

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

**KÉSSIA CAROLINE SOUZA ALVES**

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROBIÓTICO RECOMBINANTE**  
**CONTENDO A PROTEÍNA “3” DE SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTO DE**  
***Plasmodium falciparum* E AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA EM MURINOS**

**Manaus - AM**  
**2022**

KÉSSIA CAROLINE SOUZA ALVES

DESENVOLVIMENTO DE UM PROBIÓTICO RECOMBINANTE  
CONTENDO PROTEÍNA “3” DE SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTO DE  
*Plasmodium falciparum* E AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA EM MURINOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Luis André Morais Mariúba

**Manaus-AM**

**2022**

## Ficha Catalográfica

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

A474d Alves, Késsia Caroline Souza  
Desenvolvimento de um probiótico recombinante contendo a Proteína "3" de superfície de merozoíto de Plasmodium falciparum e avaliação imunológica em murinos / Késsia Caroline Souza Alves . 2022  
105 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Luís André Morais Mariúba  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Malária. 2. Plasmodium falciparum. 3. msp3. 4. Bacillus subtilis. 5. esporos. I. Mariúba, Luís André Morais. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Aos meus pais Ivan e Suelly e minha irmã  
Ingridy, minha fortaleza e motivação diária*

...

*Ao André Lucas, meu companheiro, pela  
paciência, compreensão, preocupação e carinho  
em todos os momentos*

...

*Ao Dr. Luís André Mariúba, meu orientador,  
pela paciência, ensinamentos e persistência  
desde a Iniciação científica*

...

***Dedico***

## **Agradecimentos**

À Deus, o qual é minha Fortaleza, por sua bondade e misericórdia em minha vida, toda honra e toda glória dedico à Ele.

Aos meus pais Ivan Cesário e Suely Souza, e minha irmã Ingridy Karine Souza Alves por estarem sempre ao meu lado me apoiando desde sempre, tudo que sou é graças a vocês, e tudo o que faço é por vocês, minha eterna gratidão às pessoas mais importantes da minha vida. Amo vocês.

Ao meu esposo André Lucas, por toda paciência, compreensão e companheirismo. Agradeço por me amparar de todas as formas e por não medir esforços para que eu alcançasse meu objetivo.

Ao meu orientador Dr. André Mariúba, pela orientação, incentivo nos momentos difíceis e dedicação desde a iniciação científica. Agradeço a paciência e preocupação que sempre teve com todos os seus alunos. Sem o senhor eu não conseguiria. Serei eternamente grata por tudo.

À Maria Edilene Martins por ser além de uma colega de trabalho um ombro amigo acolhedor. Obrigada por toda ajuda dentro e fora do laboratório, minha gratidão à você não pode ser expressa em palavras.

À Adriana Moreno e Thaís Moreno por me acolherem sempre nos momentos de insegurança e incertezas. Obrigado por se tornarem minha família e sempre me incentivarem. Amo vocês.

À minha amiga Jeniffer Clorives, pela amizade e parceria desde a graduação. Por todas as conversas e vivências compartilhadas.

À Juliane Corrêa Glória pela amizade, desde a graduação. Por toda a ajuda e parceria nos momentos difíceis, pelas gargalhadas e longas conversas de laboratório.

Aos colegas de Laboratório, Yury, Walter, Jéssica, Caio e Adélia, por compartilharem trabalhos, alegrias e aflições. Obrigada por tornarem os dias de trabalho mais leves e divertidos.

Ao professor Dr. Gemilson Pontes por toda ajuda e consultoria na realização deste

projeto.

À Taiana, minha psicóloga por aceitar enfrentar o desafio de me manter sã no final deste percurso. Muito obrigada por me manter no eixo e me ajudar a enfrentar os obstáculos de forma mais leve e saudável.

À Universidade Federal do Amazonas pela graduação.

Ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação Biotecnologia e a todos os seus integrantes pela oportunidade de concretização deste trabalho.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/FIOCRUZ-AM por propiciar a realização deste projeto de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho.

*Tomai sobre vós o meu jugo e aprendei de mim, porque sou manso e humilde de coração, e vós encontrareis descanso. Pois o meu jugo é suave e o meu fardo é leve. (Mateus 11:28-30)*

## RESUMO

A malária é um problema de saúde pública amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais no mundo. No Brasil, a doença ainda apresenta elevados números de casos, no qual o *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) é responsável pela forma mais grave da doença. Uma das alternativas para controle da infecção seria o desenvolvimento de uma vacina. Atualmente, ainda não existe vacina para malária com 100% de proteção. Uma etapa importante no desenvolvimento de uma vacina, além na identificação do antígeno é avaliar como o antígeno será apresentado, bem como o efeito imunestimulatório dos componentes da formulação (imunostimulantes). Um dos métodos de imunostimulação e apresentação que tem recebido atenção é baseado no uso de esporos de *Bacillus subtilis*. Além disso, tem-se observado que estes podem atuar como partículas vacinais adjuvantes, promovendo a elevação da resposta humoral após a co-administração com antígenos tanto acoplados ou integrados à superfície desses esporos. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram produzir anticorpos contra proteína 3 de superfície de merozoíto (MSP3) de *Plasmodium falciparum* utilizando esporos de *B. subtilis* recombinados, além de padronizar uma metodologia de quantificação dos esporos por citometria de fluxo. Foi realizada a padronização de uma metodologia de quantificação de esporos na qual foi utilizado *Beads Trucount* junto a uma dupla marcação dos esporos com brometo de etídio e anticorpo fluorescente, os esporos foram submetidos a leitura em citometria de fluxo. Aplicando a metodologia foi obtida uma maior acurácia na quantificação dos esporos, além de uma análise mais confiável de acoplamento do anticorpo fluorescente na superfície dos esporos. A construção da cepa de *B. subtilis* recombinante foi realizada por meio de endereçamento devido a fusão com a proteína revestimento CotC. A expressão da proteína de forma íntegra na superfície do esporo foi realizada por *immunoblot*. Camundongos Balb/C foram imunizados com os esporos recombinantes por via nasal e oral e os soros coletados foram analisados por ELISA indireto. Como resultado, foi observado que tanto camundongos imunizados por via oral quanto nasal apresentaram estimulação de IgG anti-PfMSP3, se apresentando mais elevada na via oral. Além disso, os esporos foram capazes de manter títulos de IgG circulantes por 250 dias, desencadeando um perfil de resposta imune predominante Th1. Com os resultados promissores apresentados neste trabalho, os esporos de *B. subtilis* podem ser uma ótima ferramenta a ser aplicada em futuras vacinas para malária.

**Palavras-chave:** Malária; *Plasmodium falciparum*; MSP3; *Bacillus subtilis*; esporos.



## ABSTRACT

Malaria is a public health problem widely distributed in tropical and subtropical regions of the world. In Brazil, the disease still has high numbers of cases, which *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) is responsible for the most severe form of the disease. One of the alternatives for controlling the infection would be the development of a vaccine. Currently, there is still no vaccine for malaria with 100% protection. An important step in the development of a vaccine, in addition to the identification of the antigen, is to evaluate how the antigen will be presented, as well as the immunostimulatory effect of the formulation components (immunostimulants). One of the immunostimulation and presentation methods that has received attention is based on the use of *Bacillus subtilis* spores . Furthermore, it has been observed that they can act as adjuvant vaccine particles, promoting the elevation of the humoral response after co-administration with antigens either coupled or integrated to the surface of these spores. Thus, the objectives of this work were to produce antibodies against merozoite surface protein 3 (MSP3) of *Plasmodium falciparum* using spores of *B. subtilis* recombined, in addition to standardizing a methodology for quantification of spores by flow cytometry . A spore quantification methodology was standardized in which Trucount Beads were used together with a double labeling of the spores with ethidium bromide and fluorescent antibody, the spores were submitted to flow cytometry reading. Applying the methodology, a greater accuracy in the quantification of spores was obtained, in addition to a more reliable analysis of the coupling of the fluorescent antibody on the surface of the spores. The construction of the recombinant *B. subtilis* strain was performed by targeting due to fusion with the CotC coat protein. Protein expression on the spore surface was performed by immunoblot. Balb/C mice were immunized with the recombinant spores by nasal and oral route and the collected sera were analyzed by indirect ELISA. As a result, it was observed that both orally and nasal immunized mice showed stimulation of anti-*Pf*MSP3 IgG, which was higher in the oral route. In addition, the spores were able to maintain circulating IgG titers for 250 days, triggering a predominantly Th1 immune response profile. With the promising results presented in this work, *B. subtilis* spores can be a great tool to be applied in future malaria vaccines.

**Keywords:** Malaria; *Plasmodium falciparum*; MSP3; *Bacillus subtilis*; spores.

## Lista de Figuras

Figura 1.1. Distribuição das áreas de risco para transmissão de malária no Brasil em 2020 de acordo com IPA .....	15
Figura 2.1. Ciclo biológico do <i>Plasmodium sp.</i> no hospedeiro humano.....	18
Figura 3.1. Esquema da estrutura completa da MSP3 e sequência da vacina GMZ2.....	22
Figura 4.1. Diagrama mostrando o progresso da esporulação de <i>Bacillus subtilis</i> e exibição dos esporos em sete estágios.....	25

## Lista de Siglas e Abreviaturas

ADCI	Inibição celular dependente de anticorpos
AS	Esporos autoclavados
BSA	Albumina do soro Bovino
<i>BsPf</i> MSP3	<i>Bacillus subtilis</i> recombinado com proteína MSP3 de <i>Plasmodium falciparum</i>
DO	Densidade óptica
DNA	Ácido desoxirribunocléico
DSM	Meio de esporulação da Difco
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride
ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima
EtBr	Brometo de Etídio
FA	Anticorpo Fluorescente
FDA	<i>Food and drug administration</i>
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GLURP	Proteína rica em Glutamato
GRAS	<i>Generally regarded as safe</i>
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G 1
IgG2a	Imunoglobulina 2a
IgG2b	Imunoglobulina 2b
IgG 3	Imunoglobulina G 3
kDA	Kilodanton
IPA	Incidência Parasitária Anual
LB	Luria Bertani
LSP	Longo peptídeo sintético

MFI	Média de intensidade de fluorescência
MSP1	Proteína 1 de Superfície de Merozoíto
MSP3	Proteína 3 de Superfície de Merozoíto
MSP6	Proteína 6 de Superfície de Merozoíto
MSP7	Proteína 7 de Superfície de Merozoíto
NAS	Esporos não autoclavados
NHS	N-hydroxysuccinimide
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/ World Health Organization
PBS	Tampão fosfato salino
PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida
<i>Pf</i> MSP3	MSP3 de <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIVEP	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica
SVS	Sistema de Vigilância em Saúde
TTFC	Fragmento C da toxina do tétano
UreA	Urease A
UreB	Urease B

