaliar a capacidade de proteção de cada formulação. Em suma, foi observado que o grupo que recebeu PvTRAP-CMVtt com MCT desenvolveu a maior, a mais rápida e duradoura resposta de anticorpos, com dominância de IgG1 (CABRAL-MIRANDA et al., 2017). Além disso, verificou-se uma indução significativa de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , indicando uma forte resposta celular. Após o desafio, foi observado uma significativa redução na parasitemia nos grupos vacinados (CABRAL-MIRANDA et al., 2017).

Outro estudo investigou a resposta imune de uma PvTRAP recombinante associada a três diferentes adjuvantes: o Naloxona (NLX), o oligodeoxinucleotídeo CpG ODN1826 (CpG-ODN) e o lipídeo A 2-O-desacilado monofosforil (MPL), individualmente ou misturados, e comparou com CFA/IFA, como referência (NAZERI et al., 2018). Após a imunização dos camundongos, um aumento na resposta de anticorpos, especialmente IgG2b e IgG2c, foi observado em todas as formulações, em relação a proteína rPvTRAP sozinha. Esse aumento foi significativamente maior no grupo que recebeu a formulação misturada, com maior nível e avidéz dos anticorpos, bem como a razão de IgGs. Além disso, os anticorpos permaneceram por mais de 180 dias após a primeira imunização. Todos os grupos imunizados apresentaram altos níveis de IFN- $\gamma$ , baixos níveis de IL-10 e nenhuma produção de IL-4. No entanto, na formulação misturada observou-se maiores níveis e persistência de IFN- $\gamma$  (NAZERI et al., 2018). Esses resultados indicam que todos os adjuvantes induzem uma longa resposta do tipo Th1. Ainda, indicam que a mistura de adjuvantes tem a capacidade de potencialmente os níveis, a avidéz e a persistência dos anticorpos, sendo, portanto, uma estratégia interessante para melhorar a eficácia das vacinações.

Para analisar qual tipo de resposta imune, Th1 ou Th2, é predominante em camundongos imunizados com PvTRAP, Nazeri et al. (2020), avaliaram o perfil de isótipo de IgG em camundongos C57BL/6. Os animais foram imunizados apenas com proteína recombinante ou em coadministração com o adjuvante Freund, e a resposta de anticorpos e citocinas foi avaliada. Os resultados mostraram que os níveis de IgG2c anti-PvTRAP foram superiores ao de IgG2a, com ou sem adjuvante. Além disso, foi encontrado um nível significativo de IFN- $\gamma$  e nenhum nível de produção de IL-4, em comparação com o grupo controle. Esses resultados mostram que é necessário

avaliar a indução de IFN- $\gamma$  e IgG2c em vez de IgG2a para uma interpretação correta da resposta imune Th1 em um teste pré-clínico. Dessa forma, é possível analisar com segurança a potência dos anticorpos de bloqueio de esporozoítos aos hepatócitos em uma vacina de subunidade em desenvolvimento (NAZERI et al., 2020). No entanto, também é necessário verificar o perfil da resposta de anticorpos em humanos.

Nesse sentido, Matos et al. (2019), avaliaram a resposta de anticorpos, caracterizando o perfil específico das subclasses do IgG, a um PvTRAP recombinante na população amazônica brasileira. Verificou-se que essa proteína recombinante era imunogênica em 49% dos indivíduos naturalmente expostos. Da mesma forma, Kosuwi et al. (2018), encontraram, na Tailândia, uma prevalência de IgG total de 63,8% e 71,5%, para o domínio II e domínio IV, respectivamente. Nazeri et al. (2017), identificaram uma prevalência de resposta do IgG de 42% no Irã, 38% no Afeganistão e 44% no Paquistão. O perfil das subclasses de IgG identificados nos voluntários foram 68% de IgG1, 49% de IgG3, 45% de IgG2 e 16% de IgG4 (MATOS et al., 2019). Constatou-se uma relação entre a produção de IgG3 e a época do último episódio da malária nestes voluntários, sugerindo que essa subclasse pode estar relacionada à proteção (MATOS et al., 2019). Esses achados corroboram com Nazeri et al. (2017), que encontra prevalência e associação de respostas de anticorpos IgG1 e IgG3 com alta avidéz contra o antígeno PvTRAP. Avaliar o perfil do isótipo IgG em humanos em diferentes áreas do mundo é necessário e relevante para a compreensão de padrões específicos de resposta a anticorpos e pode melhorar o processo de desenvolvimento de vacinas.

Atcheson et al. (2020), utilizaram as VLP para analisar a resposta imune dos potenciais epítomos de células B do antígeno PvTRAP. Os peptídeos foram escolhidos pela triagem do soro de camundongos vacinados com TRAP para peptídeos imunogênicos ou explorando a região conservada da proteína, os quais foram acoplados a plataforma Q $\beta$ . Essas formulações foram utilizadas na imunização de camundongos e, posteriormente, foi realizado um desafio com esporozoítos a fim de avaliar a eficácia desses epítomos como vacinas. Por meio dessa metodologia foram identificados quatro novos epítomos capazes de conferir proteção parcial nos camundongos (ATCHESON et al., 2020). Além disso, as vacinas inibiram a invasão dos esporozoítos em ensaios *in vitro* e, os esporozoítos, foram reconhecidos por anticorpos monoclonais presentes no antissoro de camundongos imunizados. Ainda, os anticorpos direcionados a regiões conservadas eram neutralizantes, mas, apenas

um deles, denominado TRSP, demonstrou uma eficácia protetora (ATCHESON et al., 2020). Além disso, este estudo investigou a interferência imunológica entre os peptídeos, demonstrando que este é o principal desafio para o desenvolvimento de uma vacina multiantigênica (ATCHESON et al., 2020). Apesar da baixa eficácia dos peptídeos identificados, este estudo foi inovador ao mostrar o potencial do Q $\beta$ -VLP como um sistema para identificar novos epítomos e permitir a análise da resposta imune em candidatos vacinais.

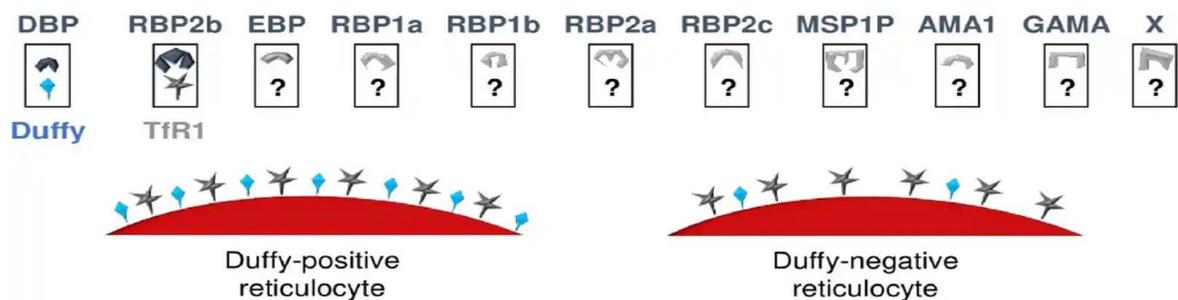
Uma vacina, direcionada a múltiplos antígenos, poderia ser mais eficaz do que uma vacina de antígeno único. Para verificar a eficácia de uma vacina multiantigênica, Atcheson et al. (2018), desenvolveram uma formulação combinando a PvCSP e a PvTRAP. Essa formulação foi testada com dois adjuvantes, AddaVax e Matrix-M, em diferentes plataformas. Após a imunização dos camundongos, foi realizado um desafio com esporozoítos quiméricos de *P. berghei* expressando tanto PvCSP como PvTRAP para avaliar a eficácia (ATCHESON et al., 2018). Os resultados mostraram 100% de proteção estéril, com ou sem adjuvante, quando os camundongos foram imunizados com as duas combinações de antígeno, mesmo em doses baixas, o que não foi observado nas imunizações com apenas um antígeno (ATCHESON et al., 2018). Dessa maneira, observa-se que a combinação de Rv21 e MVA-TRAP, quando coadministrados, melhora a resposta imune e aumenta a eficácia contra a malária vivax. Além disso, de acordo com os resultados, os vetores virais podem ter um efeito potente como adjuvante. Nesse estudo, não foi observada interferência antigênica nem com Matrix-M nem com AddaVax. Ambos os adjuvantes induziram respostas de anticorpos contra o *P. vivax* (ATCHESON et al., 2018). Com base nesses resultados, sugere-se que uma vacina baseada em múltiplos antígenos poderia ser uma excelente candidata vacinal.

#### 4.2 VACINAS DE ESTÁGIO SANGUÍNEO

A infecção de estágio-sanguíneo é a causa exclusiva dos sinais e sintomas clínicos da malária, devido a progressiva destruição dos eritrócitos. O estágio sanguíneo, assexuado, engloba os merozoítos, os trofozoítos e os esquizontes, mas, somente antígenos derivados de merozoítos são investigados como candidatos vacinais, já que estão envolvidos na invasão dos eritrócitos, como ilustrado na FIGURA 3. O *P. vivax* infecta exclusivamente os reticulócitos e a ausência de um

sistema de cultivo celular de longa duração é o maior desafio para identificação de novos candidatos para este estágio (OVCHYNNIKOVA et al., 2017). A presença desses antígenos no sangue estimula as células T e B na indução de uma resposta imune (ZHENG et al., 2019). Portanto, uma vacina de estágio sanguíneo poderia bloquear o crescimento do parasito, prevenir os sintomas da doença e o número de mortes, reduzir a duração e a densidade dos parasitos no sangue e, inclusive, diminuir a transmissão aos insetos (MUELLER; SHAKRI; CHITNIS, 2015). Atualmente, o principal candidato vacinal desse estágio é a proteína de ligação ao antígeno Duffy (PvDBP), mas, outros candidatos como a proteína apical de membrana (PvAMA-1), os membros da família de proteínas de ligação ao reticulócito (PvRBP) e da família de proteínas de superfície dos merozoítos (PvMSP) também tem sido amplamente investigados, já que interagem com a superfície dos reticulócitos.

FIGURA 3 - PROTEÍNAS DE INTERAÇÃO COM RETICULÓCITOS



FONTE: GOLASSA et al. (2020).

LEGENDA: Espectro de proteínas do parasito que interagem com os receptores de reticulócitos (muitos ainda desconhecidos) durante o processo de invasão de células Duffy-positivas e Duffy-negativas. Essas proteínas são consideradas possíveis candidatos vacinais. As células Duffy-positivas apresentam o receptor Duffy em sua superfície e a invasão do parasito ocorre pela interação desse receptor com a proteína PvDBP do parasito. Já as células Duffy-negativas não apresentam ou expressam em níveis baixos o receptor Duffy, nesse caso a invasão do parasito ocorre pelas vias alternativas (PvRBP, PvMSP, PvAMA1, GAMA, entre outras).

#### 4.2.1 PvDBP

A proteína de ligação ao antígeno Duffy (DBP) é altamente polimórfica, localiza-se nos merozoítos e é a principal molécula envolvida na invasão dos reticulócitos, devido à sua capacidade de ligação ao receptor Duffy para quimiocinas (DARC/Duffy) (WERTHEIMER; BARNWELL, 1989; HORUK et al., 1993). A PvDBP é uma proteína de membrana do tipo I, com 140-kDa, composta por quatro regiões

principais: uma sequência de peptídeo sinal (região I), duas regiões ricas em cisteína (região II e região VI) e um domínio transmembrana (região VII). A principal é a região II, que é uma sequência conservada responsável pela interação com o eritrócito (WERTHEIMER; BARNWELL, 1989; ADAMS et al., 1992; CHITNIS; MILLER, 1994). O mecanismo de invasão envolve diferentes sítios do domínio II, os quais são alvos importantes para o desenvolvimento de vacinas (BATCHELOR et al., 2014).

Por muito tempo, acreditava-se que a PvDBP era a única ligante dos reticulócitos e, portanto, os indivíduos com fenótipo Duffy-negativo seriam resistentes à malária vivax (MILLER et al., 1976; HORUK et al., 1993). De fato, observa-se uma diminuição da suscetibilidade relacionada a esse fenótipo (KING et al., 2011). No entanto, nos últimos anos, foi demonstrado que indivíduos Duffy-negativo também podem ser infectados pelo *P. vivax*, provavelmente, devido a vias alternativas de invasão aos eritrócitos, como ilustrado na FIGURA 3. Essas moléculas já tem sido identificadas, sugerindo que o mecanismo de invasão é muito mais complexo do que se acreditava (ZIMMERMAN, 2017; KANJEE et al., 2018; GOLASSA et al., 2020; KEPPLER et al., 2021). Portanto, uma vacina composta apenas pelo antígeno PvDBP, provavelmente, não poderia conferir uma proteção contra todas as variantes do parasito e ainda poderia provocar uma pressão de seleção sobre os antígenos de superfície, levando a um aumento da frequência da expressão de genes envolvidos nas vias alternativas. Portanto, é necessário encontrar e incluir outros antígenos em um sistema vacinal, buscando interromper todas as vias de invasão às células hospedeiras.

No entanto, anticorpos contra o domínio II dessa proteína apresentaram excelentes resultados no bloqueio da invasão dos reticulócitos e na redução da infecção pelo *P. vivax* (MICHON; FRASER; ADAMS, 2000; GUPTA et al., 2018). Além disso, pesquisadores observaram uma resposta de células B de memória de longa duração entre indivíduos que viviam em regiões de baixa endemicidade (CHANGROB et al., 2018). Devido aos resultados promissores e as diversas evidências da PvDBPII como candidato vacinal, nas últimas décadas uma série de estudos foram desenvolvidos para testar sua imunogenicidade em diferentes formulações.