## Sumário

<b>I.REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
1.1 Epidemiologia da malária.....	14
1.2 <i>Plasmodium</i> sp. ....	15
1.2.1 <i>Plasmodium falciparum</i> .....	16
1.3 Ciclo do parasita no hospedeiro Humano .....	17
1.3.1 Infecção no fígado .....	17
1.3.2 Invasão aos eritrócitos .....	18
1.4 Sintomas, Diagnóstico e tratamento.....	19
1.5 Vacinas contra malária.....	20
2. Proteína de Superfície do Merozoíto 3 – MSP3 .....	<b>21</b>
3. Adjuvantes .....	<b>24</b>
4.0 <i>Bacillus subtilis</i> .....	25
4.1 Esporos de <i>Bacillus subtilis</i> e sua aplicabilidade na apresentação de antígenos.....	27
<b>II.OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>63</b>
<b>III. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>84</b>
<b>IV. CONCLUSÃO.....</b>	<b>90</b>
<b>V. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>
<b>VI. ANEXOS .....</b>	<b>103</b>

## *I. Referencial Teórico*

## 1.1 Epidemiologia da malária

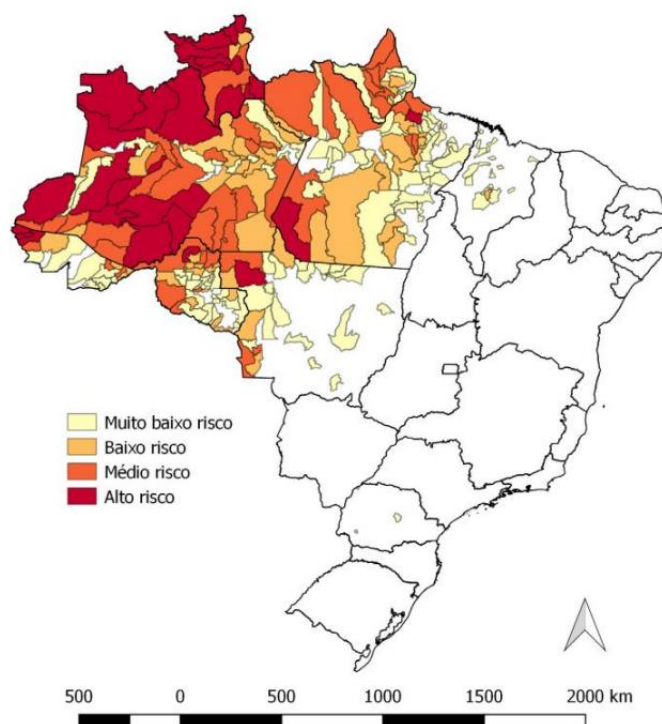
A malária é uma doença infecciosa causada por um protozoário parasita do gênero *Plasmodium*. A doença é caracterizada por episódios febris, sudorese, dores no corpo, calafrios dentre outros sintomas (CARTER; MENDIS, 2002; OMS, 2019).

A malária representa um sério problema de saúde pública, por apresentar altas taxas de incidência de morbidade e mortalidade nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (GREENWOOD *et al.*, 2009). Segundo dados da OMS em 2020 foram registrados mundialmente 241 milhões de casos sendo 627 mil mortes (WHO, 2021).

Apesar da aplicação de medidas de controle do vetor em áreas endêmicas, como uso de mosquiteiros, dedetização, e utilização de drogas antimaláricas, estas não foram suficientes para a erradicação da doença. Segundo a OMS, 87 países foram considerados endêmicos para malária, dentre estes países os que mais apresentam casos estão situados no continente africano (94%). Na América do Sul os casos se concentram na Venezuela, Brasil e Colômbia, somando 86% dos casos no continente.

No Brasil, a incidência de casos de Malária vem decaindo ao longo dos últimos 17 anos, entretanto os números de casos da doença ainda se apresentam altos. Em 2020 foram relatados 140.974 casos de malária no país, onde a maior taxa de transmissão se encontra na região amazônica (99% dos casos registrados no País). Do total de casos cerca de 84% foram ocasionados por *P. vivax*, e 15,8% por *P. falciparum* (BRASIL, 2021). Além dessas, há ocorrência de transmissão pelas espécies *Plasmodium malariae*, e mais recentemente *Plasmodium simium* na região da mata Atlântica (BRASIL, 2017).

Na figura 1.1 são observadas as áreas de risco para malária no Brasil, e sua transmissão no ano de 2020, calculado com base no número anual de casos por 1.000 habitantes (IPA-Índice Parasitário Anual). No mapa (Figura 1.1) as áreas podem ser classificadas como alto risco (IPA maior que 49,9 casos/1.000 hab, médio risco (entre 10 e 49,9 casos/1.000 hab, baixo (1 a 9,9 casos/1.000 hab e risco muito baixo (menor que 1 caso/1.000 hab) (BRASIL, 2021).



**Figura 1.1. Distribuição das áreas de risco para transmissão de malária no Brasil em 2020 de acordo com IPA.** Na legenda em branco, áreas sem transmissão; em laranja mais claro, áreas com baixo risco de transmissão, em laranja intermediário, áreas com médio risco de transmissão e em vermelho, áreas com alto risco de transmissão. Fonte: Sivep-Malária, BRASIL, (2020).

Restringindo a análise de risco apenas para a região Amazônica, a que apresenta maior transmissão da doença, em 2020 têm-se 29 municípios considerados de alto risco, 47 de médio risco, 54 de baixo risco e 128 de muito baixo risco (BRASIL, 2021). Quanto ao Estado do Amazonas, estima-se que entre os seis primeiros meses de 2021 houve 20.245 notificações para doença. Dos casos notificados no estado, 80% foram causados por *P. vivax* e 19,97% causados por *P. falciparum* (FVS-AM, 2021).

## 1.2 *Plasmodium* sp.

O parasita responsável por causar a malária é um protozoário do gênero *Plasmodium*. Este, por sua vez, é transmitido de um humano para outro por meio da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* ou por contato com sangue contaminado. Há 5 espécies de *Plasmodium* que mais causam infecções em humanos, são essas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* (restrito a determinadas regiões da África) e *P. knowlesi* (mais comumente registrado no continente asiático) (WHO, 2021). Mais recentemente há relatos de infecções



causadas pela espécie *P. simium*, a qual era conhecida até então por causar malária apenas em macacos (BRASIL, 2017). Além desta, também há relatos recentes de infecções assintomáticas causadas por *Plasmodium cynomolgi* (GRIGNARD et al., 2019; IMWONG et al., 2019).

### 1.2.1 *Plasmodium falciparum*

O *P. falciparum*, junto ao *P. vivax*, são os responsáveis pelo maior número de infecções por malária ao redor do mundo. Entretanto, o *P. falciparum* desperta uma grande preocupação dos órgãos de saúde, visto que este é capaz de causar a forma mais grave de malária em humanos (WHO, 2021).

Há alguns fatores que podem tornar a infecção por esta espécie mais agressiva, como o fato de apresentarem afinidade com hemácias em qualquer estágio de maturação, o que eleva os níveis de parasitemia, resultando em sintomas mais agudos (GILLES, 2002). Além disso, esta espécie de *Plasmodium* é capaz de modificar a superfície dos glóbulos vermelhos infectados realizando uma citoadesão das hemácias parasitadas ao endotélio ativado, podendo acarretar no sequestro do parasita removendo-o da circulação. Acredita-se que essa interação influencia na patologia da doença de duas formas simultâneas: ao causar uma obstrução mecânica dos vasos e um processo inflamatório. Outra forma de interação entre os eritrócitos infectados e as células hospedeiras, é a formação de rosetas, que é a interação com eritrócitos não infectados, causando um aglomerado de células que também podem ocasionar a obstrução da microcirculação. Desta forma, há uma lesão do tecido que pode evoluir para chamada malária cerebral (WASSMER et al., 2015; GRAU & CRAIG, 2012).

Há ainda relatos de resistência do *P. falciparum* a alguns medicamentos antimaláricos, como resistência à artemisina e mefloquine, na região de Greater Mekong e fronteira da Tailândia com Myanmar, respectivamente. (WITKOWSKI et al., 2010; PHYO et al., 2016). E mais recentemente à Di-hidroartemisinina/ Piperaquina em indivíduos do Camboja, Tailândia e Vietnã (VAN DER PLUIJM et al., 2019). O que se mostra extremamente alarmante, visto que as drogas citadas são as mais utilizadas no tratamento contra malária

Dessa forma, os casos de malária por *P. falciparum* são preocupantes, por este ser responsável pela ocorrência das formas mais graves da doença e dos óbitos decorrentes destas complicações, principalmente em crianças no continente africano (OMS, 2021).

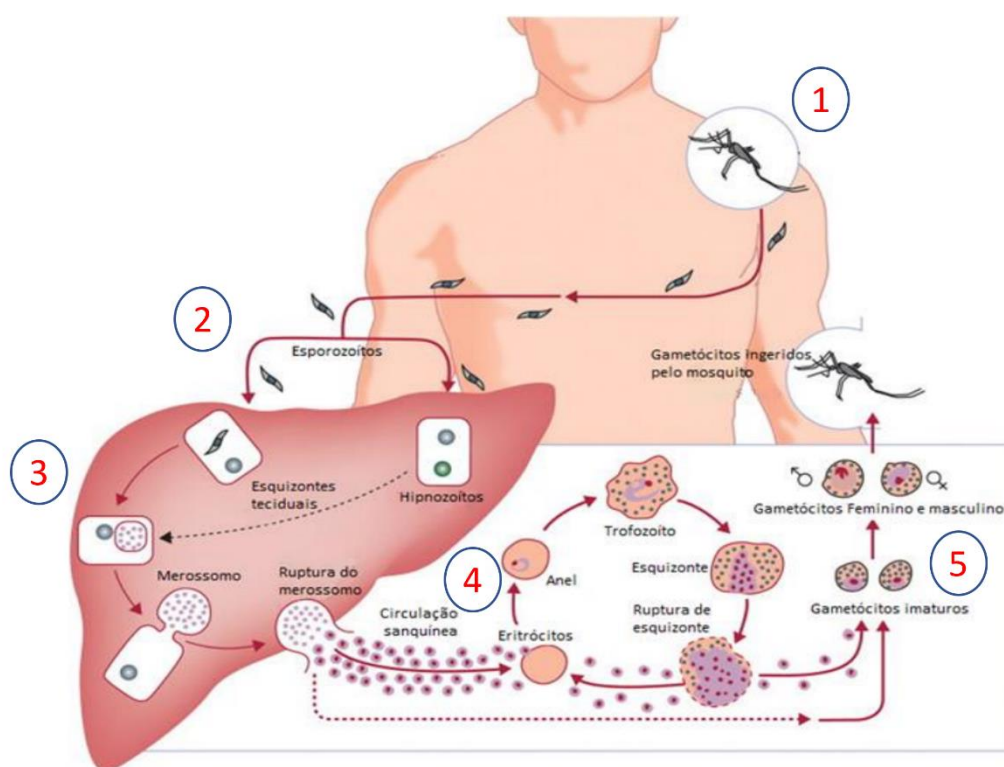
## 1.3 Ciclo do parasita no hospedeiro Humano

O ciclo do parasita *Plasmodium* sp. é complexo, pois alterna entre um ciclo no vetor (mosquitos *Anopheles*) e um ciclo no hospedeiro vertebrado, que apresenta diferentes formas zoítas para a invasão de diferentes células em estágios específicos (COWMAN et al., 2016). Quando presentes no hospedeiro vertebrado, tanto os esporozoítos de *P. falciparum* quanto *P. malariae* desencadeiam esquizogonia imediata, já os esporozoítos de *P. ovale* e *P. vivax*, podem iniciar a esquizogonia imediata ou acarretar numa esquizogonia tardia, onde podem se manter em dormência nas células do fígado sendo denominados de hipnozoítos (TUTEJA, 2007; BRASIL, 2010).

### 1.3.1 Infecção no fígado

O ciclo é dividido em vários estágios (Figura 2.1), e inicia com a inoculação dos esporozoítos na derme do hospedeiro, o que ocorre durante o repasto sanguíneo do mosquito. Após isso, acreditava-se que os esporozoítos moviam-se imediatamente do local da picada, entretanto sabe-se atualmente que estes ainda permanecem na derme por 1h até 3h. O parasita, por sua vez, conta com uma motilidade deslizante, que permite que uma quantidade de esporozoítos alcancem e adentrem no vaso sanguíneo sendo então levados até o fígado. Os parasitas que ainda permanecem na derme são destruídos e levados pelos vasos linfáticos ao linfonodo proximal, gerando uma resposta imune do hospedeiro (TAVARES et al., 2013; YAMAUCHI et al., 2007).

Os esporozoítos invadem rapidamente o fígado por meio de um processo denominado travessia, onde estes cruzam a barreira sinusoidal por meio de células Kupffer, semelhantes a macrófagos (TAVARES et al., 2013). Ao invadir os hepatócitos, os esporozoítos permanecem por 2 a 10 dias, onde formam um vacúolo parasitário que permite a reprodução assexuada, conhecida como esquizogonia exoeritrocítica, sem a identificação pelo sistema imune. A reprodução acarreta na liberação de até 40.000 merozoítos (por hepatócito), na corrente sanguínea por meio de merossomos, uma estrutura vesicular que possibilita o transporte dos merozoítos na corrente sanguínea, além de protegê-los de serem fagocitados pelas células Kupffer (STURM et al., 2006; COWMAN et al., 2012).



**Figura 2.1. Ciclo biológico do *Plasmodium* sp. no hospedeiro humano.** (1) Estágio exoeritrocítico, em que o mosquito anófile infectado inocula o parasita na forma de esporozoítos na derme do hospedeiro vertebrado; (2) alguns esporozoítos permanecem na derme enquanto outros invadem os hepatócitos; (3) esquizogonia e liberação dos merozoítos; (4) início da fase eritrocítica, na qual os merozoítos são liberados na corrente sanguínea e invadirão os eritrócitos, fase onde também ocorre a diferenciação dos gametócitos; (5) gametócitos, presentes na corrente sanguínea do hospedeiro humano. Adaptado de Mueller et al., 2009.

### 1.3.2 Invasão aos eritrócitos

Após a liberação na corrente sanguínea (figura 2.1) cada merozoíto livre pode infectar um eritrócito, este processo por mais que seja complexo é rápido, dinâmico e realizado em várias etapas. O processo inicia com a pré-invasão, uma ligação reversível, esta etapa envolve uma interação robusta entre o merozoíto e o eritrócito que leva a deformação da célula hospedeira por consequência de um impulso de actinmiosina que permite a entrada do parasita para o interior do vacúolo formado na hemácia (WEISS et al., 2015).

A ligação irreversível dos merozoítos aos eritrócitos se faz devido à junção entre proteínas derivadas do parasita e da superfície do eritrócito. Em seguida, ocorre o processo de invaginação da membrana eritrocítica em torno do merozoíto e a liberação da membrana de superfície no meio extracelular, o parasita neste momento consegue invadir totalmente a célula e então se apresenta na forma de trofozoíto (Figura 2.1) (BESTEIRO et al., 2011; STURM et

al., 2006). Os trofozoítos, por sua vez, sofrem processo de multiplicação assexuada, e passam por diferentes estágios, sendo estes: fase de anel; trofozoíto jovem; trofozoíto maduro; e esquizonte. Ao final desse processo há a ruptura das hemácias e a liberação de milhares de merozoítos na corrente sanguínea. Este ciclo se repete inúmeras vezes (a cada 48h para *P. vivax* e *P. falciparum*; a cada 72h nas infecções por *P. malariae*) e é neste momento que se manifestam grande parte dos sintomas clínicos da doença (STURM et al., 2006; TUTEJA, 2007).

Alguns trofozoítos se diferenciam eventualmente em formas sexuadas, denominadas gametócitos, sendo masculino (microgametócito) ou feminino (macrogametócito). Estes, por sua vez, ao serem ingeridos pelo mosquito fêmea, do gênero *Anopheles*, durante seu repasto sanguíneo, darão continuidade ao ciclo sexuado do parasita no vetor (MUELLER et al., 2009).

#### 1.4 Sintomas, Diagnóstico e tratamento

O período para o surgimento dos sintomas da malária difere de acordo com a espécie infectante, levando de 8 a 12 dias para *P. falciparum*; 13 a 17 dias para *P. vivax*; e 18 a 30 dias para *P. malariae*. Os sintomas apresentados na crise aguda da malária, são basicamente febre (que pode chegar a 40°C), calafrios e sudorese, podem durar de 6 a 12 horas, porém nem sempre apresentam o padrão conhecido da malária, que é a febre terçã (a cada 2 dias). Juntamente aos sintomas já citados, o indivíduo infectado geralmente apresenta cefaleia, mialgia, náuseas e vômito (BRASIL, 2021).

O quadro clínico provocado pela malária está diretamente relacionado à espécie e quantidade de parasitas circulantes (parasitemia), além do tempo de infecção e imunidade do indivíduo. Crianças de até 5 anos, gestantes, primoinfectados e idosos, tendem a ser mais vulneráveis a apresentarem os sintomas mais graves da doença. Sabe-se que o *P. falciparum* é responsável pelo maior número de casos de agravamento da malária, podendo desencadear sintomas como: anemia grave; acidose metabólica; malária cerebral; convulsão; dentre outros agravamentos; porém relatos têm indicado alguns agravamentos causados por *P. vivax*, como: icterícia; dores abdominais agudas (ruptura do baço); anemia grave; etc (MILLER, et al., 2002; HEALTH, 2014).

O fato de os sintomas apresentados pelo paciente serem semelhantes a outras doenças febris agudas, faz com que o diagnóstico seja mais difícil, tornando necessária a confirmação por exames laboratoriais.

Os métodos de diagnóstico preconizados pela OMS atualmente são os baseados em: microscopia, que consiste na técnica de gota espessa de sangue, extraída por punção no dedo e corado pelo método walker; Teste Diagnóstico rápido (TDR), baseados na detecção de antígenos do parasita e visualizados por métodos de imunocromatografia, estão disponíveis em forma de kits e disponibilizam resultado entre 15 e 20 minutos; e os diagnósticos por técnicas moleculares, que apesar de serem mais dispendiosos e não rotineiros, são extremamente precisos e muito utilizados em laboratórios de referência (WHO, 2021).

Confirmado o diagnóstico, o tratamento disponível atualmente é baseado em drogas antimaláricas que visam principalmente eliminar o parasita nos diferentes ciclos, interrompendo o processo de esquizogonia no sangue; destruindo as formas latentes do parasita no ciclo tecidual; e interrompendo a transmissão do *Plasmodium* por meio de drogas que eliminam as suas formas sexuadas (BRASIL, 2021).

Sendo assim, o diagnóstico correto e precoce, juntamente com a aplicação do tratamento correto é extremamente importante para evitar o agravamento da doença e conseqüentemente a letalidade da mesma, visto que ainda não há uma vacina de fato eficaz contra a doença.

### **1.5 Vacinas contra malária**

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra malária tem se mostrado um grande desafio desde os primeiros estudos, há mais de 50 anos, quando demonstraram ser viável a criação de uma (MATA et al., 2013). Tal dificuldade está relacionada a algumas características do parasita, o tamanho do genoma e a expressão de proteínas diferentes em seus diversos estágios (principalmente em sua forma de merozoíto), são alguns dos desafios a serem superados. Além disso, há a extensa diversidade genética apresentada pelo parasita induzido pelo próprio sistema imunológico e pelas drogas antimaláricas utilizadas, que ocasionam em uma seleção do patógeno (GARDNER et al., 2002; TAKALA et al., 2009).

Diante da ampla gama de antígenos e seus diferentes estágios dentro do ciclo, há o desafio de escolha de um antígeno vacinal ou mais de um, visto que há uma grande possibilidade de que uma vacina baseada em um único antígeno fornecerá proteção cruzada (THERA & PLOWE, 2012). Considerando ainda que a imunização com vacina de um estágio específico só irá proteger contra aquele estágio do ciclo, há a grande dificuldade no desenvolvimento de um imunizante que seja de fato eficaz em todo âmbito da doença (ALONSO et al., 2004).

Atualmente há uma vacina recomendada pela Organização Mundial de Saúde, a RTS'S/AS01, esta foi recentemente recomendada para o uso em crianças da África Subsaariana e outras regiões com transmissão de moderada a alta de malária por *P. falciparum* (OMS, 2021). É uma vacina baseada no antígeno CSP (Proteína do Circunsporozoíto), uma proteína do estágio pré-eritrocítico. Sendo assim, a vacina visa impedir os esporozoítos de invadirem os hepatócitos humanos. É uma vacina considerada segura, entretanto apresenta apenas 40% de eficácia contra a diminuição de infecções e reduziu em 30% nos casos de malária grave (OLOTU et al., 2011; WHITE et al., 2013).

Desta forma, ainda há pesquisas em desenvolvimento visando novas abordagens vacinais utilizando diferentes antígenos, como: AMA1 (Antígeno de Membrana Apical), em complexo com RON2L, em alguns estudos; a Proteína Homóloga de ligação de reticulócitos de *Plasmodium falciparum* 5 (PfRH5); e as MSP (Proteínas de Superfície de Merozoíto). Tais estudos buscam uma maior efetividade para uma vacina contra malária (SRINIVASAN et al., 2017; DREW & BEESON, 2015; GIRARD et al., 2007).

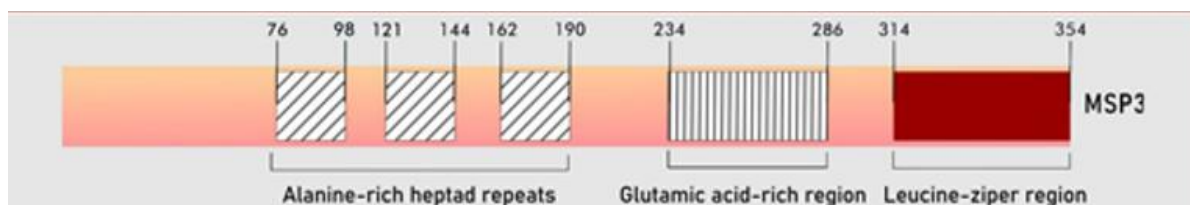
## **2. Proteína de superfície de Merozoíto 3 – MSP3**

A MSP3 (Proteína de Superfície do Merozoíto 3) de *P. falciparum* é uma proteína presente na superfície do merozoíto, conseqüentemente é um antígeno do estágio eritrocítico do parasita. É uma proteína solúvel e possui peso molecular aproximado de 48 kDa. Apresenta-se na superfície do merozoíto na forma de complexo com outras proteínas de superfície (MSP1, MSP6 e MSP7), este complexo está ligado à superfície do parasita por meio de uma âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) (OEUVRAY et al., 1994; IMAM et al., 2013).