Yazdani et al., (2004), desenvolveram uma vacina derivada da região II do PvDBP. Para isso, foi construída uma proteína recombinante, expressa, caracterizada e avaliada por meio da imunização de camundongos. A vacina foi formulada com a proteína recombinante em conjunto com cinco adjuvantes diferentes para comparar a

indução de anticorpos, são eles: Montanide ISA720, AS02A, MF59, QS21 e Alum. Os resultados demonstraram uma produção significativa de IgG em todas as formulações, no entanto, com ISA720 e AS02A, a indução de anticorpos e citocinas foi maior. Além disso, esses dois adjuvantes e o Alum mostraram melhor inibição de ligação da proteína aos eritrócitos em ensaios *in vitro* (YAZDANI et al., 2004). Esses resultados mostraram que anticorpos contra a PvDBPII podem bloquear a invasão do parasito.

Em um estudo realizado com a imunização de *Macaca mulata* foi observada segurança e a imunogenicidade de uma proteína recombinante derivada de PvDBP-RII (MORENO et al., 2008). Esta vacina foi formulada com três adjuvantes diferentes: Alhydrogel, Montanide ISA 720 ou AS02A. Após a imunização dos macacos, foi detectada uma alta resposta de anticorpos e de IFN- $\gamma$ , principalmente com ISA 720 e AS02A, que foram correlacionados com a capacidade de inibir a invasão dos parasitos (MORENO et al., 2008).

Na tentativa de investigar o papel dos anticorpos específicos ao PvDBPII na resposta imune, um estudo demonstrou que a presença desses anticorpos, naturalmente adquiridos, está relacionada à proteção contra a infecção por *P. vivax* em uma região hiper endêmica (KING et al., 2008). Os resultados deste estudo mostraram uma redução de 55% no risco de infecção em crianças que apresentavam altos títulos desses anticorpos. Além disso, foram associados a um atraso no tempo para reinfecção e na redução da parasitemia. Ainda, foi observado uma resposta contra diferentes cepas (KING et al., 2008). Outro estudo observou que anticorpos específicos a PvDBPII naturalmente adquiridos, estão associados a maior proteção contra uma cepa homóloga do que uma cepa heteróloga. No entanto, verificou-se um atraso na reinfecção quando os níveis de anticorpos para as variantes mais comuns foram combinadas (COLE-TOBIAN et al., 2009). Isso indica que uma vacina multialélica poderia fornecer uma maior proteção contra a malária vivax. Nesse sentido, a identificação e caracterização de diferentes polimorfismos do gene *pvdbp* são importantes para o desenho vacinal, uma vez que podem interferir na eficácia da vacina e facilitar a evasão imunológica do parasito, conforme revisado por Sousa et al. (2014).

Um estudo identificou um epítipo de células B em uma região polimórfica de PvDBPII, chamada de epítipo DEK, que é alvo de anticorpos anti-DBPII inibitórios e está relacionado à proteção (CHOOTONG et al., 2010). A sequência desse epítipo foi usada para criar uma nova molécula de DBPII, chamada DEKnull, da qual foram

removidos os resíduos polimórficos para avaliar a imunogenicidade sem a influência de respostas antígeno-específicas e focando a resposta em regiões mais conservadas (NTUMNGIA; ADAMS, 2012). Após a expressão e purificação, a proteína foi utilizada em ensaios de ligação de eritrócitos, na imunização de camundongos e o soro foi usado em ensaios de inibição de ligação eritrocítica. Os resultados mostraram uma atividade de ligação similar a proteína nativa e uma alta produção de anticorpos, os quais inibiram completamente a ligação da proteína nativa aos eritrócitos (NTUMNGIA; ADAMS, 2012). Esses resultados indicam que uma região mais conservada pode fornecer uma boa proteção contra a malária vivax e são capazes de induzir uma imunidade cepa transcendente (NTUMNGIA; ADAMS, 2012).

Posteriormente, foi desenvolvida uma nova proteína recombinante derivada do DEK-null, chamada DEK-null-2, a qual contém a região conservada mais importante para ligação aos reticulócitos e foram retirados os epítomos não funcionais associados com uma resposta específica a cepa, na tentativa de obter uma proteína ainda mais imunogênica (NTUMNGIA et al., 2017). Após a imunização dos camundongos, essa nova proteína mostrou uma maior resposta de anticorpos específicos do que a proteína original. Além disso, foi verificada a permanência desses anticorpos durante seis anos em voluntários residentes de regiões endêmicas de malária na Amazônia (NTUMNGIA et al., 2017). Também, foi observada inibição da invasão de reticulócitos em cultivo celular. Este estudo demonstrou que o DEK-null-2 é um alvo de anticorpos naturalmente adquiridos e, portanto, poderia ser um bom candidato à vacina, com uma resposta imune forte e duradoura (NTUMNGIA et al., 2017). Medeiros et al. (2020) investigaram a relação entre a resposta de IgM e IgG naturalmente adquiridos, específicos ao DBPII, durante um período de acompanhamento de nove anos. As respostas foram comparadas com dois alelos diferentes derivados do PvDBP, o Sal-1 e a cepa DEK-null-2 (MEDEIROS et al., 2020). Os resultados demonstraram que a exposição a longo prazo a níveis baixos e instáveis de transmissão da malária provoca uma resposta IgM específica do DBPII contra epítomos específicos de variantes, enquanto a resposta IgG contra DBPII específico da variante foi mal sustentada em um período de baixa transmissão. Esses resultados sugerem que os anticorpos IgM são indicativos de exposição contínua à malária, enquanto o IgG está associado à resposta de anticorpos específicos (MEDEIROS et al., 2020).

Entre as estratégias para projetar uma vacina derivada de epítomos, foi desenvolvida uma técnica de mascaramento glicano, que consiste em esconder a superfície proteica com glicosilação para direcionar a resposta dos anticorpos à superfície exposta (SAMPATH et al., 2013). Para isso, foi adicionado de um sítio N-glicano em diferentes regiões do PvDBP (dentro ou fora da região de interação) para verificar o efeito desse mascaramento na interação com o receptor DARC (SAMPATH et al., 2013). Os resultados mostraram inibição da ligação com o DARC quando o N-glicano foi adicionado ao domínio de interação II e nenhuma inibição quando foi adicionado em uma região distante, mostrando a importância deste local para a interação (SAMPATH et al., 2013). No entanto, o ensaio de resposta a anticorpos e atividade inibitória de anticorpos não foram significativos entre essas proteínas e o tipo selvagem PvDBP (SAMPATH et al., 2013).

Vários estudos que investigaram epítomos de PvDBPII foram realizados para identificar a região específica de ligação aos reticulócitos por meio da utilização de anticorpos monoclonais com atividade inibitória. Chen et al. (2016), identificaram e caracterizaram três epítomos amplamente conservados, chamados 2D10, 2H2 e 2C, que poderiam fornecer imunidade cepa-transcendente e fornecer motivos críticos para um desenho vacinal. Da mesma forma, Urusova et al. (2019), encontraram dois anticorpos monoclonais derivados de epítomos conservados com alta atividade de neutralização e bloqueio, que não foi afetada pelo polimorfismo, sugerindo uma imunidade cepa-transcendente. Rawlinson et al. (2019) obtiveram anticorpos monoclonais derivados do soro de voluntários imunizados com PvDBPII para verificar sua capacidade de inibir a ligação do PvDBPII ao DARC e sua capacidade de neutralizar a invasão dos parasitos em ensaios *in vitro* e isolados clínicos (RAWLINSON et al., 2019). Foi encontrado um mAbs capaz de inibir a invasão de múltiplas cepas de *P. vivax*, chamado DB9. A estrutura do DB9 foi investigada, e constatou-se que reconhece um epítomo localizado no subdomínio 3 da PvDBPII, mostrando um importante local de inibição (RAWLINSON et al., 2019). Os autores sugerem que projetar este epítomo como um candidato à vacina poderia fornecer bons resultados. George et al. (2019), também encontraram um mAbs do subdomínio 3, chamado 3C9, conservado e linear, capaz de induzir uma resposta de anticorpos contra uma proteína recombinante de PvDBP e capaz de inibir a ligação da PvDBP ao reticulócito *in vitro*. Recentemente, foi demonstrado que o PvDBPII contém epítomos críticos, localizado no subdomínio 1 (SD1), o qual conferiu imunidade

cruzada reativa ao VAR2CSA, um membro da família de proteína de membrana do eritrócito de *P. falciparum* (PfEMP1) (MITRAN et al., 2019). Em resumo, foi demonstrado que anticorpos contra o epítipo SD1 poderiam inibir uma via de virulência em *P. falciparum in vitro* (MITRAN et al., 2019). Este estudo demonstra a importância da identificação de diferentes epítopos de diferentes espécies de *Plasmodium*, que podem estar relacionados à imunidade heteróloga.

Estudos pré-clínicos foram realizados com três vetores virais recombinantes: sorotipo de adenovírus humano 5 (HAdV5), adenovírus de chimpanzé 63 (ChAd63), e vírus Vaccinia Ankara modificado, contendo a sequência de PvDBP-RII para acessar sua capacidade de induzir uma resposta imune em ratos e coelhos e comparar diferentes adjuvantes (DE CASSAN et al., 2015). Foi confirmado que o PvDBP-RII é altamente imunogênico, já que provoca uma forte resposta de anticorpos com qualquer vetor viral. Esses anticorpos foram capazes de reconhecer o *P. vivax* nativo no soro de pacientes infectados (DE CASSAN et al., 2015). Além disso, uma abordagem de modalidade mista foi testada para avaliar dois adjuvantes fortes, Montanide ISA720 e Abisco 100, em combinação com vetores virais ou proteínas recombinantes. Os resultados mostraram alta resposta humoral de IgG e celular de IFN- $\gamma$  em ambas as combinações, especialmente após três imunizações. O maior nível de inibição de ligação foi com o adjuvante Abisco 100 (DE CASSAN et al., 2015). Este estudo indica que as plataformas virais para o desenvolvimento de vacinas são uma estratégia promissora, uma vez que esses candidatos parecem induzir proteção estéril. Isso foi investigado em testes clínicos.

No estudo clínico de fase 1, as formulações de ChAd63 e MVA contendo a sequência da PvDBP-II (Sal-1), foram utilizadas no sistema de imunização heterólogo do tipo *prime-boost*, com 8 semanas de intervalo (PAYNE et al., 2017). A vacina apresentou alta segurança e eficácia. Foi observado uma alta resposta de anticorpos específicos com atividade de bloqueio de ligação ao eritrócito. Além disso, foram observados uma alta resposta de células B, células de memória e de anticorpos IgG1 e IgG3, após o *boost* com MVA (PAYNE et al., 2017). Também, foi encontrada uma excelente resposta de células T produtoras de IFN- $\gamma$ , sugerindo um papel importante destas células na aquisição da imunidade. Além disso, foi avaliada a atividade de inibição de ligação com uma cepa diferente de *P. vivax*, a cepa Indiana HMP013, os resultados mostraram 50% de inibição, sugerindo uma imunidade cepa-transcendente

(PAYNE et al., 2017). Atualmente, os estudos com ChAd63 e MVA PvDBP-RII estão recrutando voluntários para acessar os ensaios clínicos de fase II.

Outro ensaio clínico de fase I foi realizado com uma PvDBPII recombinante em uma emulsão lipídica de glucopiranosil (GLA-SE) (SINGH et al., 2018). A formulação foi utilizada na imunização de adultos Indianos saudáveis, com doses de 10, 25 e 50 µg, e demonstrou ser segura e bem tolerada (SINGH et al., 2018). Os resultados mostraram que todas as doses provocaram respostas de anticorpos específicos e de bloqueio de ligação. No entanto, com 50 µg, a inibição foi maior e mais persistente. Além disso, também foi observada uma resposta cepa-transcendente (SINGH et al., 2018). Este estudo apoia o PvDBPII/GLA-SE como candidato à vacina e a inclusão de ensaios clínicos fase II.

#### 4.2.2 Família de PvRBP

A família de proteínas de ligação ao reticulócito (PvRBP) engloba importantes membros que medeiam a invasão ou adesão aos reticulócitos (GALINSKI et al., 1992). O genoma do *P. vivax* Salvador-1 possui ao menos 11 membros, cinco são genes de comprimento completo (PvRBP-1a, PvRBP-1b, PvRBP-2a, PvRBP-2b e PvRBP-2c), três são genes parciais (PvRBP1-P1, PvRBP2-P1 e PvRBP2-P2) e três são pseudogenes (PvRBP-2d, PvRBP-2e e PvRBP-3) (CARLTON et al., 2008; CHAN et al., 2020). As PvRBPs se localizam no polo apical dos merozoítos e estão envolvidos nas vias alternativas de invasão nos pacientes Duffy-negativos, já que foi demonstrado sua capacidade de ligação e seletividade aos reticulócitos (FRANÇA et al., 2016; CHAN et al., 2020; GOLASSA et al., 2020; KEPPLER et al., 2021). Além disso, alguns estudos mostraram que anticorpos humanos contra algumas PvRBPs provocam uma redução da parasitemia e induzem uma proteção contra casos clínicos (FRANÇA et al., 2016; HIETANEN et al., 2016).

As primeiras proteínas descritas nessa família foram a PvRBP-1a, uma proteína transmembrana ligada por dissulfetos, e a PvRBP-2c, um complexo proteico adesivo (GALINSKI et al., 1992). Gupta e colaboradores (2017) demonstraram que anticorpos naturalmente adquiridos contra domínios específicos de PvRBP-1a e PvRBP-2c têm alta atividade inibitória da ligação ao reticulócito. Ainda, o estudo sugere que existem diferentes sítios de ligação, ainda desconhecidos, diferentes dos sítios de PvDBP (GUPTA et al., 2017). No entanto, em outro estudo, Gupta et al.

(2018), demonstrou que anticorpos purificados de coelho contra uma PvRBP-1a<sub>30</sub> recombinante não tiveram uma inibição significativa, não sendo, portanto, um candidato ideal. Chan et al. (2020) discute que esse resultado se deve, provavelmente, à grande variação nos resultados obtidos nos ensaios de invasão de *P. vivax* de diferentes isolados clínicos (GUPTA et al., 2018; CHAN et al., 2020).