Quanto a sua estrutura, a MSP3 possui a presença de uma sequência sinal N-terminal; um domínio composto por três blocos, com quatro repetições de sete alaninas *in tandem*, cada; um domínio rico em ácido glutâmico; e um zíper de leucina na região C-terminal (HUBER et al., 1997).

A MSP3 foi primeiramente descrita em 1994 em um estudo com objetivo de avaliar a capacidade protetora do antígeno (OEUVRAY et al., 1994). Desde então tem sido alvo de pesquisas e se tornou um potencial antígeno para vacina, inclusive já em fase II de teste clínico. Os estudos têm demonstrado resultados promissores quanto a utilização da MSP3 para vacina, como sua capacidade de desencadear resposta de anticorpos citofílicos, principalmente das subclasses IgG1 e IgG3, que demonstraram ação protetora contra o *P. falciparum* (SINGH et

al., 2004). Além disso, sabe-se que a região C-terminal da proteína em questão é altamente conservada o que reforça seu potencial vacinal (IMAM et al., 2013; HUBER et al., 1997)



**Figura 3.1. Esquema da estrutura da MSP3** A sequência MSP3 presente possui regiões de repetições heptadas de alanina (faixas diagonais); uma região rica em ácido glutâmico (listras verticais); e um motivo de zíper de leucina (vermelho).

Há duas principais vacinas utilizando o antígeno MSP3 em estudo atualmente, a MSP3-LSP, uma junção entre MSP3 e um Longo peptídeo sintético de *P. falciparum*; e a GMZ2, que é uma vacina baseada na MSP3 formando um complexo com a Proteína rica em Glutamato (GLURP) outro antígeno de *P. falciparum*. Essa última, é a que se encontra em fase mais avançada, com estudos clínicos de Fase II já desenvolvidos. Tanto a MSP3-LSP quanto a GMZ2 se mostraram seguras e imunogênicas em humanos (DRUILHE et al., 2005; DASSAH et al., 2021).

A MSP3-LSP apesar de apresentar resultados promissores demonstrando ser capaz de gerar uma resposta duradoura; indução de resposta de anticorpos citofílicos; ser bem tolerada; além de ser imunogênica e produzir uma resposta de IFN- $\gamma$  estável após a vacinação; apresenta alguns desafios como a escolha de um adjuvante ideal, que promova um aumento desta resposta, visto que apenas dois foram testados (Montanide IS720 e Hidróxido de alumínio), entretanto nenhum se mostrou ideal e nem capaz de exacerbar a resposta de forma suficiente. Desta forma as pesquisas se limitaram apenas até os estudos clínicos de fase I (SINGH et al., 2004; DRUILHE et al., 2005; LUSINGU et al., 2009; SIRIMA et al., 2010).

Já a vacina GMZ2, como anteriormente citado, é a função recombinante de duas proteínas de *P. falciparum* de estágio sanguíneo. Há inúmeros estudos de fase clínica que analisaram a capacidade imunogênica da vacina, além de sua capacidade de proteção contra doença. As pesquisas observaram que após a imunização dos indivíduos, houve um aumento considerável de anticorpos específicos contra o antígeno. Um estudo analisou ainda a natureza desses anticorpos, observando que o aumento foi significativo para as subclasses de IgG1e IgG3, sendo a presença desses isotipos de anticorpos associada a indivíduos protegidos contra

infecções por malária (OEUVRAY et al., 1994; MORDMÜLLER et al., 2010). Além do mais, em alguns estudos, os indivíduos imunizados foram acompanhados por até um ano após a vacinação, e ainda foi possível detectar altos títulos de anticorpos específicos, indicando uma duração da resposta contra a vacina (ESEN et al., 2009; BÉLARD et al., 2011).

Além de desencadear a produção de anticorpos específicos, a GMZ2 foi capaz de desencadear um aumento de células B de memória, o que está sendo associada possivelmente à resposta prolongada contra vacina. Entretanto, apesar da resposta imune substancial contra GMZ2, uma pesquisa concluiu que não foi possível observar uma resposta suficientemente protetiva, sendo necessário avaliar novas formulações para vacina ou uso de novos adjuvantes (DASSAH et al., 2021).

### 3. Adjuvantes

As vacinas são responsáveis por salvar centenas de milhares de pessoas ao redor do mundo, evitando grandes devastações causadas por doenças. Uma vacina basicamente tem o papel de mimetizar a doença, despertando uma resposta imunológica do corpo (PASHINE et al., 2005). Na maioria das vacinas a composição é baseada em patógenos inteiros atenuados ou inativados. Contudo, em alguns casos as vacinas podem apresentar reações adversas acentuadas e até a reversão da virulência do patógeno presente, além da dificuldade de cultivar o patógeno em grande quantidade para a fabricação dessas vacinas (SHAH et al., 2016).

Sendo assim, muitas vacinas têm utilizado apenas antígenos do patógeno, sendo considerado mais seguro e mais fácil de produzir em larga escala. Porém, em muitos casos esses antígenos não estimulam uma resposta imunológica de forma satisfatória e suficiente, sendo necessária a adição de outros componente à formulação vacinal que seja capaz de aumentar esta estimulação, além de uma melhor resposta protetora. Tais componentes são denominados de adjuvantes, a palavra deriva do latim *adjuvare*, que significa, “para ajudar” (COFFMAN et al., 2010; BASTOLA et al., 2017).

Os adjuvantes são adicionados à composição de uma vacina a fim de aumentar ou modular uma resposta específica. Além disso, podem prolongar a disponibilidade de um antígeno, permitindo que este conserve a dose vacinal além de poder reduzir o número de doses necessárias para gerar ou manter a resposta imune protetora. São capazes ainda de minimizar a dose de antígeno necessária a ser utilizada na vacina e melhorar a eficiência da mesma em indivíduos imunocomprometidos (GELLIN & SALISBURY, 2015).



Há inúmeros tipos de adjuvantes disponíveis atualmente, são estes: sais minerais, como os sais de alumínio, fosfatos de alumínio ou hidróxido de alumínio, os quais são comumente utilizados como adjuvantes; emulsões baseadas em óleo, como os adjuvantes de *Freund* completo e incompleto (AFC e AFI) aplicados às imunizações em animais; Saponinas; partículas poliméricas; citocinas; partículas semelhantes a vírus; lipossomas; e derivados bacterianos (COFFMAN et al., 2010; BASTOLA et al., 2017).

Os principais adjuvantes aplicados à vacinas para humanos atualmente são: Alum (Hidróxido de alumínio); MF59, uma emulsão fluída composta por gotículas de esqualeno estabilizado com *Tween* 80 e Span 85; AS03, também uma emulsão, composta por esqualeno, vitamina E e *Tween* 80; e, Montanide ISA 51 e Montanide ISA 720, que são microemulsões compostas por esqualeno estabilizadas por surfactantes (ISRAELI et al., 2009; BASTOLA et al., 2017).

Quanto à forma que agem, dentre os adjuvantes citados, os baseados em minerais, emulsões e lipossomas podem agir na apresentação do antígeno ao sistema imunológico de forma mais lenta, e ainda formando agregados que protegem o antígeno da degradação rápida (LEROUX-ROELS, 2010). Enquanto adjuvantes baseados em citocinas e saponinas, agem aumentando a resposta imune inata contra o antígeno utilizado, podendo gerar alteração quanto à qualidade e intensidade das respostas imunes adaptativas (MARCIANI, 2018).

Um outro fator a ser considerado no desenvolvimento de uma vacina é a via pela qual será administrada, visto que isso pode também influenciar no adjuvante a ser utilizado, além de gerar outras variáveis a serem observadas, como tempo de absorção e até fatores econômicos a serem considerados. Dessa forma, visto estas variáveis, e ainda a dificuldade na elaboração de novas vacinas, devido à restrição da resposta imune que se torna limitada frente aos antígenos vacinais estudados, há a necessidade de novas abordagens no desenvolvimento de vacinas cada vez mais eficazes, isto inclui considerar novos adjuvantes vacinais aplicáveis principalmente a humanos (AZIZ et al., 2007; GELLIN & SALISBURY, 2015).

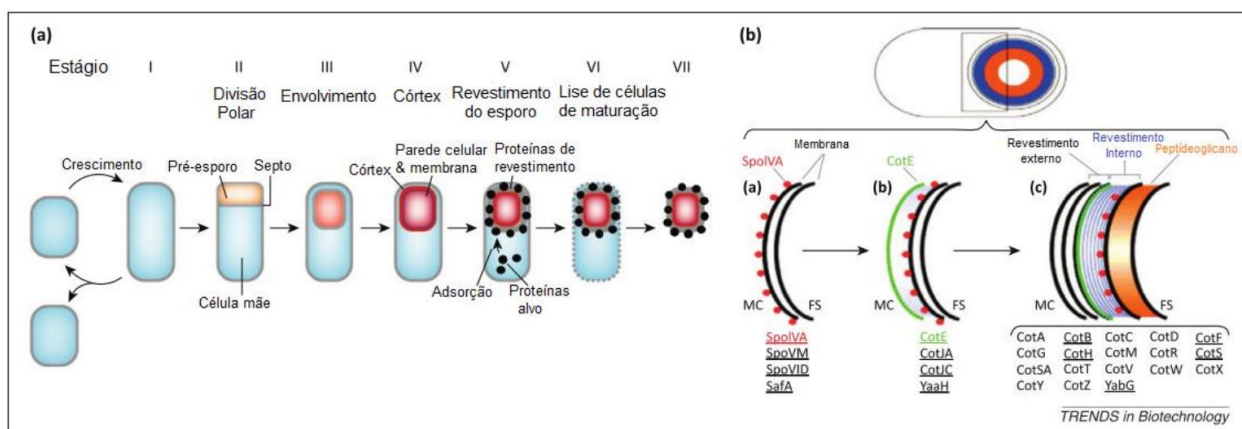
#### **4. *Bacillus subtilis***

Um dos métodos de imunoestimulação e apresentação de antígeno que tem recebido atenção é baseado no uso de esporos de *Bacillus subtilis*. O *B. subtilis* é uma bactéria Gram-positiva, não patogênica, que recebeu o status GRAS (*generally regarded as safe*) pelo FDA Americano (*Food and Drug Administration*), sendo uma das mais estudadas, uma vez que possui seu genoma e características bem elucidadas atualmente. As culturas dessa bactéria

foram muito populares mundialmente antes da introdução dos antibióticos, pois eram utilizadas como agentes imunoestimulantes para auxiliar em tratamentos do trato gastrointestinal. A aplicação desta bactéria com finalidades industriais datam mais de mil anos, uma vez que a produção de *natto* por fermentação no estado sólido da soja foi realizada pela primeira vez no Japão em 1982 (SCHALLMEY et al., 2004).

O *B. subtilis*, quando submetido a um ambiente escasso em nutrientes, produz uma célula morfológica distinta chamada esporo (WANG et al. 2017; WANG & YANG, 2017). Esses esporos possuem grande resistência, podendo sobreviver às temperaturas elevadas, assim como baixíssimas, além de outras condições adversas. Esses esporos também são muito utilizados como probióticos para humanos e animais, em algumas regiões da Ásia e da África, (SOUZA et al., 2014).

O processo de produção do esporo pela célula é dividido em sete estágios, estes podem ser observados na Figura 4.1. O início desse processo se dá com a formação do filamento axial (Figura 4.1 I), e então o desenvolvimento do septo (Figura 4.1 II) que possui dois compartimentos composto pela célula mãe e o pré-esporo. A célula mãe, por sua vez, engloba o pré-esporo (Figura 4.1 III), e logo em seguida ocorre a formação e montagem das camadas que irão compor o esporo maduro. Nas fases seguintes (Figura 4.1 IV, V e VI) observa-se a deposição do córtex e formação do exoesporo, além da formação da estrutura da capa do esporo e outros componentes externos, como a crosta. No estágio final do processo (Figura 4.1 VII), a parede celular do esporângio é lisada, liberando o esporo maduro para o meio. Os esporos são facilmente ativados dando início ao ciclo vegetativo da célula em uma resposta ao meio favorável (DRIKS, 2002).



**Figura 4.1. Diagrama mostrando o progresso da esporulação de *Bacillus subtilis* e exibição dos esporos em sete estágios.** A) Etapas de esporulação e formação dos esporos. B) Visão mais detalhada das proteínas de revestimento do esporo durante o processo de maturação. Fonte: Adaptado de DRIKS, 2002.

A estrutura do esporo é composta por um revestimento protetor, este é constituído por duas camadas, uma interna e outra externa, sendo estas compostas por mais de 70 proteínas diferentes. Estas proteínas de revestimento são sintetizadas ainda no interior da célula-mãe esporulante, e são fixadas na superfície dos esporos ao passo que os pré-esporos emergem (Figura 5b) (PAN, KIM, YUN, 2012). Já no núcleo do esporo é possível localizar o DNA cromossomal, esse compartimento é formado por duas membranas que são sintetizadas ainda no início da esporulação (DRIKS, 2002).

Sendo assim, o método de apresentação de uma proteína exógena a partir da fusão com uma proteína de revestimento do próprio esporo, mostra-se uma forma fácil de exibição utilizando esporos (KIM & SCHUMANN, 2009). Dentre as proteínas de revestimento que compõem o esporo de *B. subtilis*, as mais utilizadas para exibição de proteínas heterólogas na superfície do esporo são a CotB e CotC (DUC & CUTTING, 2003; ISTICATO et al., 2001).

#### **4.1 Esporos de *Bacillus subtilis* e sua aplicabilidade na apresentação de antígenos**

Devido à sua estabilidade e segurança, o esporo é uma ferramenta biotecnológica ideal com diversas aplicações potenciais. São utilizados para produção de enzimas industriais, produção de proteínas heterólogas, inseticidas, antibióticos entre outras aplicações (SCHALLMEY et al., 2004).

Quanto à exibição de proteínas heterólogas na superfície dos esporos de *B. subtilis*, pode ser realizada por duas metodologias diferentes. A primeira é baseada na recombinação da bactéria, onde há a inserção da sequência de DNA de interesse no genoma bacteriano, resultando em esporos recombinados, geralmente utilizam as proteínas âncoras CotC e CotB para tal finalidade. O outro método consiste na adsorção de antígenos ou enzimas purificadas na superfície dos esporos de forma física ou química, sendo assim não há a recombinação da bactéria (ISTICATO & RICCA, 2014).

Assim, estudos utilizando as técnicas anteriormente descritas, têm destacado que os esporos podem atuar como adjuvantes vacinais, promovendo a elevação da resposta humoral após a co-administração com antígenos tanto acoplados ou integrados à superfície de esporos (SOUZA et al, 2014).

O primeiro estudo a recombinar *B. subtilis* com o objetivo de expressar uma proteína heteróloga na superfície de seus esporos, foi publicado em 2001, onde utilizaram o fragmento C-terminal da Toxina do Tétano (TTFC), para isto, utilizando a proteína CotB como proteína

âncora. Desta forma, desenvolveram um sistema promissor de apresentação de antígenos, tendo como resultado a exposição das moléculas de TTFC na superfície do esporo (ISTICATO et al., 2001).

Alguns estudos têm avaliado a administração tanto nasal quanto oral desses esporos recombinantes. Um estudo de Lin et al., (2020), exibiu o antígeno CsSerp3 de *Clonorchis sinensis*, na superfície de esporos por meio da proteína de revestimento CotC. Com a ferramenta desenvolvida imunizaram camundongos por via oral e observaram um aumento dos níveis de IgA específico de CsSerp3, em 4-8 semanas após a primeira imunização, comparado aos controles. Não foi constatado nenhum efeito colateral ou dano patológico nos animais. Os autores concluíram em seu trabalho que os esporos podem ser uma estratégia vacinal por via oral contra *C. sinensis*.

Mais recentemente os esporos de *B. subtilis* foram utilizados como ferramentas para entrega por via oral do antígeno SARS-CoV-2 Spike, oriundo do vírus SARS-CoV-2 responsável pela infecção de COVID-19. Em um teste piloto, não observaram reações adversas nos camundongos ou nos humanos voluntários, após três imunizações orais com os esporos recombinantes. Além disso, observaram um aumento significativo de anticorpos neutralizantes específicos contra o antígeno alvo. Concluindo que os esporos podem ser futuros candidatos vacinais para COVID-19 (SUNG et al., 2022).

Alguns outros antígenos também já foram testados com sucesso em esporos de *B. subtilis* como um adjuvante, com os antígenos de *Rotavírus* (LEE et al, 2010), *Helicobacter acinonychis* (HINC et al., 2010), *Escherichia coli* (GOMES et al., 2009; ISTICATO et al, 2013), *Bacillus anthracis* (DUC et al., 2007), HIV (SOUZA et al., 2014), Papiloma Vírus humano e vírus da herpes humano (APS et al., 2016), *Clostridium difficile* (POTOCKI et al., 2017), Salmonela (DAI et al., 2018) entre outros, indicando este sistema como uma excelente metodologia de apresentação vacinal.

Dado o grande número de possibilidades do uso de esporos de *B. subtilis* como adjuvante vacinal para inúmeras doenças, juntamente ao fato da proteína MSP3 ser uma das candidatas vacinais para malária mais promissoras, este trabalho teve como objetivo principal avaliar a resposta imune frente ao antígeno MSP3 de *P. falciparum* contido na superfície de esporos.

## *II. OBJETIVOS*

**OBJETIVO GERAL**

Avaliar a resposta imunológica gerada contra a proteína MSP3 contida na superfície dos esporos de *B. subtilis*.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Realizar levantamento bibliográfico sobre o estado da arte do uso da MSP3 como candidato vacinal;
2. Padronizar metodologia de quantificação de esporos e análise de acoplamento, em Citometria de Fluxo;
3. Viabilizar a expressão da proteína MSP3 de *P. falciparum* na superfície de esporos de *B. subtilis*;
4. Estabelecer protocolo de estimulação em modelo murino para produção de IgG utilizando *B. subtilis* recombinantes produzidos.

# *Capítulo 1*

Neste capítulo é apresentado um artigo de revisão recentemente publicado por nosso grupo. O artigo se refere ao primeiro objetivo específico deste trabalho o qual foi realizar um levantamento bibliográfico sobre o estado da arte da utilização da MSP3 como candidata vacinal para malária. Desta forma, buscou-se com esta revisão apresentar um breve histórico dos estudos que levaram a vacina baseada na MSP3 (GMZ2) aos testes clínicos de fase II no qual se encontra. Além disso, os trabalhos descritos buscaram demonstrar a segurança vacinal, além de seu tempo de proteção contra malária. Desta forma, baseados na literatura, demonstrando o potencial uso da MSP3 como candidato vacinal para malária.

### **Informações sobre o artigo**

**Título do artigo de revisão:** Merozoite surface protein 3 of *Plasmodium falciparum* as a vaccine candidate: a brief review

**Referência bibliográfica:** Alves, Késsia Caroline Souza et al. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 as a vaccine candidate: a brief review. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo [online]. 2022, v. 64

**Situação:** Publicado; **Revista:** Instituto de Medicina Tropical de São Paulo



## **Proteína de superfície de merozoíto 3 de *Plasmodium falciparum* como candidato a vacina : uma breve revisão**

Késsia Caroline Souza Alves<sup>1,2</sup>, JM Guimarães<sup>5</sup>, Maria Edilene Martins de Almeida<sup>4</sup> Luís André Morais Mariúba<sup>1,2,3,4</sup>

1- Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ), Manaus, AM, 69057-070, Brasil

2- Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69067-005, Brasil ;

3- Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (PPGIBA-UFAM), Manaus, AM, 69067-005, Brasil

4- Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 21040-360, Brasil

5- Centro Multiusuário para Análises de Fenômenos Biomédicos – CMABio , Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, 69065-00, Brasil

### **RESUMO**

Apesar dos muitos esforços de pesquisadores em todo o mundo, atualmente não existe uma vacina eficaz para a malária. Numerosos estudos foram desenvolvidos para encontrar antígenos vacinais que sejam imunogênicos e seguros. Entre os candidatos a antígenos, a proteína 3 de superfície merozoíto de *Plasmodium falciparum* (MSP3) tem se destacado em muitos estudos por sua capacidade de induzir uma resposta imune sólida e protetora, além de ser segura para uso em humanos. Esta revisão apresenta os principais estudos que exploraram a MSP3 como candidata a vacina nas últimas décadas. As formulações de MSP3 foram testadas em animais e humanos e as formulações candidatas mais avançadas são MSP3-LSP, uma combinação de MSP3 e LSP, e GMZ2 (vacina baseada na fusão de proteínas recombinantes GLURP e MSP3) que está sendo testada em estudos clínicos de fase 2. Esta breve revisão destaca a história e as principais abordagens de formulações de vacinas baseadas em MSP3 contra *P. falciparum* .

**PALAVRAS - CHAVE** : Malária . MSP3. *Plasmodium falciparum*. Vacina.

### **INTRODUÇÃO**

A malária ainda é considerada um grande problema de saúde pública em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo. É uma infecção causada por parasitas do gênero *Plasmodium*, e é transmitida ao homem pelo mosquito do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. Segundo dados da OMS <sup>1</sup>, em 2019, foram detectados 228 milhões de casos da doença em todo o mundo, o que resultou em 405 mil óbitos, sendo o *Plasmodium falciparum* o agente da maioria das infecções <sup>1</sup>.

Apesar da disponibilidade de medicamentos antimaláricos, o desenvolvimento de uma vacina eficaz é de extrema importância, pois em muitas partes do mundo foram encontrados problemas relacionados à resistência aos medicamentos, como a resistência à artemisinina observada na sub-região do Grande Mekong e à mefloquina, observada na região da fronteira da Tailândia com Myanmar <sup>2,3</sup>. Mais recentemente, foi detectada resistência ao fármaco diidroartemisinina -piperaquina, contra infecções causadas por *Plasmodium falciparum*, em indivíduos residentes no Camboja, Tailândia e Vietnã <sup>4</sup>.