Outro estudo investigou e caracterizou domínios específicos de ligação da RBP-1a. De acordo com os resultados, o domínio RBP1:F8 (157 aa – 650 aa) é altamente imunogênico, uma vez que foi capaz de induzir um alto nível de anticorpos após a imunização de camundongos (NTUMNGIA et al., 2018). Além disso, os anticorpos foram capazes de bloquear a interação com reticulócitos e normócitos *in vitro* e estavam presentes no soro de indivíduos naturalmente expostos ao *P. vivax*, o que sugere que essa proteína é naturalmente imunogênica (NTUMNGIA et al., 2018).

Longley et al. (2017), investigaram as respostas de anticorpos IgG contra os estágios sanguíneos de *P. vivax* em voluntários assintomáticos em uma região de baixa transmissão do oeste da Tailândia. Entre as proteínas analisadas, foram investigados cinco membros da família PvRBP. Em geral, observou-se que as magnitudes das respostas do IgG a diferentes PvRBPs são geralmente correlacionadas e tendem a aumentar com a idade (LONGLEY et al., 2017). Além disso, observou-se que o PvRBP-1b é imunogênico em pacientes assintomáticos. Além disso, a PvRBP-2c Non-Binding foi associada à proteção em crianças (LONGLEY et al., 2017). Enquanto o RBP2-P2 e o RBP-1b podem fornecer uma resposta de anticorpos no início da vida e duradoura mesmo na ausência de novas infecções (LONGLEY et al., 2017). He et al. (2019) investigaram a resposta de anticorpos contra seis PvRBPs recombinantes (PvRBP-1a, PvRBP-1b, PvRBP-2a, PvRBP-2b, PvRBP-2c Non-Binding e PvRBP2-P2) em populações que vivem em regiões de baixa transmissão da malária no Brasil e na Tailândia. Este estudo mostrou que a resposta do IgG a PvRBP-1a, PvRBP-2b e PvRBP-2cNB poderia ser um marcador imunológico adequado da infecção assintomática de *P. vivax* nessas regiões em uma ampla faixa etária e prever indivíduos com maior risco prospectivo de infecção (HE et al., 2019). Além disso, verificou-se que os níveis de anticorpos para PvRBP-2b estão associados à proteção contra episódios clínicos de *P. vivax*, mesmo em níveis baixos (HE et al., 2019).

Gruszczyk et al. (2018), identificaram o receptor transferrina 1 (TfR1 ou CD71) o principal receptor envolvido na ligação de PvRBP-2b ao reticulócito e elucidaram o

mecanismo envolvido nesse processo. Foi observado um bloqueio da invasão *P. vivax* na ausência deste receptor. Além disso, anticorpos monoclonais contra PvRBP-2b foram capazes de inibir a ligação e a invasão pelo *P. vivax* nas células humanas (GRUSZCZYK et al., 2018).

Interessados em compreender a função dos anticorpos PvRBP, Chan et al. (2021), obtiveram e caracterizaram anticorpos monoclonais para PvRBP-2b de indivíduos com imunidade naturalmente adquirida ao *P. vivax*. O estudo mostrou que os mAbs inibem a ligação de PvRBP-2b aos reticulócitos, bloqueando a formação do complexo TfR1-Tf, e identificaram alguns epítomos envolvidos nesse processo (CHAN et al., 2021). Os resultados mostraram que diferentes mAbs têm diferentes mecanismos de inibição, e sua combinação poderia proporcionar um melhor bloqueio de invasão. Além disso, foi sugerido que essa estratégia poderia diminuir o impacto do polimorfismo, que é o principal obstáculo do desenvolvimento de vacinas para *P. vivax* (CHAN et al., 2021).

Chim-Ong et al. (2020), examinaram as características funcionais do PvRBP-2P1 como um ligante de invasão de *P. vivax* e sua resposta de anticorpos em pacientes com malária. Foi encontrado que a rRBP-2P1 interage seletivamente com os reticulócitos, no entanto, ainda não se sabe quais receptores estão envolvidos. Além disso, anticorpos de coelho para rRBP-2P1 reduziram a ligação de PvRBP2-P1 ao eritrócito de maneira dose-dependente (CHIM-ONG et al., 2020). A resposta imune naturalmente adquirida ao rRBP-2P1 foi associada a uma baixa parasitemia (CHIM-ONG et al., 2020). Além disso, a resposta foi maior em assintomático do que em pacientes, indicando uma exposição prévia. A interferência de anticorpos humanos na ligação ao eritrócito indica um papel protetor (CHIM-ONG et al., 2020). No entanto, novos estudos são necessários para investigar a capacidade dos anticorpos de bloquear a invasão de parasitos.

De acordo com esses resultados, os membros da família PvRBP apresentam funções imunogênicas. No entanto, alguns deles ainda não foram idealmente caracterizados, há muitas lacunas na compreensão de sua função e o papel na resposta imune é desconhecido. Portanto, novos estudos são necessários para avaliar o potencial desses candidatos em induzir uma resposta protetora em formulações vacinais.

### 4.2.3 PvAMA1

O antígeno de membrana apical 1 (AMA1) é uma proteína de superfície secretada pelo micronema de todas as espécies de *Plasmodium*. Essa proteína desempenha um papel importante na invasão de parasitos em células hospedeiras no estágio pré-eritrócito e sanguíneo, por ser um componente essencial da junção de movimento no polo apical do parasito, formando um complexo de invasão em conjunto com a proteína de roptrias 2 (RON2) (TRIGLIA et al., 2000; A. MACRAILD et al., 2011). A PvAMA1 compreende quatro regiões principais, uma pró-sequência, um ectodomínio rico em cisteína, um domínio transmembrana e uma região citoplasmática C-terminal (NAIR et al., 2002; PIZARRO et al., 2005). O ectodomínio contém três regiões, chamadas DI, DII e DIII (PIZARRO et al., 2005). Enquanto a região DI tem a maior diversidade genética e taxa de mutação, o DII é a região mais conservada e imunogênica, além disso, é reconhecida por anticorpos humanos após infecção natural (MÚFALO et al., 2008; ZAKERI et al., 2013). PvAMA1 é um candidato promissor contra a malária, uma vez que pode induzir uma forte resposta imune e pode inibir o crescimento de parasitos (KOCKEN et al., 1999). Além disso, análises de bioinformática demonstraram que a PvAMA1 é altamente imunogênica, antigênica e tem características ideais de vacina, como a presença de vários epítomos (JAHANGIRI; JALALLOU; EBRAHIMI, 2019). Bueno e colaboradores (2009) demonstraram que PvAMA1 em uma formulação vacinal apresenta um papel na modulação da maturação de células dendríticas pelo aumento da apresentação de moléculas na superfície celular. Além disso, observou-se que a indução de uma resposta de citocinas induzido por este antígeno estava associada a proteção clínica (BUENO et al., 2009).

Outros estudos mostraram que em casos de malária descomplicada há produção de anticorpos de curta duração, mas resposta de células B de longa duração (MBC) para PvAMA1 em indivíduos expostos nas regiões com diminuição da transmissão da malária na Região Amazônica. Estes achados indicam que populações de áreas com declínio de transmissão podem produzir e manter anticorpos potencialmente protetores, e a presença desses MBCs poderia determinar se os pacientes reexpostos à mesma cepa desenvolveriam uma infecção patente no estágio sanguíneo (SOARES et al., 2019).

A investigação sobre a melhor formulação vacinal com PvAMA1 tem gerado diversos estudos. Gentil et al. (2010) projetaram diferentes proteínas recombinantes derivadas da PvAMA1 e avaliaram sua imunogenicidade pela imunização de camundongos BALB/c com diferentes adjuvantes. Os resultados mostraram que o PvAMA1 foi imunogênico em todas as formulações testadas, no entanto, observou-se uma melhor resposta de IgG com os adjuvantes Quil A, TLR9 agonista CPG-ODN e TiterMax (GENTIL et al., 2010). Além disso, os anticorpos contra a PvAMA1-DII foram capazes de reconhecer a AMA1 nativa na superfície dos merozoítos presentes no sangue de pacientes infectados (GENTIL et al., 2010). Da mesma forma, Vicentin et al. (2014) expressaram PvAMA1 em *Pichia pastoris* e compararam diferentes formulações de vacinas em camundongos. Foi demonstrado que as formulações com Quil A e IFA induziram maior título de anticorpo e respostas Th1/Th2 mais equilibradas do que MPLA ou Alum. Além disso, foi demonstrado que anticorpos contra o PvAMA1 tem um papel inibidor de invasão contra diferentes cepas de *P. vivax* (VICENTIN et al., 2014). Someabozorg et al. (2015) demonstraram que a Naloxona (NLX), com uma PvAMA1 recombinante, não pode induzir uma boa resposta imune. No entanto, em combinação com outro adjuvante, como IFA, obteve-se uma resposta Th1/Th2 equilibrada (SOMEABOZORG et al., 2015).

Bouillet et al. (2011) avaliaram a imunogenicidade de uma formulação contendo PvAMA1 em vetor de adenovírus (Ad5PvAMA1) em um sistema de imunização *prime-boost*, com o Montanide ISA720 como adjuvante. Essa formulação induziu anticorpos específicos de longa duração, com a produção de IgG1 e IgG2a, e uma resposta forte e duradoura de células T, o que é importante para neutralizar a infecção (BOUILLET et al., 2011). Salavatifar et al. (2015), demonstraram que a PvAMA1 expressa em *E. coli* pode induzir uma resposta imune humoral de longa duração em camundongos, quando imunizados com a proteína e o adjuvante Freund. Neste caso, observou-se maior nível de produção de IgG2b e IgG1 e uma resposta Th1/Th2 equilibrada que persistiu até um ano após a primeira imunização (SALAVATIFAR et al., 2015). Além disso, os anticorpos contra a proteína recombinante reconheceram o antígeno nativo no parasito (SALAVATIFAR et al., 2015).

Bueno et al. (2011) identificaram um epítipo linear de célula B altamente antigênico na PvAMA1-DII e confirmaram sua antigenicidade. Inicialmente, foi confirmado que anticorpos específicos para PvAMA1 estão associados a respostas

de anticorpos ao DII em indivíduos naturalmente expostos à malária (BUENO et al., 2011). Além disso, o perfil da resposta do IgG mostra uma predominância dos subtipos IgG1 e IgG3. Posteriormente, o epítipo (290-307 aa) foi sintetizado e os níveis de produção de IgG contra esse epítipo foram medidos utilizando amostras de soro de indivíduos naturalmente infectados por *P. vivax* que apresentaram reatividade prévia ao PvAMA1 (BUENO et al., 2011). Os resultados mostraram uma positividade de 58,3% contra o peptídeo sintético, o que sugere que a produção específica de anticorpos contra este epítipo é produzida durante a infecção natural (BUENO et al., 2011).

Conforme discutido anteriormente, a alta taxa de polimorfismo nos antígenos do parasito são o maior desafio do desenvolvimento vacinal contra a malária vivax (TAKALA et al., 2009). Por isso, alguns estudos investigaram a presença e influência do polimorfismo PvAMA1 na resposta imune, uma vez que uma imunidade contra apenas um alelo pode induzir uma imunidade específica a cepa (GUY et al., 2018; BITTENCOURT et al., 2020; FRANÇA et al., 2021). O problema dessa imunidade é que ela poderia facilitar a evasão de parasitos aos anticorpos induzidos pela vacina, uma vez que não pode conferir proteção contra diferentes variantes (TAKALA et al., 2009). Além disso, vários polimorfismos foram observados nos sítios de ligação de PvAMA1, que sugerem uma pressão imunológica nessas regiões (GUY et al., 2018). Assim, regiões conservadas e de baixa diversidade genética podem ser alvos promissores de vacinas (GUY et al., 2018).

Além disso, é importante considerar que a resposta imune difere de acordo com cada polimorfismo (BITTENCOURT et al., 2020). Bittencourt et al. (2020), demonstraram que alguns haplótipos brasileiros, que são variáveis em epítipos de células B, podem induzir uma reatividade cruzada contra diferentes alelos na mesma população, conferindo proteção contra diferentes variantes. Na mesma perspectiva, França et al. (2021) mostraram que alguns polimorfismos brasileiros também apresentavam reação cruzada contra variantes estrangeiras. Também, foi observado a presença de epítipos comuns entre as duas populações e uma indução de resposta cepa-transcendente (FRANÇA et al., 2021). Esses estudos sugerem que a combinação de variantes chaves de PvAMA1 em uma formulação multialélica poderia proteger contra várias cepas distribuídas ao redor do mundo. No entanto, uma formulação de vacina ideal deve considerar a frequência de haplótipos mais comuns

presentes na população de cada área endêmica para encontrar o antígeno imunodominante e escolher o melhor candidato (BITTENCOURT et al., 2020).

Na tentativa de melhorar a resposta imune aos antígenos e a eficácia protetora das vacinas, alguns estudos têm investigado o potencial de vacinas multiantigênicas. Nessa perspectiva, Obaldia III et al. (2017), avaliaram o efeito de uma vacina contendo plasmídeo de DNA e vetores de adenovírus com os antígenos AMA1 e MSP1<sub>42</sub> em um sistema de imunização *prime-boost* heterólogo contra um desafio de estágio sanguíneo em macacos *Aotus*. Os resultados mostraram que esse sistema foi mais protetor em comparação com as vacinas que codificam apenas um antígeno pela maior indução de títulos de anticorpos, redução dos níveis de parasitemia e maiores taxas de auto-cura durante o período de experimento (OBALDIA III et al., 2017). Além disso, apesar de não ter sido observada uma proteção estéril, observou-se uma correlação negativa entre os títulos de anticorpos e os níveis de parasitemia.

Lima et al. (2020) analisaram a imunogenicidade das formulações vacinais compostas por yPvCSP-All<sub>FL</sub> e PvAMA1, isolado ou em combinação, com Poly (I: C) como adjuvante, em BALB/c e C57BL/6. A resposta de anticorpos dos BALB/c foi relativamente mais baixa para o PvCSP, enquanto para PvAMA1 e para a vacina mista foram maiores, o que poderia estar relacionado a uma imunodominância dos epítomos de PvAMA1 (LIMA et al., 2020). Em contrapartida, a resposta de anticorpos para C57BL/6 foi maior e mais duradoura em ambas as imunizações e não foi observada diferença estatística para a vacina mista. Na avaliação do perfil de IgG, foi observado uma predominância da resposta Th2 e a presença de PvAMA1 parece melhorar o equilíbrio da resposta imune. No entanto, na vacina mista, uma interferência antigênica na resposta proliferativa específica de células e na secreção de citocinas foi identificada (LIMA et al., 2020). Além disso, foi observado uma diminuição da parasitemia em ambas as imunizações após desafio com esporozoítos transgênicos Pb/PvCSP-VK210, apesar de não ter sido observada uma proteção estéril (LIMA et al., 2020). Em suma, esses estudos mostraram que o regime heterólogo de imunização é uma boa escolha para melhorar a eficácia das vacinas contra a malária. No entanto, mais estudos são necessários para identificar a melhor combinação de antígeno e as melhores plataformas de imunização.

#### 4.2.4 Família de PvMSP

As proteínas de superfície de merozoítos (MSP) são as mais abundantes da superfície celular dos merozoítos e desempenham um papel importante na sua sobrevivência, por esses motivos elas podem ser eficazes como candidatas vacinais. Essas proteínas possuem regiões importantes de âncora de GPI que medeiam a invasão das células hospedeiras (BEESON et al., 2016). Soares e colaboradores (1997), investigaram o potencial das PvMSP contra a malária vivax e indicaram a indução de uma alta resposta imune celular e humoral, que está associada a uma redução do risco de infecção.

A principal candidata é a PvMSP1 (180 a 230 kDa), que se localiza na superfície dos merozoítos e tem um papel fundamental na invasão dos eritrócitos. Durante o processo de invasão ocorrem diversas clivagens proteolíticas na PvMSP1 gerando fragmentos de diversos tamanhos. Um deles é o de 42 kDa (MSP<sub>142</sub>), que permanece ancorado na membrana. Após novo processamento dois fragmentos são gerados um de 33 kDa (MSP<sub>133</sub>), correspondente a região N-terminal, e outro de 19 kDa (MSP<sub>119</sub>), correspondente a região C-terminal (BLACKMAN; WHITTLE; HOLDER, 1991; HAN et al., 2018). O fragmento de 33 kDa também pode ser clivado em dois novos fragmentos, um de 14 kDa (MSP<sub>114</sub>) e outro de 20 kDa (MSP<sub>120</sub>). Todos esses fragmentos foram utilizados em diferentes formulações vacinais e demonstraram um papel protetor em diferentes modelos animais, com a indução de alta resposta de anticorpos específicos, produção de citocinas e redução da parasitemia (PERERA et al., 1998; DUTTA et al., 2001; SIERRA et al., 2003; BARRERO et al., 2005). Apesar de todos serem imunogênicos, o candidato mais estudado e promissor é o MSP<sub>119</sub>. Verificou-se que o PvMSP<sub>119</sub> é altamente imunogênico durante a infecção natural em indivíduos que vivem em diversas regiões endêmicas da malária (FERNANDEZ-BECERRA et al., 2010; MOURÃO et al., 2012; KALE et al., 2019).

A PvMSP1 tem uma região de homologia com Pf190L, uma região imunogênica da MSP1 de *P. falciparum*, chamada Pv200L. Quando utilizado em formulações vacinais, observou-se que ela é reconhecida por diferentes cepas de camundongos e poderia induzir uma resposta imune que é impulsionada após a infecção natural (KASLOW; KUMAR, 1996). Além disso, verificou-se que a Pv200L é naturalmente imunogênica e a presença de anticorpos contra a Pv200L foi

correlacionada com o número de infecções anteriores, no Brasil e na Colômbia (VALDERRAMA-AGUIRRE et al., 2005; ECHEVERRY et al., 2011).

Cunha et al. (2001), compararam a imunogenicidade de diferentes sistemas de imunização de vetores bacterianos. Foi observado que entre os candidatos analisados, o His6-MSP1<sub>19</sub> e o His6-MSP1<sub>19</sub>-PADRE, foram os mais reconhecidos por anticorpos de diversos indivíduos expostos ao *P. vivax*, induzindo anticorpos específicos ao MSP1<sub>19</sub>. Além disso, o epítipo PADRE não alterou o reconhecimento dessa proteína recombinante por anticorpos humanos (CUNHA; RODRIGUES; SOARES, 2001). Rosa et al. (2004) mostraram que a presença desse epítipo na formulação de vacinas poderia melhorar muito a resposta imune quando são utilizados em conjunto com adjuvantes fracos. Essa estratégia pode ser útil para melhorar o desenvolvimento de vacinas. Em outro estudo, Rosa et al. (2006) observaram que o His6MSP1<sub>19</sub> fundido com dois epítopos de células T eram altamente imunogênicos em *Callithrix jacchus jacchus*, mas apenas quando administrado em adjuvante incompleto de Freund (ROSA et al., 2004, 2006).

Dobrescu et al. (2020) geraram linhagens transgênicas de *P. berghei* expressando o PvMSP1<sub>19</sub> e utilizaram-nas para desafiar camundongos imunizados com vacinas derivadas de PvMSP1<sub>19</sub> ou PvMSP1<sub>42</sub>. Os resultados mostraram que, apesar da alta indução de anticorpos específicos e de um processo inflamatório equilibrado nos camundongos imunizados, os efeitos protetores da vacinação foram observados apenas mais tarde no curso da infecção, e não foram suficientes para controlar a parasitemia inicial (DOBRESCU et al., 2020). No entanto, essa resposta imune foi capaz de proteger camundongos imunizados da morte (DOBRESCU et al., 2020).

Fonseca et al. (2016) projetaram uma Quimera Modular Recombinante baseada em PvMSP1 (PvRMC-MSP1) que inclui os cinco epítopos de células T mais promíscuos para melhorar a imunogenicidade do PvMSP-1<sub>19</sub> com Montanide ISA 51 como adjuvante em uma formulação vacinal. Esta vacina foi capaz de induzir altas respostas de anticorpos citofílicos tanto em camundongos BALB/c quanto em C57BL/6 (FONSECA et al., 2016). Esses anticorpos foram capazes de reconhecer a proteína nativa em amostras de plasma de indivíduos naturalmente expostos. Além disso, o PvRMC-MSP1 induziu uma resposta de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> contra o MSP-1<sub>19</sub>, que estava relacionado à proteção (FONSECA et al., 2016). Assim, este sistema RMC poderia ser uma excelente estratégia para o desenvolvimento de

vacinas. No entanto, mais estudos são necessários com outros modelos animais e com humanos. Em outro estudo, essa proteína foi fundida com a Pvs25 (uma proteína de superfície de gametócito) em uma vacina multiantigênica (MCCAFFERY et al., 2019). Foi demonstrado que a PvMSP1 pode melhorar a imunogenicidade de Pvs25 (MCCAFFERY et al., 2019). A vacina induziu um alto título de anticorpo, que pode bloquear a transmissão de *P. vivax* no ensaio de alimentação direta de membrana, e produzir células plasmáticas de longa duração (MCCAFFERY et al., 2019).

Sheikh et al. (2016) desenvolveram uma vacina de DNA que codifica para o fragmento MSP1<sub>42</sub>. A imunogenicidade dessa vacina foi investigada pela imunização com a primeira dose de plasmídeo ou proteína recombinante e reforço com a proteína recombinante (SHEIKH et al., 2016). Observou-se a indução da produção de anticorpos e citocinas em ambos os grupos, no entanto, a resposta foi melhor quando a dose e o reforço foram com a proteína recombinante (SHEIKH et al., 2016). No entanto, a imunização com DNA e o reforço com a proteína recombinante foi melhor do que o controle e o DNA sozinho, sugerindo que a proteína recombinante é essencial para melhorar a resposta imune (SHEIKH et al., 2016). Kim et al. (2021) desenvolveram uma formulação composta pelo vírus da Vaccinia da Coreia atenuado (KVAC103) expressando a MSP1<sub>33</sub>. Foi observada uma baixa resposta celular e uma forte resposta de anticorpos após imunização dos camundongos (KIM et al., 2021).

Uma vacina multiantigênica composta pela PvDBP-RII e pela PvMSP1<sub>19</sub> apresentou uma alta indução de resposta humoral após imunização de camundongos quando formulada com Montanide ISA 720 ou Alhydrogel (DEVI et al., 2007). Essa resposta foi superior à de vacinas de antígeno único e não foi observada interferência antigênica, o que é importante para uma vacina eficaz (DEVI et al., 2007). Além disso, a vacina combinada mostrou um alto efeito inibitório da ligação de PvDBP-RII ao receptor DARC em ensaio *in vitro* (DEVI et al., 2007).

Rocha et al. (2017) desenvolveram uma proteína recombinante quimérica PvAMA1<sub>66</sub>-MSP1<sub>19</sub> em *Pichia pastoris* para imunização BALB/c e C57BL/6, com o adjuvante Poly (I: C), e compararam à vacinação com apenas uma proteína (ROCHA et al., 2017). Observou-se que o soro dos indivíduos expostos ao *P. vivax* possuem alto título de anticorpos contra a proteína quimérica, em relação às proteínas individuais (ROCHA et al., 2017). A proteína quimérica induziu alto título de anticorpos, da mesma forma que a PvAMA1<sub>66</sub> sozinha, e aumentou a resposta a MSP1<sub>19</sub> (ROCHA et al., 2017). No entanto, o título dos anticorpos contra o PvMSP-1<sub>19</sub> foi menor em

ambas as imunizações, sugerindo competição entre os antígenos (ROCHA et al., 2017). Além disso, os anticorpos foram capazes de reconhecer a proteína nativa no merozoíto e observou-se alta indução de citocina em ambas as cepas de camundongos (ROCHA et al., 2017).

Outra proteína que tem sido investigada é a paróloga de PvMSP1, chamada de PvMSP1P. A sua estrutura genética é muito semelhante a PvMSP1, mas difere no dobro de domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF) na porção C-terminal e na presença de um perfil de processamento diferente. Apesar disso, a região C-terminal é altamente imunogênica e anticorpos contra a PvMSP1P-19 apresentaram efeito inibitório da ligação ao eritrócito em ensaios *in vitro* (CHENG et al., 2013). Ainda, Min et al. (2017) mostraram que os antígenos de PvMSP1P induzem uma resposta humoral duradoura em infecções naturais, as quais permanecem por 9 meses após a recuperação. Essa resposta esteve associada a presença de uma memória de células B específicas para a PvMSP1P-19 durante o mesmo período (MIN et al., 2017). Além disso, Han et al. (2018) mostraram que a PvMSP1P desempenha um papel importante na aderência e invasão na célula hospedeira. Nesse estudo, verificou-se que anticorpos contra a PvMSP1P tem uma forte atividade inibitória da invasão do reticulócito, sugerindo um papel nas vias alternativas de invasão (HAN et al., 2018). Por fim, HAN et al. (2019) identificaram dois epítomos potenciais para inibição da ligação ao reticulócito e invasão do parasito por meio de anticorpos monoclonais, sugerindo novos candidatos a vacina de subunidade.

As proteínas de superfície de merozoítos 3 (MSP-3) são uma família multiantigênica, que se localizam na superfície de esquizontes maduros e merozoítos. Elas também desempenham um papel na interação com as células hospedeiras (GALINSKI et al., 1999). No *P. vivax*, a MSP-3 é composta por um peptídeo sinal putativo, um domínio central rico em alanina e a ausência de um motivo de ancora de GPI na região C-terminal (GALINSKI et al. 1999; GALINSKI et al., 2001). Os membros mais importantes incluem a PvMSP-3 $\alpha$  e a PvMSP-3 $\beta$ , as quais tem um grande potencial como candidatas vacinais. Já que são imunogênicas, contém importantes regiões conservadas e podem induzir anticorpos que bloqueiam a invasão de merozoítos (GALINSKI et al., 1999, 2001).

Em uma análise sorológica realizada com indivíduos naturalmente expostos à malária vivax na Amazônia brasileira, verificou-se que o PvMSP-3 $\alpha$  é alvo de resposta imune em áreas de transmissão, induzindo um alto título de anticorpos IgG,

que parece estar relacionado à imunidade protetora (LIMA-JUNIOR et al., 2011). Além disso, vários epítomos lineares de células B foram previstos na sequência PvMSP-3 $\alpha$ , sugerindo um alto potencial imunogênico (LIMA-JUNIOR et al., 2011). A presença de anticorpos contra a PvMSP-3 $\alpha$  e a PvMSP-9 foi associado à redução da carga da parasitária e à proteção contra casos clínicos (STANISIC et al., 2013). Oyong et al. (2019) demonstraram que anticorpos naturalmente adquiridos contra a PvMSP3 $\alpha$  podem facilitar a fixação do complemento, além disso, observou-se influência da idade no desenvolvimento dessas respostas específicas de anticorpos. Mourão et al. (2012) discutem que, apesar do polimorfismo natural do PvMSP-3 $\alpha$  (359aa-798aa), essa proteína deve ser considerada no desenvolvimento de vacinas, uma vez que anticorpos específicos a esse antígeno foram observados em pacientes infectados com exposição limitada à malária.