Juntamente com os medicamentos antimaláricos, métodos de controle baseados na distribuição e uso de mosquiteiros impregnados, pulverização interna e extinção de criadouros de mosquitos também foram aplicados com sucesso. No entanto, esses métodos apresentam resultados apenas temporários <sup>1</sup>.

Os sintomas clínicos da malária surgem durante a fase sanguínea da infecção, onde o rompimento dos glóbulos vermelhos infectados o que leva à liberação de fatores pró-inflamatórios. O *overshooting* da liberação de citocinas resultante pode desencadear formas graves da doença <sup>5-7</sup>

O desenvolvimento de uma vacina eficiente é um desafio por várias razões. Primeiramente, o parasita expressa diferentes antígenos em diferentes estágios da infecção. Em segundo lugar, o parasita apresenta variação antigênica exibindo adesinas que mudam oportunamente quando dentro dos glóbulos vermelhos <sup>8,9</sup>. Terceiro, o parasita possui uma vasta variabilidade antigênica de proteínas que são expostas nos merozoítos <sup>8</sup>. Além disso, o parasita é capaz de atenuar a resposta imune por liberação (por exemplo, fator de inibição de macrófagos, MIF, ou exposição de antígenos polimórficos que interagem com células imunes (por exemplo, RIFINs <sup>10,11</sup>). Desta forma, uma vacina segura e eficaz requer uma combinação de resposta humoral e celular: a resposta humoral é capaz de induzir a opsonização de esporozoítos, bloqueando a invasão de hemácias e eliminando células infectadas, seja diretamente ou por ADCI (inibição celular dependente de anticorpos); a resposta celular é importante para a produção de citocinas inflamatórias, estimulação

da produção de anticorpos pelas células B, células T auxiliares e células T citotóxicas eliminando hepatócitos infectados. Além disso, uma vacina deve produzir células de memória de longa duração<sup>5</sup>.

As vacinas para malária mais comumente estudadas possuem os seguintes antígenos: proteína circunsporozoíta (CSP); antígeno de membrana apical (AMA1), em alguns estudos formando um complexo com o antígeno RON2L; proteína homóloga semelhante à ligação de reticulócitos de *P. falciparum* (*PfRH5*); e proteína de superfície de merozoítos (MSP). Com exceção do CSP, que pertence ao estágio pré-eritrocitário do parasita, os demais antígenos fazem parte do estágio eritrocitário do parasita<sup>12-14</sup>. A CSP compõe a vacina Mosquirix<sup>TM</sup> (nome comercial da RTS,S), que já é recomendada para uso pela OMS, e é indicada para aplicação em crianças em regiões endêmicas. Apesar da vacina RTS,S apresentar apenas 40% de eficácia e uma redução de 30% nos casos graves de malária, estes ainda são os melhores resultados já alcançados em uma vacina contra a malária. No entanto, ainda são necessários estudos que busquem uma vacina mais eficaz<sup>1,15,16</sup>.

Antígenos de vacina do estágio eritrocitário podem ajudar a diminuir a carga parasitária. Idealmente, o reconhecimento desses antígenos por anticorpos deve bloquear ou retardar a invasão dos merozoítos nas hemácias e/ou levar à rápida fagocitose dos merozoítos<sup>17</sup>. Um desses antígenos, a proteína 3 de superfície do merozoíto (MSP3), tem sido objeto de vários estudos. A vacina MSP3 tem sido estudada principalmente através de uma abordagem complexa com outras proteínas, como GLURP (proteína rica em glutamato) ou LSP (Long Synthetic Peptide). Dessa forma, esta revisão se concentra em estudos de vacinas baseadas em MSP3, tanto em modelos animais quanto em aplicações em humanos.

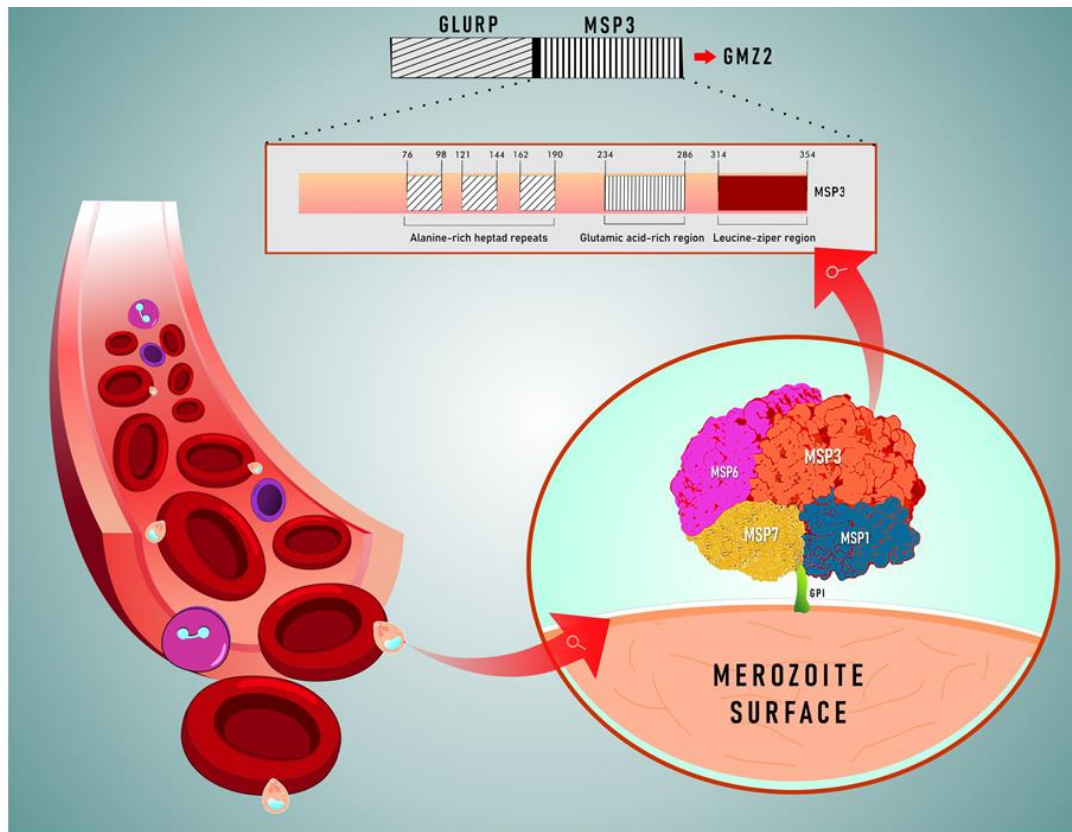
### **Características estruturais do MSP3**

A proteína 3 de superfície merozoíto (MSP3) de *Plasmodium falciparum* foi identificada em 1994 por Oeuvray *et al.*<sup>18</sup>. Soros reativos a MSP3 foram identificados em indivíduos imunes residentes em Papua Nova Guiné e, desde então, passaram a ser chamados de antígeno polimórfico secretado associado a merozoíto (SPAM); no entanto, é mais amplamente referida como MSP3<sup>19</sup>.

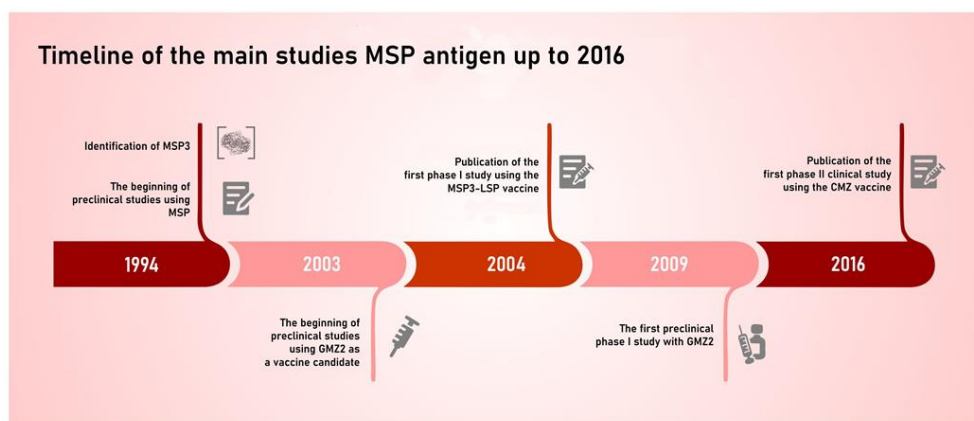
MSP3 é uma proteína solúvel e tem um peso molecular de aproximadamente 48 kDa. Está presente na superfície do merozoíto onde forma um complexo proteico junto com MSP1, MSP6 e MSP7 através de uma interação proteína-proteína, sendo este complexo, mais especificamente

associado aos complexos p83/p30 e p38/p42 de MSP1, este por sua vez, está ligado à superfície do merozoíto por uma âncora glicosilfosfatidilinositol diretamente ligada a MSP1<sup>18-20</sup>. A função desta proteína não é bem compreendida; no entanto, acredita-se que esteja ligada a receptores durante a invasão de células eritrocitárias e formas oligoméricas estendidas<sup>21</sup>. Algumas características estruturais importantes desta proteína incluem a presença de uma sequência sinal N-terminal; um domínio composto por três blocos, cada um consistindo de quatro sequências repetidas de sete aminoácidos de alanina *in tandem*; um domínio rico em ácido glutâmico; e um motivo zíper de leucina em sua porção C-terminal (Figura 1)<sup>20</sup>.

Estudos demonstraram que a resposta de anticorpos citofílicos contra MSP3 pode gerar imunidade protetora<sup>22</sup>. Além disso, vários pesquisadores confirmaram que a MSP3 é uma candidata promissora a vacina, especialmente quando várias amostras isoladas da África e da Ásia foram analisadas e foi elucidado que o domínio C-terminal dessa proteína é altamente conservado<sup>19,23</sup>. Apesar disso, estudos realizados em algumas regiões endêmicas como Tailândia e Burkina Faso, com isolados do parasito, alertaram para uma diversidade de haplótipos de MSP3 predominantes em diferentes regiões, o que é uma questão muito importante no desenho vacinal<sup>24,25</sup>.



**Figura 1.** Esquema da estrutura completa da MSP3 e sequência da vacina GMZ2. Durante as infecções por *Plasmodium falciparum*, os merozoítos da corrente sanguínea invadem os glóbulos vermelhos (A) pela interação das proteínas de superfície com os receptores eritrocitários. Entre as proteínas que participam desse processo está o complexo proteico composto por MSP1, MSP3, MSP6 e MSP7, ligados à membrana do merozoíto por meio de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (B). A sequência MSP3 presente neste complexo (C) possui regiões de repetições heptadas de alanina (faixas diagonais); uma região rica em ácido glutâmico (listras verticais); e um motivo de zíper de leucina (vermelho). A estrutura proteica presente na vacina GMZ2 corresponde à união do antígeno GLURP e do MSP3 (D).