Bitencourt et al. (2013), avaliaram a antigenicidade e a imunogenicidade das formulações vacinais baseadas em PvMSP-3 $\alpha$  e PvMSP-3 $\beta$  recombinantes. Foi observado que um alto percentual de indivíduos residentes em áreas endêmicas de infecção natural no Brasil apresentava anticorpos contra PvMSP-3 $\alpha$  (68,2%) e PvMSP-3 $\beta$  (79,1%) (BITENCOURT et al., 2013). Além disso, após a imunização de camundongos, o PvMSP-3 $\beta$  induziu uma resposta imune humoral mesmo na ausência de qualquer formulação adjuvante, enquanto o PvMSP-3 $\alpha$  não (BITENCOURT et al., 2013). Além disso, quando administrados com adjuvantes (Alum, Quil A, TiterMax, IFA e os agonistas TLR-5 ou -9 - FliC ou CPG ODN 1826), observou-se uma alta indução de anticorpos IgG (BITENCOURT et al., 2013). Em suma, os camundongos imunizados com PvMSP-3 $\alpha$  em Quil A ou PvMSP-3 $\beta$  em CPG ODN 1826, Quil A ou TiterMax geraram títulos de anticorpos significativamente maiores do que os outros adjuvantes (BITENCOURT et al., 2013).

A proteína PvMSP8 também é alvo do desenvolvimento de vacinas. Ela contém uma região de ancoragem GPI, dois domínios semelhantes a EGF na região C-terminal, e é um importante alvo da resposta imune (PEREZ-LEAL et al., 2004). Foi demonstrado que o PvMSP-8 pode induzir respostas imunes humorais e celulares em pacientes infectados com *P. vivax* (CHENG et al., 2017). Não somente, um estudo observou que a PvMSP8 pode induzir uma resposta duradoura pelo desenvolvimento e persistência de anticorpos específicos e MBCs para esse antígeno em indivíduos que adquiriram uma infecção natural (KOCHAYOO et al., 2019).

Foi construída uma proteína recombinante quimérica, chamada rPvMSP8+1, formada pela região C-terminal da PvMSP-1<sub>19</sub> e da PvMSP-8, para avaliar uma vacina multiantigênica em camundongos (SHEN et al., 2021). A imunogenicidade desta formulação foi comparada com as vacinas de antígeno único, PvMSP-1<sub>19</sub> e PvMSP-8 (SHEN et al., 2021). Os anticorpos específicos desenvolvidos contra a rPvMSP8+1 foram capazes de reconhecer as proteínas nativas, MSP-1 e MSP-8, tanto de *P. vivax* como de *P. cynomolgi* (SHEN et al., 2021). Além disso, os camundongos imunizados com a vacina multialélica desenvolveram uma resposta mais elevada de anticorpos e apresentaram maior inibição do crescimento de *P. cynomolgi in vitro* em comparação com ambas as vacinas de antígeno único (SHEN et al., 2021). Esses resultados elucidam o potencial das vacinas multialélicas na indução da resposta imune e na capacidade de inibir o crescimento de parasitos, o que pode estar associado a uma proteção maior. No entanto, são necessários outros estudos que analisem respostas humorais e celulares em outros modelos animais.

A PvMSP-9 também tem sido investigada como um potencial candidato. Ela é uma proteína hidrofílica com um peptídeo de sinal, um aglomerado de quatro cisteínas, um domínio N-terminal conservado e uma região C-terminal contendo blocos de repetição *in tandem* (VARGAS-SERRATO et al., 2002). Esta proteína é altamente antigênica, imunogênica, contém vários epítomos de células T, e foi associada a uma resposta imune adquirida naturalmente (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004; LIMA-JUNIOR et al., 2008; STANISIC et al., 2013; SONGSAIGATH et al., 2021). Além disso, anticorpos monoclonais contra PvMSP9 são capazes de inibir a invasão dos parasitos (BARNWELL et al., 1999).

Rodrigues-da-Silva et al. (2016) identificaram um epítomo linear de célula B altamente imunogênico, chamado de PvMSP9<sub>E795-A808</sub>. Foi observado que este peptídeo é naturalmente imunogênico, uma vez que é alvo de anticorpos IgG de indivíduos que vivem em áreas endêmicas da malária. Além disso, observou-se que este epítomo melhora a resposta imune contra uma proteína recombinante completa (PvMSP9-RIRII). Ademais, o IgG1 específico contra ele foi associado a parâmetros de proteção (RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2016). Em outro estudo, testaram a imunogenicidade deste epítomo, em camundongos, usando três peptídeos sintéticos, com a sequência de PvMSP9<sub>E795-A808</sub> sozinha; ligada ao PvMSP9<sub>A443-K456</sub> (epítomo de célula T) ou ao epítomo universal de célula T da toxina tétano (TTRII). Foi demonstrado que ambos os epítomos provocaram anticorpos IgG específicos, principalmente IgG1

e IgG2, capazes de reconhecer a proteína nativa (RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2019). Contudo, a resposta imune humoral foi melhorada quando foi utilizada a PvMSP9<sub>E795-A808</sub> ligada ao epítopo TTRII, mostrando um papel importante dos epítopos de células T para melhorar as vacinas de subunidades (RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2019). Soares et al. (2020) observaram uma indução de anticorpos de curta duração, mas respostas de células B de memória específicas ao PvMSP9<sub>E795-A808</sub> em indivíduos expostos a malária em regiões com declínio de transmissão no Brasil, sugerindo uma resposta imune de longa duração (SOARES et al., 2020).

A PvMSP-10 também tem sido investigada. Essa proteína contém uma sequência de peptídeo sinal na região N terminal, dois domínios semelhantes a EGF na região C terminal e uma região de ancoragem GPI (PEREZ-LEAL et al., 2005). Foi demonstrado que essa proteína se liga seletivamente aos reticulócitos (RICAURTE-CONTRERAS et al., 2021). Foram encontrados dois peptídeos que estão envolvidos nesse processo e poderiam ser utilizados em ensaios de imunização, uma vez que possuem baixo polimorfismo; epítopos de células B e T e podem inibir a ligação aos reticulócitos (CONTRERAS et al., 2021). Uma proteína recombinante derivada da PvMSP10 quando utilizada como vacina, com os adjuvantes Freund, Montanide ISA720 ou Hidróxido de Alumínio, em *Aotus* spp., induziu forte imunogenicidade (GIRALDO et al., 2009). Os anticorpos produzidos foram capazes de reconhecer a proteína nativa nos estágios tardios de esquizonte (GIRALDO et al., 2009). No entanto, nenhuma das formulações foi capaz de proteger os macacos imunizados após o desafio (GIRALDO et al., 2009). Cheng et al. (2014), demonstraram que os anticorpos anti-MSP10 são reconhecidos pelo soro de pacientes infectados, predominantemente de respostas citofílicas de IgG1 e IgG3 (CHENG et al., 2014). O mesmo perfil de resposta de anticorpos foi observado após a imunização de camundongos, também, uma alta resposta de citocinas foi obtida (CHENG et al., 2014). O PvMSP10 também foi capaz de induzir uma forte resposta imune em camundongos e coelhos imunizados (CHENG et al., 2014).

Além desses candidatos, que já são bem caracterizados, existem outras proteínas que também estão envolvidas nos processos de adesão, invasão ou interação com os reticulócitos, e que tem sido investigadas em formulações vacinais, já que poderiam contribuir com a indução de respostas capazes de bloquear a invasão dos reticulócitos. Estas candidatas estão apresentadas no próximo tópico.

#### 4.2.5 Outros candidatos vacinais

Alguns outros antígenos também estão sendo estudados, na tentativa de identificar e caracterizar proteínas do *P. vivax* que poderiam conferir proteção contra a malária e aquelas apresentam características ideais como candidatos à vacina. No entanto, pouco se sabe sobre seu potencial, uma vez que apenas alguns estudos foram realizados.

A proteína 2 de ligação ao eritrócito (PvEBP2), recentemente, foi relacionada a vias alternativas de invasão aos reticulócitos (ADAMS et al., 1992; HESTER et al., 2013; NTUMNGIA et al., 2016; ROESCH et al., 2018). Alguns estudos sugerem que essa atividade da PvEBP2 se dá independentemente da PvDBP (NTUMNGIA et al., 2016; ROESCH et al., 2018). Além disso, estudos soroepidemiológicos indicam que essa proteína é alvo da imunidade naturalmente adquirida em exposições naturais ao *P. vivax*. (LONGLEY et al., 2020; ASSIS et al., 2021). Ainda, anticorpos anti-PvEBP2 estão relacionados a proteção e redução do risco de doença clínica (FRANÇA et al., 2017; HE et al., 2019b). Esses estudos sugerem que a PvEBP2 poderia ser um potencial candidato vacinal, no entanto, mais estudos são necessários para caracterizar seu papel e imunogenicidade.

Outra possível candidata que tem sido investigada é a Proteína Adesiva de Merozoíto de Ligação ao Eritrócito (MAEBL), que foi associada a proteção em *P. yoelli* (LEITE et al., 2015). A MAEBL é uma proteína de membrana da família de proteínas de ligação ao eritrócito (EBL) expressa tanto no estágio pré-eritrocítico como no estágio sanguíneo e na glândula salivar dos insetos (GHAL et al., 2002), sugerindo que é essencial para os processos de invasão e infecção do parasito. Algumas análises de imunoinformática sugerem que os antígenos MAEBL poderiam ser candidatos vacinais promissores entre diferentes espécies e cepas, já que apresentam epítomos conservados entre *P. yoelli*, *P. falciparum* e *P. vivax* (CRAVO et al., 2018). Além disso, estudos funcionais mostraram que anticorpos contra PyMAEBL-M2 foram reativos contra *P. falciparum* e *P. vivax* e apresentaram uma significativa taxa de inibição da invasão dos eritrócitos em ambas espécies (CRAVO et al., 2018). Dessa forma, estes resultados sugerem que essa proteína poderia superar a imunidade cepa-específica (CRAVO et al., 2018).

Outros possíveis candidatos são os antígenos ricos em triptofano (TRAGs), pertencentes a família Pv-fam-a, a qual contém 36 proteínas com resíduos

conservados de triptofano. Estudos tem demonstrado que pelo menos 15 membros dessa família podem induzir tanto uma resposta imune humoral como celular em indivíduos expostos ao *P. vivax*. Ainda, existem nessas proteínas vários epítomos conservados de células T e B que poderiam ser utilizados nos desenhos vacinais (ZEESHAN; BORA; SHARMA, 2013). Algumas PvTRAGs tem a capacidade de se ligar ao eritrócito e esse processo pode ser inibido pelo soro de pacientes expostos a malária (ZEESHAN et al., 2015). Uma delas é a PvTRAG-26, uma proteína subcelular expressa nas formas de anéis, que se localiza com o complexo caveola-vesícula, que é uma estrutura fundamental no processo de invasão (FAN et al., 2020). Uma proteína recombinante derivada desse antígeno foi utilizada na imunização de camundongos e demonstrou alta antigenicidade e imunogenicidade, com resposta do tipo Th1 e Th2, sugerindo a PvTRAG-26 como uma nova candidata vacinal (FAN et al., 2020).

A proteína 2 do colar de roptrias (PvRON2) é expressa nas roptrias dos estágios tardios de esquizontes e desempenha um papel importante na invasão aos eritrócitos pela formação do complexo de junção de movimento, com a AMA1, e do vacúolo parasitóforo (ARÉVALO-PINZÓN et al., 2011; SRINIVASAN et al., 2011). Anticorpos contra esse complexo poderia inibir a invasão das células humanas, e, portanto, poderia ser alvo de vacinas (SRINIVASAN et al., 2011). Contudo, LÓPEZ et al. (2018) encontraram uma baixa imunogenicidade ao avaliar alguns epítomos de células B e T. Apesar disso, Bittencourt et al. (2018) sugerem que o PvRON2 induz uma resposta de anticorpos de longo prazo, uma vez que foi identificado anticorpos naturalmente adquiridos para PvRON2 (1828aa–2080aa), na região de interação com AMA1, em indivíduos infectados e não infectados de uma região endêmica da malária do Brasil. Além disso, essa sequência é conservada entre diferentes isolados brasileiros, sugerindo que essa região específica é pouco polimórfica e uma potencial candidata (BITTENCOURT et al., 2018).

O outro antígeno identificado é uma proteína hipotética com 50 kDa, chamada Pv50. É uma proteína altamente conservada presente no estágio sanguíneo do parasito formada por uma sequência de peptídeo sinal e um domínio de ligação de lipídios (CHENG et al., 2019). Este peptídeo mostrou reatividade com soro de paciente infectado por malária vivax (CHEN et al., 2010; CHENG et al., 2019). Cheng et al. (2019) mostraram uma colocalização e uma forte interação entre Pv50 e MSP1, que poderiam ser alvos de vacinas multiantigênicas. Além disso, uma vacina foi

desenvolvida com uma Pv50 recombinante, ela induziu a produção de altos níveis de anticorpos em camundongos, principalmente IgG1 e IgG3 (CHENG et al., 2019). Apesar da imunogenicidade, mais estudos são necessários para ter uma melhor compreensão da resposta imune induzida por esse antígeno.

O antígeno micronemal ancorado em GPI (GAMA) é uma proteína apical que tem um papel adesivo em parasitos apicomplexos, e contém duas regiões conservadas com propriedades de ligação de reticulócito em *P. vivax*, o que pode ser interessante para o desenvolvimento da vacina (BAQUERO et al., 2017). No entanto, a resposta de anticorpos contra essas regiões não foi suficiente para inibir a interação (BAQUERO et al., 2017). Baquero et al. (2017) sugerem duas regiões funcionais, CR1 e CR2, que estão sob seleção negativa, que poderiam ser direcionadas para a construção de vacinas. No entanto, são necessários mais estudos para investigar o potencial desse candidato.

Por fim, a proteína de membrana transcrita precoce (ETRAMP), expressa nas formas de esquizonte e anéis, também é sugerida como candidata vacinal. No entanto, pouco se sabe sobre ela. Lee et al. (2019) mostraram que o PvETRAMP era reativo aos soros de pacientes infectados com *P. vivax*. Além disso, foi avaliada a resposta imune ao PvETRAMP4 em camundongos imunizados, a qual apresentou alta indução de anticorpos específicos, principalmente IgG1 e IgG2b, sugerindo um potencial imunogênico desse candidato (LEE et al., 2019).

Em suma, observa-se que os candidatos vacinais contra o *P. vivax* disponíveis são altamente polimórficos e apresentam uma baixa eficácia na proteção contra a malária. Muitos estudos em fase pré-clínica não avançam para a fase clínica, justamente por isso. Nesse contexto, novos estudos são necessários a fim de identificar e caracterizar novas proteínas do parasito, buscando investigar suas potencialidades como candidatas vacinais.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A malária, há décadas, se constitui como um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo. No entanto, ela ainda é negligenciada, principalmente, a causada pelo *P. vivax*. Além disso, o estudo desse parasito apresenta várias limitações, que contribuem para uma imensa lacuna no conhecimento de sua biologia. Esse cenário reflete diretamente no atraso no desenvolvimento de vacinas. Conforme discutido anteriormente, existem poucos candidatos vacinais em estudo contra a malária vivax, quando comparado com a quantidade de candidatos existentes no combate ao *P. falciparum*. Destes, apenas três alcançaram a etapa clínica: a PvCSP, a PvDBP e a Pvs25. Infelizmente, esses estudos demonstraram uma baixa eficácia e uma proteção parcial. Portanto, a busca por novos candidatos é fundamental. Nessa perspectiva, nas últimas décadas, diversos grupos de pesquisa têm se esforçado para identificar novos antígenos, expressos especificamente em cada estágio do ciclo de vida do parasito, na tentativa de se obter um candidato capaz de bloquear o ciclo evolutivo do parasito.

Os principais antígenos de estágio pré-eritrocítico são as vacinas derivadas de PvCSP e PvTRAP, as quais induzem uma resposta de anticorpos capazes de bloquear a invasão dos hepatócitos. Já em relação aos antígenos de estágio sanguíneo, os estudos mais avançados são direcionados a PvDBP, a principal proteína envolvida na invasão dos reticulócitos. Entretanto, novos antígenos foram relacionados a vias alternativas de invasão, tais como PvRBP, PvAMA1 e PvMSP. De acordo com os estudos apresentados, anticorpos específicos contra estas proteínas podem inibir a ligação do parasito aos eritrócitos. Além delas, existem outras proteínas em estudos iniciais, como a PvEBP2, MAELB, Pv50, PvRON2, PvTRAGs, GAMA e PvETRAMP, que também estão relacionadas com os processos de invasão, adesão ou interação com os eritrócitos.

Além disso, diversas estratégias têm sido desenvolvidas para melhorar a eficácia das vacinas, como: a utilização do sistema de imunização heterólogo *prime-boost*; o uso de vacinas multiantigênicas; a identificação epítomos específicos; a utilização de diferentes plataformas vacinais e a combinação de diferentes adjuvantes.

Entre essas estratégias, o desenvolvimento de uma vacina com múltiplos antígenos, em especial de diferentes estágios do ciclo de vida, poderia fornecer uma maior eficácia ao bloquear as três etapas do ciclo evolutivo do parasito. De acordo

com os resultados analisados, essas vacinas provocam uma resposta imune mais forte e duradoura, capaz de induzir uma maior proteção contra a doença e, inclusive, conferir uma imunidade contra diferentes cepas.

No entanto, mais estudos são necessários para identificar e caracterizar novos candidatos e avaliar quais as melhores combinações de antígenos, de plataformas, de sistema de imunização e de adjuvante nas formulações vacinais, na tentativa de se obter uma vacina segura e eficaz, visto que esta é uma das estratégias mais eficiente para prevenir e controlar a malária. Contudo, além da necessidade de se obter uma vacina, ressalta-se a necessidade de outras medidas para controle e, eventual, eliminação da malária, tais como: metodologias para controle do vetor, a melhoria das condições de vida e de acesso a saúde das populações que residem em áreas endêmicas e o investimento em pesquisa sobre a biologia do parasito, o desenvolvimento de novos tratamentos e novos testes de diagnósticos, entre outros.

Por fim, neste trabalho foram compilados os principais achados sobre o desenvolvimento de vacinas no combate ao *P. vivax*, as limitações e estratégias relacionadas. Espera-se que os resultados aqui apresentados possam auxiliar em futuras investigações e contribuir com o conhecimento sobre vacinas para a malária vivax.

## REFERÊNCIAS

- A. MACRAILD, C. et al. Apical Membrane Antigen 1 as an Anti-Malarial Drug Target. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2039–2047, 1 ago. 2011.
- ADAMS, J. H. et al. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 15, p. 7085–7089, 1992.
- ADAMS, J. H.; MUELLER, I. The biology of *Plasmodium vivax*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 9, 2017.
- ALONSO, P. L.; TANNER, M. Public health challenges and prospects for malaria control and elimination. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 150–155, 2013.
- ANTONELLI, L. R. et al. The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. **Immunological Reviews**, v. 293, n. 1, p. 163–189, 2020.
- AREVALO-HERRERA, M. et al. Randomized clinical trial to assess the protective efficacy of a *Plasmodium vivax* CS synthetic vaccine. **Research Square**. PREPRINT (Version 1). p. 1–17, 2021.
- ARÉVALO-HERRERA, M. et al. Protective Efficacy of *Plasmodium vivax* Radiation-Attenuated Sporozoites in Colombian Volunteers: A Randomized Controlled Trial. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005070, 19 out. 2016.
- ARÉVALO-PINZÓN, G. et al. PvRON2, a new *Plasmodium vivax* rhoptry neck antigen. **Malaria Journal**, v. 10, n. March, 2011.
- ARNOT, D. et al. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science**, v. 230, n. 4727, p. 815–818, 15 nov. 1985.
- ASSIS, G. M. P. DE et al. Profiling Humoral Immune Response Against Pre-Erythrocytic and Erythrocytic Antigens of Malaria Parasites Among Neotropical Primates in the Brazilian Atlantic Forest. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1–15, 2021.
- ATCHESON, E. et al. Tailoring a *Plasmodium vivax* vaccine to enhance efficacy through a combination of a CSP virus-like particle and TRAP viral vectors. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 9, p. 1–16, 2018.
- ATCHESON, E. et al. Discovery of four new B-cell protective epitopes for malaria using Q beta virus-like particle as platform. **Nature npj Vaccines**, v. 5, n. 1, p. 92, 8 dez. 2020.
- ATCHESON, E.; REYES-SANDOVAL, A. Protective efficacy of peptides from *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. **Vaccine**, v. 38, n. 27, p. 4346–4354, jun. 2020.

BAIRD, J. K. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 11, p. 533–539, 2007.

BAQUERO, L. A. et al. PvGAMA reticulocyte binding activity: predicting conserved functional regions by natural selection analysis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 251, 19 dez. 2017.

BARNWELL, J. W. et al. *Plasmodium vivax*, *P. cynomolgi*, and *P. knowlesi*: Identification of homologue proteins associated with the surface of merozoites. **Experimental Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 238–249, 1999.

BARRERO, C. A. et al. Gamma interferon levels and antibody production induced by two PvMSP-1 recombinant polypeptides are associated with protective immunity against *P. vivax* in Aotus monkeys. **Vaccine**, v. 23, n. 31, p. 4048–4053, 2005.

BATCHELOR, J. D. et al. Red Blood Cell Invasion by *Plasmodium vivax*: Structural Basis for DBP Engagement of DARC. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, 2014.

BAUZA, K. et al. Efficacy of a *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Using ChAd63 and Modified Vaccinia Ankara Expressing Thrombospondin-Related Anonymous Protein as Assessed with Transgenic *Plasmodium berghei* Parasites. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1277–1286, mar. 2014.

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

BENNETT, J. W. et al. Phase 1/2a Trial of *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, 26 fev. 2016.

BITENCOURT, A. R. et al. Antigenicity and Immunogenicity of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-3. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56061, 14 fev. 2013.

BITTENCOURT, N. C. et al. Genetic sequence characterization and naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* Rhoptry Neck Protein 2 (PvRON2). **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2018.

BITTENCOURT, N. C. et al. *Plasmodium vivax* AMA1: Implications of distinct haplotypes for immune response. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. e0008471, 8 jul. 2020.

BITTENCOURT, N. C.; BERTOLLA, L. P.; ALBRECHT, L. Insights on Rosetting Phenomenon in *Plasmodium vivax* Malaria. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2 mar. 2021.

BLACKMAN, M. J.; WHITTLE, H.; HOLDER, A. A. Processing of the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein-1: identification of a 33-kilodalton secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 35–44, 1991.

BOUILLET, L. É. M. et al. Long-term humoral and cellular immune responses elicited by a heterologous *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 protein prime/adenovirus boost immunization protocol. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 9, p. 3642–3652, 2011.

BOURGARD, C. et al. *Plasmodium vivax* Biology: Insights Provided by Genomics, Transcriptomics and Proteomics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 8 fev. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Malária. Boletim Epidemiológico. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Guia de tratamento da malária no Brasil [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

BUENO, L. L. et al. *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidate AMA-1 plays an important role in adaptive immune response eliciting differentiation of dendritic cells. **Vaccine**, v. 27, n. 41, p. 5581–5588, set. 2009.

BUENO, L. L. et al. Identification of a Highly Antigenic Linear B Cell Epitope within *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1). **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.

CABRAL-MIRANDA, G. et al. Virus-Like Particle (VLP) Plus Microcrystalline Tyrosine (MCT) Adjuvants Enhance Vaccine Efficacy Improving T and B Cell Immunogenicity and Protection against *Plasmodium berghei/vivax*. **Vaccines**, v. 5, n. 2, p. 10, 2 maio 2017.

CARLTON, J. M. et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nature**, v. 455, n. 7214, p. 757–763, 2008.

CARTER, R. et al. Malaria transmission-blocking vaccines—how can their development be supported? **Nature Medicine**, v. 6, n. 3, p. 241–244, mar. 2000.

CARVALHO, B. O. et al. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. **Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 4, p. 638–647, 2010.

CASTELLANOS, A. M. et al. *Plasmodium vivax* TRAP: Immunogenicity and protective efficacy in rodents and Aotus monkeys. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, S, p. 571, 2007.

CÉSPEDES, N. et al. Antigenicity and immunogenicity of a novel chimeric peptide antigen based on the *P. vivax* circumsporozoite protein. **Vaccine**, v. 31, n. 42, p. 4923–4930, 2013.

CÉSPEDES, N. et al. Antigenicity and immunogenicity of a novel *Plasmodium vivax* circumsporozoite derived synthetic vaccine construct. **Vaccine**, v. 32, n. 26, p. 3179–3186, maio 2014.

- CHAN, L.-J. et al. Naturally acquired blocking human monoclonal antibodies to *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein 2b. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1538, 9 dez. 2021.
- CHAN, L. J. et al. *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins for invasion into reticulocytes. **Cellular Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 1–11, 2020.
- CHANGROB, S. et al. Persistence of Long-lived Memory B Cells specific to Duffy Binding Protein in individuals exposed to *Plasmodium vivax*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8347, 29 dez. 2018.
- CHEN, E. et al. Broadly neutralizing epitopes in the *Plasmodium vivax* vaccine candidate Duffy Binding Protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 22, p. 6277–6282, 2016.
- CHEN, J. et al. Immunoproteomics profiling of blood stage *Plasmodium vivax* infection by high-throughput screening assays Immunoproteomics profiling of blood stage *Plasmodium vivax* infection by high-throughput screening assays Institute of Parasitic Diseases , Zhejiang Ac. **Journal of Proteome Research**, p. 6479–6489, 2010.
- CHENG, Y. et al. The *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 paralog is a novel erythrocyte-binding ligand of *P. vivax*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 5, p. 1585–1595, 2013.
- CHENG, Y. et al. Immunogenicity and antigenicity of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 10. **Parasitology Research**, v. 113, n. 7, p. 2559–2568, 25 jul. 2014.
- CHENG, Y. et al. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 8 in patients with *P. vivax* infection. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2017.
- CHENG, Y. et al. Identification and characterization of Pv50, a novel *Plasmodium vivax* merozoite surface protein. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2019.
- CHIM-ONG, A. et al. The Blood Stage Antigen RBP2-P1 of *Plasmodium vivax* Binds Reticulocytes and Is a Target of Naturally Acquired Immunity. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 4, p. 1–11, 23 mar. 2020.
- CHITNIS, C. E.; MILLER, L. H. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 2, p. 497–506, 1994.
- CHOOTONG, P. et al. Mapping epitopes of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 1089–1095, 2010.

COLE-TOBIAN, J. L. et al. Strain-specific duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous *Plasmodium vivax* strains in Papua New Guinean children. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 4009–4017, 2009.

COSTA, F. T. M. et al. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: Perspectives from the Brazilian field. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 12, p. 1099–1105, 2012.

CRAVO, P. et al. In silico epitope mapping and experimental evaluation of the Merozoite Adhesive Erythrocytic Binding Protein (MAEBL) as a malaria vaccine candidate. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2018.

CUNHA, M. G.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP119 expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine**, v. 20, n. 3–4, p. 385–396, 2001.

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

DE CAMARGO, T. M. et al. Prime-boost vaccination with recombinant protein and adenovirus-vector expressing *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (CSP) partially protects mice against Pb/Pv sporozoite challenge. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

DE CASSAN, S. C. et al. Preclinical assessment of viral vectored and protein vaccines targeting the Duffy-binding protein region II of *Plasmodium vivax*. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1–15, 2015.

DE SOUSA, T. N. et al. The duffy binding protein as a key target for a *Plasmodium vivax* vaccine: Lessons from the Brazilian Amazon. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 608–617, 2014.

DEVI, Y. S. et al. Immunogenicity of *Plasmodium vivax* combination subunit vaccine formulated with human compatible adjuvants in mice. **Vaccine**, v. 25, n. 28, p. 5166–5174, 2007.