**Figura 2.** Linha do tempo dos principais estudos com o antígeno MSP3 até 2016.

## Estudos de modelos animais

### Estudos de modelo murino

Em 1994, foi realizado um estudo por Oeuvray *et al.*<sup>18</sup> para avaliar a capacidade protetora da proteína de superfície do merozoíto (MSP3), recentemente descoberta (Figura 2)<sup>18</sup>. Os autores observaram que anticorpos contra epítomos protetores de MSP3 podem ser produzidos em camundongos, assim como em humanos, em resposta a um único contato com o parasita em uma forma natural de exposição, demonstrando assim que os epítomos marcados por anticorpos protetores são imunogênicos quando apresentado pelo parasita. Como resultado, concluiu-se que a correlação entre os isotipos de anticorpos produzidos contra o epítopo de 48 kDa, além da proteção clínica e a capacidade dos anticorpos anti-MSP3 em inibir a esquizogonia do parasita, indicam que esta molécula pode ser um importante alvo contra *P. falciparum*<sup>18</sup>. Em humanos adultos, o mecanismo de proteção contra a malária envolve a inibição celular dependente de anticorpos mediada por monócitos do sangue. Além disso, os anticorpos citofílicos IgG3 e IgG1 foram os principais isotipos produzidos em indivíduos protegidos da infecção por malária<sup>26</sup>.

Dado seu potencial de proteção, um estudo realizado em 2003 por Theisen *et al.*<sup>27</sup> utilizaram uma abordagem para analisar essa capacidade protetora que empregou a fusão entre MSP3 e outro antígeno de *P. falciparum*, GLURP (proteína rica em glutamato) (Figura 2). Os autores observaram que os anticorpos produzidos contra o antígeno híbrido apresentaram forte reatividade contra proteínas nativas do parasita, capazes de reconhecer tanto as proteínas GLURP nativas do parasita quanto as proteínas MSP3 por meio de imunofluorescência indireta. Assim, os

autores concluíram que a molécula híbrida pode proporcionar apresentação superior dos antígenos em comparação à abordagem de imunização individual das moléculas <sup>27</sup>.

Em 2010, Daher *et al.* <sup>28</sup> realizaram um estudo para analisar a imunogenicidade da região C-terminal de MSP3, e quatro proteínas recombinantes diferentes foram produzidas. Foi observado que a combinação multigênica das seis regiões da família MSP3 foi imunogênica em camundongos. Além de inibir o crescimento do parasita em um ensaio ADCI, os anticorpos produzidos contra as construções foram capazes de reconhecer as proteínas nativas do parasita. Sabe-se que tais anticorpos inibitórios atuam inibindo o processamento de proteínas de superfície como MSP3, bloqueando a formação do complexo com MSP1 na superfície do merozoíto, afetando sua função durante a invasão <sup>29</sup>. Portanto, concluíram que essa nova construção multigênica foi capaz de desencadear títulos de anticorpos significativos podendo ser considerada imunogênica em camundongos <sup>28</sup>.

#### Estudos em modelo primata

A capacidade protetora da MSP3 já foi observada em estudo desenvolvido em 2002 por Hiaseda *et al.* <sup>30</sup> que usaram macacos *Aotus nancymai*; entretanto, foi utilizado o adjuvante de Freund, que não é indicado para imunização humana. Em 2004, um estudo pré-clínico preliminar, que também utilizou a proteína GLURP, foi realizado em primatas <sup>31</sup>. Este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho de diferentes construções derivadas dos antígenos MSP3 e GLURP analisando-as em diferentes combinações de adjuvantes, bem como sua capacidade de proteção em um teste de desafio com *Plasmodium falciparum* em *Saimiris sciureus* primatas. Sete diferentes formulações de antígeno-adjuvante foram testadas, das quais cinco se mostraram imunogênicas. Entre as combinações que apresentaram alta imunogenicidade estão MSP-3b-IFA (adjuvante de Freund), MSP-3<sub>212-380</sub> - AS02 e MSP-3<sub>212-380</sub> - Montanide ISA720. Em relação ao teste de provocação, alguns macacos imunizados com MSP-3<sub>212-380</sub> - AS02 ou GLURP<sub>27-500</sub> - alum foram capazes de controlar o nível de parasitemia por *P. falciparum* no estágio sanguíneo da infecção. É importante destacar que os adjuvantes AS02 e alúmen são utilizados na imunização de humanos. Portanto, esses resultados indicam que GLURP e MSP3 podem induzir uma resposta protetora contra uma infecção experimental por *Plasmodium falciparum* <sup>30,31</sup>.

Carvalho *et al.* <sup>32</sup>, em 2005, utilizaram a proteína híbrida recombinante MSP3/GLURP com outra combinação de adjuvantes em *Saimiri sciureus*, com o objetivo de tentar melhorar a

imunogenicidade dessas proteínas. A proteína híbrida foi combinada com os adjuvantes Montanide ISA720, alum e adjuvante de Freund. Após a imunização, os animais foram desafiados com *P. falciparum*, com predominância do parasito nas fases de anel e trofozoíta. Os autores concluíram que a proteína híbrida MSP3/GLURP pode induzir proteção contra a infecção da malária se os títulos de anticorpos forem proporcionalmente altos. Além disso, o adjuvante utilizado em combinação com o antígeno também tem papel crucial no nível de resposta <sup>32</sup>.

### Testes clínicos

A sequência de 69 aminoácidos desta região C-terminal mostrou ter características interessantes para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade a ser utilizada em diversos estudos de Fase I e Iib aplicados em humanos expostos à doença e pessoas resistentes à malária. Há dois principais candidatos para ensaios de vacinas contra a malária, nomeados MSP3-LSP e GMZ2, uma combinação de MSP3 e GLURP <sup>33,34</sup>

#### MSP3-LSP

Com base nos resultados promissores observados em testes em animais, alguns estudos se concentraram em avaliar o desempenho da MSP3 em ensaios clínicos e utilizaram diferentes estratégias. Em 2004, um ensaio clínico de Fase I analisou a imunogenicidade e o nível de segurança de um peptídeo sintético longo derivado de uma região conservada de MSP3 (MSP3-LSP), que é conhecido por ser um alvo importante para anticorpos. Os voluntários que participaram da pesquisa eram adultos (Figura 2). Os grupos foram analisados, cada um contendo seis indivíduos que receberam três doses subcutâneas de 4 concentrações diferentes de peptídeo em Montanide ISA720, ou 2 concentrações de peptídeo em hidróxido de alumínio como adjuvante. Após a imunização, os voluntários foram randomizados em seis grupos de tratamento, divididos em dois blocos, e as respostas imunes dos voluntários foram analisadas. Observou-se que a formulação utilizando Montanide ISA720 desencadeou reações locais graves nos voluntários, sendo estes indivíduos retirados do estudo, o que levou à redução do número de doses em quatro grupos. No entanto, nenhuma reação adversa grave foi encontrada ao longo do estudo. Em relação à resposta dos anticorpos anti-MSP3-LSP, 23 dos 30 indivíduos apresentaram resposta específica ao antígeno. Além disso, o reconhecimento de anticorpos produzidos contra *Plasmodium faciparum* MSP3 nativo foi detectado em 19 dos 30 indivíduos, além disso foram observadas respostas específicas para células T e produção de interferon-gama. Como resultado, a presença de linfócitos T de



memória foi duradoura, prevalecendo por até 12 meses, principalmente no grupo imunizado com adjuvante hidróxido de alumínio. Concluiu-se que, a potencial utilização desta vacina candidata é suportada por uma forte indução de resposta citofílica. Apesar de não haver voluntários finais suficientes para uma análise estatística pela qual fosse possível comparar os grupos de diferentes adjuvantes, aqueles imunizados com hidróxido de alumínio e MSP3-LSP apresentaram melhores resultados em termos de imunogenicidade e tolerância <sup>33</sup>.

Em 2005, Druilhe *et al.* <sup>34</sup> foram os primeiros a desenvolver um estudo clínico para uma vacina baseada em MSP3 que demonstrou sua atividade antiparasitária. Novamente, uma resposta humoral e celular contra MSP3-LSP foi observada e a resposta durou até 12 meses. Além disso, descobriram que os anticorpos gerados foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* do parasita na fase eritrocitária de forma comparável aos anticorpos produzidos naturalmente por indivíduos que residem em regiões endêmicas. No experimento de imunidade passiva *in vivo*, onde os soros dos pacientes foram injetados em camundongos SCID (imunodeficiência combinada grave) infectados com *Plasmodium falciparum*, os níveis de parasitas dos animais diminuíram consideravelmente. Tais efeitos inibitórios estão relacionados à reatividade do anticorpo à proteína nativa, que foi observada em 60% dos voluntários e perdurou por até 12 meses após a imunização. O estudo concluiu que, mesmo em baixas doses de imunização com MSP3-LSP, usando Montanida ou alum, o antígeno foi capaz de induzir anticorpos da classe citofílica, que são específicos para epítomos altamente conservados da proteína. Além disso, o antígeno induziu um efeito duradouro e os anticorpos produzidos contra ele apresentaram alta atividade biológica contra o estágio eritrocitário do *P. falciparum* <sup>34</sup>.

Em 2006, Sirina *et al.* <sup>35</sup> realizaram um estudo cego e controlado de Fase I com a vacina MSP3-LSP, a fim de investigar sua segurança e imunogenicidade em adultos que vivem em uma área de transmissão de malária na África Oriental. Não houve resposta específica para MSP3-LSP em relação a IgG total, subclasses de IgG e IgM, e a resposta de IFN -  $\gamma$  foi estável após a vacinação. Em conclusão, indivíduos semi-ímmunes da região endêmica que foram inoculados com a vacina MSP3-LSP demonstraram boa tolerância a ela; entretanto, a vacina não estimulou uma resposta humoral, provavelmente devido às altas taxas de imunidade humoral preexistente <sup>35</sup>.

Outro estudo foi realizado por Lusingu *et al.* <sup>36</sup>, em 2009, para avaliar a segurança e imunogenicidade de uma vacina utilizando MSP3 (Figura 2). Para isso, a vacina foi testada em crianças de 12 a 24 meses de Korogwe, na Tanzânia. Três grupos foram estabelecidos: dois grupos

receberam 2 doses cada de MSP3 emulsionado com alum, e o terceiro foi um grupo controle (vacina contra hepatite B). Os níveis de anticorpos anti-MSP3 nos participantes do estudo eram baixos antes do início das imunizações e um aumento nas concentrações de IgG total anti-MSP3 foi observada após a segunda e terceira imunização em ambos os grupos de estudo. Algumas das respostas imunes a MSP3 foram maiores em ambos os grupos quando comparadas ao controle, com a resposta de anticorpos específicos de duas classes (IgG1 e IgG3) prevalecendo. Assim, concluiu-se que o antígeno MSP3 é seguro e imunogênico em crianças, porém há necessidade de um ensaio de Fase II para avaliar a resposta em crianças de regiões endêmicas. autores sugerem aumentar a concentração do antígeno para melhor avaliação da resposta <sup>36</sup>.