DOBRESCU, I. et al. Protective Immunity in Mice Immunized With *P. vivax* MSP119-Based Formulations and Challenged With *P. berghei* Expressing PvMSP119. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. February, p. 1–17, 2020.

DRAPER, S. J. et al. Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 1, p. 43–56, 2018.

DUTTA, S. et al. Purification, characterization, and immunogenicity of a disulfide cross-linked *Plasmodium vivax* vaccine candidate antigen, merozoite surface protein 1, expressed in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5464–5470, 2001.

ECHEVERRY, D. M. et al. Evaluation of the Naturally Acquired Antibody Immune Response to the Pv200L N-terminal Fragment of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 in Four Areas of the Amazon Region of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2\_Suppl, p. 58–63, 4 fev. 2011.

FAN, L. et al. An Erythrocyte Membrane-Associated Antigen, PvTRAg-26 of *Plasmodium vivax*: A Study of Its Antigenicity and Immunogenicity. **Frontiers in Public Health**, v. 8, p. 1–10, 28 abr. 2020.

FERNANDEZ-BECERRA, C. et al. Naturally-acquired humoral immune responses against the N- and C-termini of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein in endemic regions of Brazil and Papua New Guinea using a multiplex assay. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2010.

FONSECA, J. A. et al. A chimeric protein-based malaria vaccine candidate induces robust T cell responses against *Plasmodium vivax* MSP1 19. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–18, 2016.

FRANÇA, A. C. B. et al. Antibodies Against the *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 From the Belem Strain Share Common Epitopes Among Other Worldwide Variants. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1–13, 16 mar. 2021.

FRANÇA, C. T. et al. *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins Are Key Targets of Naturally Acquired Immunity in Young Papua New Guinean Children. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1–17, 2016.

FRANÇA, C. T. et al. Identification of Highly-Protective combinations of *Plasmodium vivax* recombinant proteins for vaccine development. **eLife**, v. 6, p. 1–22, 2017.

FRIMPONG, A. et al. Novel Strategies for Malaria Vaccine Design. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–14, 2018.

GALINSKI, M. R. et al. A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. **Cell**, v. 69, n. 7, p. 1213–1226, 1992.

GALINSKI, M. R. et al. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 contains coiled-coil motifs in an alanine-rich central domain. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 101, n. 1–2, p. 131–147, jun. 1999.

GALINSKI, M. R. et al. *Plasmodium vivax* merozoite surface proteins-3 $\beta$  and-3 $\gamma$  share structural similarities with *P. vivax* merozoite surface protein-3 $\alpha$  and define a new gene family. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 41–53, jun. 2001.

GENTIL, F. et al. A recombinant vaccine based on domain II of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice. **Vaccine**, v. 28, n. 38, p. 6183–6190, ago. 2010.

GEORGE, M. T. et al. Identification of an Immunogenic Broadly Inhibitory Surface Epitope of the *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein Ligand Domain. **mSphere**, v. 4, n. 3, p. 1–14, 26 jun. 2019.

GHAJ, M. et al. Identification, expression, and functional characterization of MAEBL, a sporozoite and asexual blood stage chimeric erythrocyte-binding protein of *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 123, n. 1, p. 35–45, 2002.

GIMENEZ, A. M. et al. Vaccine Containing the Three Allelic Variants of the *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Antigen Induces Protection in Mice after Challenge with a Transgenic Rodent Malaria Parasite. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 11 out. 2017.

GIMENEZ, A. M. et al. A universal vaccine candidate against *Plasmodium vivax* malaria confers protective immunity against the three PvCSP alleles. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2021.

GIRALDO, M. A. et al. Vaccination with recombinant *Plasmodium vivax* MSP-10 formulated in different adjuvants induces strong immunogenicity but no protection. **Vaccine**, v. 28, n. 1, p. 7–13, dez. 2009.

GOLASSA, L. et al. The biology of unconventional invasion of Duffy-negative reticulocytes by *Plasmodium vivax* and its implication in malaria epidemiology and public health. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2020.

GREENWOOD, B. M. et al. Malaria : progress , perils , and prospects for eradication Find the latest version : Review series Malaria : progress , perils , and prospects for eradication. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1266–1276, 2008.

GRUSZCZYK, J. et al. Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for *Plasmodium vivax*. **Science**, v. 359, n. 6371, p. 48–55, 2018.

GUPTA, D. K. et al. The *Plasmodium* liver-specific protein 2 (LISP2) is an early marker of liver stage development. **eLife**, v. 8, p. 1–21, 16 maio 2019.

GUPTA, E. D. et al. Naturally Acquired Human Antibodies Against Reticulocyte-Binding Domains of *Plasmodium vivax* Proteins, PvRBP2c and PvRBP1a, Exhibit Binding-Inhibitory Activity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 10, p. 1558–1568, 15 maio 2017.

GUPTA, S. et al. Targeting a reticulocyte binding protein and duffy binding protein to inhibit reticulocyte invasion by *Plasmodium vivax*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

GUY, A. J. et al. Structural patterns of selection and diversity for *Plasmodium vivax* antigens DBP and AMA1. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2018.

- HAN, J.-H. et al. Inhibition of parasite invasion by monoclonal antibody against epidermal growth factor-like domain of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 paralog. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3906, 7 dez. 2019.
- HAN, J. H. et al. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 paralog as a mediator of parasite adherence to reticulocytes. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 9, p. 1–13, 2018.
- HE, W. Q. et al. Antibodies to *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein 2b are associated with protection against *P. vivax* malaria in populations living in low malaria transmission regions of Brazil and Thailand. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. 1–17, 2019a.
- HE, W. Q. et al. Antibody responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding and Erythrocyte binding proteins predict risk of infection and are associated with protection from clinical Malaria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. 1–19, 2019b.
- HERRERA, S. et al. Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 13–14, p. 1535–1546, dez. 2004.
- HERRERA, S. et al. Safety and elicitation of humoral and cellular responses in Colombian malaria-naive volunteers by a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 5, p. 3–9, 2005.
- HERRERA, S. et al. Phase I Safety and Immunogenicity Trial of *Plasmodium vivax* CS Derived Long Synthetic Peptides Adjuvanted with Montanide ISA 720 or Montanide ISA 51. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2\_Suppl, p. 12–20, 4 fev. 2011.
- HESTER, J. et al. De Novo Assembly of a Field Isolate Genome Reveals Novel *Plasmodium vivax* Erythrocyte Invasion Genes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, 2013.
- HIETANEN, J. et al. Gene models, expression repertoire, and immune response of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding proteins. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 3, p. 677–685, 2016.
- HORUK, R. et al. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: The erythrocyte chemokine receptor. **Science**, v. 261, n. 5125, p. 1182–1184, 1993.
- JAHANGIRI, F.; JALALLOU, N.; EBRAHIMI, M. Analysis of Apical Membrane Antigen (AMA)-1 characteristics using bioinformatics tools in order to vaccine design against *Plasmodium vivax*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 71, n. April, p. 224–231, 2019.

- KALE, S. et al. Antibody responses within two leading *Plasmodium vivax* vaccine candidate antigens in three geographically diverse malaria-endemic regions of India. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2019.
- KANJEE, U. et al. Molecular and cellular interactions defining the tropism of *Plasmodium vivax* for reticulocytes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 46, p. 109–115, dez. 2018.
- KASLOW, D. C.; KUMAR, S. Expression and immunogenicity of the C-terminus of a major blood-stage surface protein of *Plasmodium vivax*, Pv20019, secreted from *Saccharomyces cerevisiae*. **Immunology Letters**, v. 51, n. 3, p. 187–189, 1996.
- KEPPLE, D. et al. Alternative invasion mechanisms and host immune response to *Plasmodium vivax* malaria: Trends and future directions. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2021.
- KIM, T. Y. et al. Korea vaccinia viral vectored vaccine expressing 33 kDa fragment of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 elicited strong humoral immune responses in mice. **Korean Journal of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 39–45, 2021.
- KING, C. L. et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8363–8368, 2008.
- KING, C. L. et al. Fya/Fyb antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 20113–20118, 13 dez. 2011.
- KOCHAYOO, P. et al. The acquisition of long-lived memory B cell responses to merozoite surface protein-8 in individuals with *Plasmodium vivax* infection. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2019.
- KOCKEN, C. H. M. et al. High-Level Expression of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: Strong Immunogenicity in *Macaca mulatta* Immunized with *P. vivax* AMA-1 and Adjuvant SBAS2. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 43–49, jan. 1999.
- KOSUWIN, R. et al. Naturally acquired IgG antibodies to thrombospondin-related anonymous protein of *Plasmodium vivax* (PvTRAP) in Thailand predominantly elicit immunological cross-reactivity. **Tropical Medicine and International Health**, v. 23, n. 8, p. 923–933, 2018.
- KROGSTAD, D. J. Malaria as a Reemerging Disease. **Epidemiologic Reviews**, v. 18, n. 1, p. 77–89, 1996.
- KURTOVIC, L. et al. Recent clinical trials inform the future for malaria vaccines. **Communications Medicine**, v. 1, n. 1, p. 26, 25 dez. 2021.

- LAURENS, M. B. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 16, n. 3, p. 480–489, 3 mar. 2020.
- LEE, S. K. et al. Evaluation of antibody responses to the early transcribed membrane protein family in *Plasmodium vivax*. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2019.
- LEITE, J. A. et al. Immunization with the MAEBL M2 domain protects against lethal *Plasmodium yoelii* infection. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 10, p. 3781–3792, 2015.
- LIMA-JUNIOR, J. C. et al. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 9 in Northwestern Amazon individuals. **Vaccine**, v. 26, n. 51, p. 6645–6654, 2008.
- LIMA-JUNIOR, J. C. et al. B cell epitope mapping and characterization of naturally acquired antibodies to the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-3 $\alpha$  (PvMSP-3  $\alpha$ ) in malaria exposed individuals from Brazilian Amazon. **Vaccine**, v. 29, n. 9, p. 1801–1811, 2011.
- LIMA, L. C. et al. A multistage formulation based on full-length CSP and AMA-1 ectodomain of *Plasmodium vivax* induces high antibody titers and T-cells and partially protects mice challenged with a transgenic *Plasmodium berghei* parasite. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 1–17, 2020.
- LONGLEY, R. J. et al. Asymptomatic *Plasmodium vivax* infections induce robust IgG responses to multiple blood-stage proteins in a low-transmission region of western Thailand. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2017.
- LONGLEY, R. J. et al. Development and validation of serological markers for detecting recent *Plasmodium vivax* infection. **Nature Medicine**, v. 26, n. 5, p. 741–749, 2020.
- LÓPEZ, C. et al. The in vitro antigenicity of *Plasmodium vivax* rhoptry neck protein 2 (PvRON2) B- and T-epitopes selected by HLA-DRB1 binding profile. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–17, 2018.
- MARQUES, R. F. et al. Protective Malaria Vaccine in Mice Based on the *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein Fused with the Mumps Nucleocapsid Protein. **Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 190, 19 abr. 2020.
- MATOS, A. DA S. et al. Antibody Responses Against *Plasmodium vivax* TRAP Recombinant and Synthetic Antigens in Naturally Exposed Individuals From the Brazilian Amazon. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1–12, 20 set. 2019.
- MCCAFFERY, J. N. et al. A Multi-Stage *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidate Able to Induce Long-Lived Antibody Responses Against Blood Stage Parasites and Robust Transmission-Blocking Activity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 1 maio 2019.

MCCONKEY, S. J. et al. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 729–735, 25 jun. 2003.

MEDEIROS, C. M. P. et al. Dynamics of IgM and IgG responses to the next generation of engineered Duffy binding protein II immunogen: Strain-specific and strain-transcending immune responses over a nine-year period. **PLOS ONE**, v. 15, n. 5, p. e0232786, 7 maio 2020.

MICHON, P.; FRASER, T.; ADAMS, J. H. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3164–3171, 2000.

MILLER, L. H. et al. The Resistance Factor to *Plasmodium vivax* in Blacks. **New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 6, p. 302–304, 5 ago. 1976.

MIN, H. M. K. et al. Immunogenicity of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 paralog in the induction of naturally acquired antibody and memory B cell responses. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 354, 30 dez. 2017.

MITRAN, C. J. et al. Antibodies to cryptic epitopes in distant homologues underpin a mechanism of heterologous immunity between plasmodium vivax PvDBP and *Plasmodium falciparum* VAR2CSA. **mBio**, v. 10, n. 5, p. 1–17, 2019.

MOON, J. J. et al. Antigen-displaying lipid-enveloped PLGA nanoparticles as delivery agents for a *Plasmodium vivax* malaria vaccine. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

MORENO, A. et al. Preclinical assessment of the receptor-binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein as a vaccine candidate in rhesus macaques. **Vaccine**, v. 26, n. 34, p. 4338–4344, 2008.

MOURÃO, L. C. et al. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* blood-stage vaccine candidates (PvMSP-1 19 and PvMSP-3 $\alpha$  359-798) and their relationship with hematological features in malaria patients from the Brazilian Amazon. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 9, p. 730–739, 2012.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 555–566, 2009.

MUELLER, I.; SHAKRI, A. R.; CHITNIS, C. E. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. **Vaccine**, v. 33, n. 52, p. 7489–7495, dez. 2015.

MÚFALO, B. C. et al. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 12–13, p. 1266–1273, 2008.

NAIR, M. et al. Structure of domain III of the blood-stage malaria vaccine candidate, *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1). **Journal of Molecular Biology**, v. 322, n. 4, p. 741–753, 2002.

NAZERI, S. et al. Naturally acquired immune responses to thrombospondin-related adhesion protein (TRAP) of *Plasmodium vivax* in patients from areas of unstable malaria transmission. **Acta Tropica**, v. 173, p. 45–54, 2017.

NAZERI, S. et al. Vaccine adjuvants CpG (oligodeoxynucleotides ODNs), MPL (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A) and naloxone-enhanced Th1 immune response to the *Plasmodium vivax* recombinant thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 207, n. 5–6, p. 271–286, 9 nov. 2018.

NAZERI, S. et al. Measuring of IgG2c isotype instead of IgG2a in immunized C57BL/6 mice with *Plasmodium vivax* TRAP as a subunit vaccine candidate in order to correct interpretation of Th1 versus Th2 immune response. **Experimental Parasitology**, v. 216, p. 107944, set. 2020.

NTUMNGIA, F. B. et al. A novel erythrocyte binding protein of *Plasmodium vivax* suggests an alternate invasion pathway into duffy-positive reticulocytes. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 1–5, 2016.

NTUMNGIA, F. B. et al. An engineered vaccine of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein enhances induction of broadly neutralizing antibodies. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13779, 23 dez. 2017.

NTUMNGIA, F. B. et al. Identification and immunological characterization of the ligand domain of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein 1a. **Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 7, p. 1110–1118, 2018.

NTUMNGIA, F. B.; ADAMS, J. H. Design and immunogenicity of a novel synthetic antigen based on the ligand domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 1, p. 30–36, 2012.

OBALDIA, N. et al. A *Plasmodium vivax* Plasmid DNA- and Adenovirus-Vectored Malaria Vaccine Encoding Blood-Stage Antigens AMA1 and MSP1 42 in a Prime/Boost Heterologous Immunization Regimen Partially Protects Aotus Monkeys against Blood-Stage Challenge. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 4, p. 1–16, abr. 2017.

OGUNBANWO, J. A. et al. Expression, Purification and Characterization of a Recombinant *Plasmodium Vivax* Thrombospondin Related Adhesive Protein (PvTRAP). **International journal of biomedical science : IJBS**, v. 2, n. 3, p. 251–9, 2006.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Immunogenicity of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-9 recombinant proteins expressed in *E. coli*. **Vaccine**, v. 22, n. 15–16, p. 2023–2030, 2004.

OLOTU, A.; FEGAN, G.; WAMBUA, J. Seven-Year Efficacy of RTS , S / AS01 Malaria Vaccine among Young African Europe PMC Funders Group Seven-Year Efficacy of RTS , S / AS01 Malaria Vaccine among Young African Children. **New England Journal of Medicine**, v. 374, p. 2519–2529, 2016.

OVCHYNNIKOVA, E. et al. DARC extracellular domain remodeling in maturing reticulocytes explains *Plasmodium vivax* tropism. **Blood**, v. 130, n. 12, p. 1441–1444, 2017.

OYONG, D. A. et al. Induction and Kinetics of Complement-Fixing Antibodies Against *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 3 $\alpha$  and Relationship With Immunoglobulin G Subclasses and Immunoglobulin M. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 220, n. 12, p. 1950–1961, 6 nov. 2019.

PATARROYO, M. A.; ARÉVALO-PINZÓN, G.; MORENO-PÉREZ, D. A. From a basic to a functional approach for developing a blood stage vaccine against *Plasmodium vivax*. **Expert Review of Vaccines**, v. 19, n. 2, p. 195–207, 1 fev. 2020.

PAYNE, R. O. et al. Human vaccination against *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein induces strain-transcending antibodies. **JCI Insight**, v. 2, n. 12, p. 1–17, 15 jun. 2017.

PERERA, K. L. R. L. et al. Baculovirus Merozoite Surface Protein 1 C-Terminal Recombinant Antigens Are Highly Protective in a Natural Primate Model for Human *Plasmodium vivax* Malaria. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1500–1506, abr. 1998.

PEREZ-LEAL, O. et al. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 8 cloning, expression, and characterisation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, n. 4, p. 1393–1399, 2004.

PEREZ-LEAL, O. et al. Identifying and characterising the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 10 *Plasmodium vivax* homologue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, n. 4, p. 1178–1184, 2005.

PHILLIPS, M. A. et al. Malaria. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17050, 21 dez. 2017.

PIZARRO, J. C. et al. Crystal Structure of the Malaria Vaccine Candidate Apical Membrane Antigen 1. **Science**, v. 308, n. 5720, p. 408–411, 15 abr. 2005.

PRICE, R. N. et al. Vivax malaria: Neglected and not benign. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 79–87, 2007.

PRICE, R. N. et al. *Plasmodium vivax* in the Era of the Shrinking *P. falciparum* Map. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 6, p. 560–570, 2020.

QARI, S. H. et al. Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. **The Lancet**, v. 341, n. 8848, p. 780–783, 1993.

RAHIMI, B. A. et al. Severe vivax malaria: A systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2014.

- RAWLINSON, T. A. et al. Structural basis for inhibition of *Plasmodium vivax* invasion by a broadly neutralizing vaccine-induced human antibody. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1497–1507, 2019.
- REYES-SANDOVAL, A. et al. Prime-boost immunization with adenoviral and modified vaccinia virus Ankara vectors enhances the durability and polyfunctionality of protective malaria CD8+ T-cell responses. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 145–153, 2010.
- REYES-SANDOVAL, A. *Plasmodium vivax* pre-erythrocytic vaccines. **Parasitology International**, v. 84, p. 102411, out. 2021.
- RICAURTE-CONTRERAS, L. A. et al. Two 20-residue-long peptides derived from *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 10 egf-like domains are involved in binding to human reticulocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1–15, 2021.
- ROCHA, M. V. et al. Generation, characterization and immunogenicity of a novel chimeric recombinant protein based on *Plasmodium vivax* AMA-1 and MSP119. **Vaccine**, v. 35, n. 18, p. 2463–2472, 2017.
- RODRIGUES-DA-SILVA, R. N. et al. In silico identification and validation of  $\alpha$  linear and naturally immunogenic B-cell epitope of the *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidate merozoite surface protein-9. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2016.
- RODRIGUES-DA-SILVA, R. N. et al. Immunogenicity of synthetic peptide constructs based on PvMSP9E795-A808, a linear B-cell epitope of the *P. vivax* Merozoite Surface Protein-9. **Vaccine**, v. 37, n. 2, p. 306–313, 2019.
- ROESCH, C. et al. Genetic diversity in two *Plasmodium vivax* protein ligands for reticulocyte invasion. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1–17, 2018.
- ROSA, D. et al. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. **Immunology Letters**, v. 92, n. 3, p. 259–268, 15 abr. 2004.
- ROSA, D. S. et al. Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP119 and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). **Microbes and Infection**, v. 8, n. 8, p. 2130–2137, 2006.
- ROSENBERG, R. et al. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Science**, v. 245, n. 4921, p. 973–976, 1989.
- RTS, S. Clinical Trials Partnership. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: Final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. **The Lancet**, v. 386, n. 9988, p. 31–45, 2015.

SALAVATIFAR, M. et al. High-level expression, purification and characterization of a recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: Implication for vivax malaria vaccine development. **Cell Journal**, v. 17, n. 3, p. 520–531, 2015.

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

SAMPATH, S. et al. Glycan Masking of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein for Probing Protein Binding Function and Vaccine Development. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, 2013.

SHABANI, S. H. et al. Biological, immunological and functional properties of two novel multi-variant chimeric recombinant proteins of CSP antigens for vaccine development against *Plasmodium vivax* infection. **Molecular Immunology**, v. 90, n. March, p. 158–171, 2017.

SHABANI, S. H. et al. Immunological evaluation of two novel engineered *Plasmodium vivax* circumsporozoite proteins formulated with different human-compatible vaccine adjuvants in C57BL/6 mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 208, n. 6, p. 731–745, 25 dez. 2019.

SHEIKH, I. H. et al. Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine encoding 42 kDa fragment of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1. **Acta Tropica**, v. 162, p. 66–74, out. 2016.

SHEN, F. et al. A Chimeric *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein Antibody Recognizes and Blocks Erythrocytic *P. cynomolgi* Berok Merozoites In Vitro. **Infection and Immunity**, v. 89, n. 2, 19 jan. 2021.

SIERRA, A. Y. et al. Splenectomised and spleen intact Aotus monkeys' immune response to *Plasmodium vivax* MSP-1 protein fragments and their high activity binding peptides. **Vaccine**, v. 21, n. 27–30, p. 4133–4144, 2003.

SINGH, K. et al. Malaria vaccine candidate based on Duffy-binding protein elicits strain transcending functional antibodies in a Phase I trial. **npj Vaccines**, v. 3, n. 1, 2018.

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

SNOW, R. et al. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **NATURE**, v. 434, p. 214–217, 2005.

SOARES, I. S. et al. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 5, p. 1606–1614, 1997.

SOARES, R. R. et al. Apical membrane protein 1-specific antibody profile and temporal changes in peripheral blood B-cell populations in *Plasmodium vivax* malaria. **Parasite Immunology**, v. 41, n. 9, p. 1–9, 2019.

SOARES, R. R. et al. Main B-cell epitopes of PvAMA-1 and PvMSP-9 are targeted by naturally acquired antibodies and epitope-specific memory cells in acute and convalescent phases of vivax malaria. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 5, p. 1–13, 2020.

SOMEABOZORG, M. A. et al. Administration of naloxone in combination with recombinant *Plasmodium vivax* AMA-1 in BALB/c mice induces mixed Th1/Th2 immune responses. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 10, p. 521–532, 2015.

SONGSAIGATH, S. et al. Immunoglobulin G responses to variant forms of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 9 upon natural infection in Thailand. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021.

SRINIVASAN, P. et al. Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 32, p. 13275–13280, 9 ago. 2011.

STANISIC, D. I. et al. Naturally Acquired Immune Responses to *P. vivax* Merozoite Surface Protein 3 $\alpha$  and Merozoite Surface Protein 9 Are Associated with Reduced Risk of *P. vivax* Malaria in Young Papua New Guinean Children. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, p. e2498, 14 nov. 2013.

SU, X.; ZHANG, C.; JOY, D. A. Host-Malaria Parasite Interactions and Impacts on Mutual Evolution. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 1–20, 27 out. 2020.

TAKALA, S. L. et al. Extreme Polymorphism in a Vaccine Antigen and Risk of Clinical Malaria: Implications for Vaccine Development. **Science Translational Medicine**, v. 1, n. 2, p. 2ra5-2ra5, 14 out. 2009.

TOTINO, P. R.; LOPES, S. C. Insights into the Cytoadherence Phenomenon of *Plasmodium vivax*: The Putative Role of Phosphatidylserine. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–6, 20 set. 2017.

TRIGLIA, T. et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 706–718, 2000.

URUSOVA, D. et al. Structural basis for neutralization of *Plasmodium vivax* by naturally acquired human antibodies that target DBP. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1486–1496, 2019.

VALDERRAMA-AGUIRRE, A. et al. Antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of *Plasmodium vivax* MSP1 Pv200L: a potential malaria vaccine subunit. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 5, p. 16–24, 2005.

- VANLOUBBEECK, Y. et al. Comparison of the immune responses induced by soluble and particulate *Plasmodium vivax* circumsporozoite vaccine candidates formulated in AS01 in rhesus macaques. **Vaccine**, v. 31, n. 52, p. 6216–6224, 2013.
- VARGAS-SERRATO, E. et al. Merozoite surface protein-9 of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites is orthologous to p101/ABRA of *P. falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 41–52, 2002.
- VICENTIN, E. C. et al. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 expressed in *Pichia pastoris* yeast. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1296–1307, 2014.
- WEBSTER, D. P. et al. Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 13, p. 4836–4841, 2005.
- WERTHEIMER, S. P.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: Identification of a parasite receptor-like protein. **Experimental Parasitology**, v. 69, n. 3, p. 340–350, 1989.
- WHITE, M.; AMINO, R.; MUELLER, I. Theoretical Implications of a Pre-Erythrocytic *Plasmodium vivax* Vaccine for Preventing Relapses. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 4, p. 260–263, abr. 2017.
- WHO. **World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges**. Geneva. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1321872/retrieve>>.
- YADAVA, A. et al. A novel chimeric *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein induces biologically functional antibodies that recognize both VK210 and VK247 sporozoites. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 3, p. 1177–1185, 2007.
- YADAVA, A. et al. Protective Efficacy of a *Plasmodium vivax* Circumsporozoite Protein-Based Vaccine in *Aotus nancymaae* Is Associated with Antibodies to the Repeat Region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3268, 16 out. 2014.
- YADAVA, A.; WATERS, N. C. Rationale for Further Development of a Vaccine Based on the Circumsporozoite Protein of *Plasmodium vivax*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. 10–14, 2017.
- YAZDANI, S. S. et al. Evaluation of immune responses elicited in mice against a recombinant malaria vaccine based on *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Vaccine**, v. 22, n. 27–28, p. 3727–3737, set. 2004.
- ZAKERI, S. et al. Population genetic structure and polymorphism analysis of gene encoding apical membrane antigen-1 (AMA-1) of Iranian *Plasmodium vivax* wild isolates. **Acta Tropica**, v. 126, n. 3, p. 269–279, jun. 2013.

ZEESHAN, M. et al. Host-Parasite Interaction: Selective Pv-fam-a Family Proteins of *Plasmodium vivax* Bind to a Restricted Number of Human Erythrocyte Receptors. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 7, p. 1111–1120, 1 abr. 2015.

ZEESHAN, M.; BORA, H.; SHARMA, Y. D. Presence of memory T cells and naturally acquired antibodies in *Plasmodium vivax* malaria-exposed individuals against a group of tryptophan-rich antigens with conserved sequences. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 1, p. 175–185, 2013.

ZHENG, J. et al. Prospects for Malaria Vaccines: Pre-Erythrocytic Stages, Blood Stages, and Transmission-Blocking Stages. **BioMed Research International**, p. 1–9, 3 out. 2019.

ZIMMERMAN, P. A. *Plasmodium vivax* infection in duffy-negative people in Africa. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 636–638, 2017.