A vacina candidata MSP3-LSP também foi avaliada quanto à sua segurança e imunogenicidade em crianças que residem em Burkina Faso <sup>37</sup>. As crianças foram separadas em três grupos, nos quais 2 grupos receberam diferentes concentrações de MSP3-LSP e o terceiro grupo recebeu doses da vacina Engerix B contra hepatite B. Ao avaliar os soros coletados, os níveis de anti-MSP3-LSP antes das imunizações foram semelhantes em todos os três grupos. A resposta total de anticorpos IgG contra MSP3-LSP mostrou aumento nos grupos imunizados com MSP3-LSP, sem reação no grupo controle. Em ambos os grupos imunizados com MSP3-LSP, observou-se predominância de anticorpos de resposta citofílica (IgG1 e IgG3), que apresentaram aumento após a vacinação quando comparados aos valores do início do estudo. Os autores concluíram que a vacina candidata MSP3-LSP é promissora em termos de imunogenicidade e tolerância <sup>37</sup>.

### MSP3-GLURP (GMZ2)

A GMZ2 pertence à segunda classe de vacinas candidatas para a malária. Consiste em uma fusão de proteínas recombinantes, contendo dois antígenos de *Plasmodium falciparum em estágio sanguíneo*, GLURP e MSP3 <sup>38-43</sup>.

Em 2009, Esen *et al.* <sup>38</sup> publicaram os resultados de um estudo de Fase Ia com GMZ2 utilizando hidróxido de alumínio como adjuvante. Os adultos europeus foram divididos em três grupos determinados por três doses diferentes de GMZ2. Os autores observaram que todas as doses foram bem toleradas entre os 30 participantes imunizados. Além disso, todos os participantes, exceto um indivíduo, tiveram um aumento substancial nos anticorpos antígeno-específicos, com picos nos dias 56 ou 84. Ambos os níveis de anticorpos anti-GLURP e MSP3 aumentaram de forma semelhante após a terceira imunização. Em relação à duração da resposta anti-GMZ2, ela ainda era

detectável após 1 ano em níveis significativamente altos em todos os grupos, embora os títulos fossem consideravelmente menores quando comparados aos dias 56 e 84. No entanto, a duração da resposta indica que as células-B de memória podem contribuir para a resposta a longo prazo da vacina. Dessa forma, os autores concluíram que a GMZ2 é segura e imunogênica, devendo ser incluída em avaliações subsequentes como vacina <sup>38</sup>.

Em um estudo em 2010, Mordmüller *et al.* <sup>39</sup> realizaram uma pesquisa com 40 adultos da região de Lambaréné, Gabão, para investigar a segurança e imunogenicidade do GMZ2 em adultos expostos à malária. Os participantes foram aleatoriamente designados para receber uma dose de GMZ2 ou a vacina contra a raiva, que foi usada como controle. Amostras de sangue dos participantes imunizados foram acompanhadas por um ano. Após as três imunizações com GMZ2, os indivíduos apresentaram aumento significativo nos níveis de anticorpos anti-GMZ2, quando comparados ao grupo controle. No dia 365, não foi detectada diferença significativa entre os indivíduos vacinados com GMZ2 e a vacina antirrábica (controle). Eles também observaram um aumento significativo para as subclasses IgG1 e IgG3 após a vacinação com GMZ2, o que não foi observado para as subclasses IgG2 e IgG4. Quanto à duração da resposta, no dia 365, 26 dos 39 indivíduos ainda apresentavam anticorpos específicos para o antígeno estudado. A correlação entre anticorpos específicos da vacina e células-B de memória não foi significativa. Como resultado, concluíram que a vacina é bem tolerada, segura, imunogênica, sem efeitos adversos, o que é encorajador para a continuidade dos estudos clínicos <sup>39</sup>. No ano seguinte, foi realizado um ensaio randomizado de Fase Ib com a vacina candidata GMZ2 a fim de observar a imunogenicidade e segurança da vacina em crianças de 1 a 5 anos do Gabão, na África. As crianças receberam três doses de GMZ2 nas concentrações de 30 µg ou 100 µg, ou a vacina controle (anti-rábica). Quando os grupos foram observados individualmente, no grupo GMZ2 (30 µg), todos os indivíduos apresentaram aumento de anticorpos anti-GMZ2 no dia 84, enquanto no outro grupo imunizado (100 µg) um indivíduo não respondeu. Um ano após a primeira vacinação, a concentração de anticorpos para todos os antígenos foi semelhante no grupo controle e no grupo GMZ2 (100 µg) a ponto de o grupo GMZ (30 µg) apresentar níveis ligeiramente maiores de anti-GMZ2 quando comparado ao grupo controle. Houve um aumento na resposta das células B de memória após a vacinação com GMZ2; no entanto, nenhum aumento de células-B anti-GMZ2 foi observado no dia 84 em 4 crianças do grupo imunizado com 30µg e em 3 crianças no grupo de 100µg. Assim,

concluíram que ambas as doses administradas de GMZ2 mostraram-se imunogênicas e seguras para as crianças expostas à malária na região do estudo <sup>40</sup>.

Um estudo de Fase IIb foi realizado em 2016 para analisar a eficácia do GMZ2 em crianças na África. Neste estudo, crianças de 12 a 60 meses foram randomizadas para receber três doses de GMZ2 na concentração de 100 µg ou a vacina controle (anti-rábica) (Figura 2). As crianças foram observadas por seis meses para que pudessem medir a incidência de malária entre as crianças imunizadas. Entre o grupo de 868 crianças que receberam as três doses de GMZ2/hidróxido de alumínio, houveram 641 casos de malária, enquanto no grupo controle, onde 867 crianças receberam doses da vacina antirrábica, houveram uma incidência de 720 casos de malária. Quando analisada estatisticamente pelo protocolo ATP, a eficácia da vacina foi de 14% ajustada para idade e localização. Em uma análise ITT ajustada à idade, a eficácia da vacina foi de 11,3%. A média de anticorpos anti-GMZ2 aumentou em até 8 vezes em crianças que receberam três doses da vacina GMZ2/alum, e observou-se que esse aumento foi maior em crianças na faixa etária de 1-2 anos do que em crianças com idade 3-4 anos. Nenhuma evidência de declínio na eficácia da vacina foi encontrada no período de seis meses; entretanto, há necessidade de acompanhamento de longo prazo para melhor estimar a duração da proteção. Assim, apesar de provocar uma resposta imune substancial, não tem se mostrado uma resposta suficientemente protetora, sendo necessário avaliar uma formulação mais aprimorada ou o uso de adjuvantes que melhorem a imunogenicidade da vacina e a durabilidade da proteção <sup>41</sup>.

Recentemente, o mesmo grupo fez um acompanhamento de 2 anos em crianças de 12 a 60 meses imunizadas com GMZ2/alum (100 µg), em um estudo randomizado, duplo-cego de Fase 2b, para o qual utilizaram a vacina antirrábica como ao controle. Eles observaram que a vacina continua sendo bem tolerada, sem grandes efeitos adversos. Quanto aos resultados, observaram que a eficácia da vacina apresentou variações de acordo com a idade das crianças, e um pouco menos de episódios de malária em crianças mais velhas. Quanto à duração da resposta, a vacina não apresentou evidência de proteção no Ano 2, o que indica diminuição dos níveis de anticorpos contra a vacina, fato já observado em outros candidatos à vacina contra a malária. No entanto, os autores defendem que vacinas antigênicas da fase sanguínea são viáveis, para isso, as formulações destas precisam ser aprimoradas, incluindo a escolha do antígeno e do adjuvante a serem utilizados <sup>42</sup>.

Em 2019, Dejon- Agobe *et al.* <sup>43</sup> investigaram a eficácia da vacina GMZ2 contra *Plasmodium falciparum*. A eficácia foi testada em pessoas imunizadas com a vacina e depois

infectadas com esporozoítos de *Plasmodium falciparum*, usando um protocolo para infecção controlada por malária humana (CHMI). Resultou em 85% dos voluntários apresentando parasitemia por *Plasmodium falciparum* e 44% apresentando malária (parasitemia e sintomas). Em relação à resposta humoral, os níveis de anticorpos anti-GMZ2 foram elevados nos três grupos imunizados com GMZ2 quando comparados ao grupo controle quatro semanas após a última imunização. Assim, as concentrações basais de anticorpos específicos produzidos durante a imunização foram associadas à proteção contra a malária. Os autores concluíram que o GMZ2 é bem tolerado e imunogênico em adultos naturalmente expostos ao *Plasmodium falciparum*; no entanto, contra CHMI, não mostrou proteção suficiente, embora os níveis basais de anticorpos específicos da vacina tenham sido associados à proteção <sup>43</sup>.

Alguns estudos investigaram a relação entre malária e doenças causadas por helmintos, uma vez que estas são co-endêmicas na maioria das regiões da África Subsaariana. Há uma interação nas respostas imunes contra ambos os patógenos, o que pode implicar diretamente na eficácia da vacina <sup>41</sup>. Amoani *et al.* <sup>44</sup> observaram a influência da ancilostomíase (*Necator americanus*) e do tratamento anti-helmíntico na resposta de anticorpos anti-GMZ2 adquiridos naturalmente e antígenos constituintes. Foi relatado que indivíduos que tiveram coinfeção com *Plasmodium falciparum* e ancilostomíase apresentaram aumento significativo nos níveis de IgG3 contra GMZ, em comparação com o grupo infectado apenas com *P. falciparum* e o grupo controle. Por outro lado, após o tratamento com o anti-helmíntico albendazol, houve redução dos níveis de IgG3 anti-GMZ e anti-GLURP. Acompanhando este resultado, quando analisados individualmente, os níveis de IgM e IgG1 anti-MSP3 diminuíram após a desparasitação. O estudo não identificou associação significativa entre a coinfeção e o aumento de anticorpos específicos para MSP3 de forma individual <sup>44</sup>.

Avaliando a influência da infecção por helmintos na resposta à vacina GMZ2, Nouatin *et al.* <sup>45</sup> observaram o efeito do *Schistosoma haematobium* e dos helmintos transmitidos pelo solo (STH) na ocorrência de malária após CHMI (infecção controlada por malária humana). Os níveis de IgG anti-GMZ2 foram maiores em indivíduos infectados com *S. haematobium* do que naqueles infectados com *S. stercoralis*. Com isso, o estudo demonstra que, dependendo da espécie de helminto, há diferença na influência para uma resposta específica após a aplicação da vacina candidata contra a malária. Assim, os resultados sugerem que a infecção por helmintos afeta a imunogenicidade e eficácia da vacina contra a malária <sup>45</sup>.

## CONCLUSÃO

Com base nos dados coletados, as vacinas à base de MSP3, apesar de imunogênicas, ainda possuem grandes desafios a serem superados, ou seja, sua baixa capacidade protetora. Apesar de experimentos *in vitro* bem sucedidos que demonstram um potencial de MSP3 como um constituinte de vacina anti-estágio sanguíneo, um método adequado para desencadear uma resposta imune protetora em humanos ainda não foi encontrado.

Outro aspecto a ser considerado para uma futura vacina MSP3 é a concentração do antígeno a ser utilizado, pois sua influência é importante e tem sido observada em testes clínicos. Esse aspecto crítico precisa ser estabelecido para cada formulação desenvolvida, e permitiria uma resposta humoral alta e eficaz contra o antígeno, sem reações colaterais em humanos.

Novas abordagens podem ser empregadas para melhorar a imunogenicidade e eficácia de vacinas contendo MSP3, como o uso de vetores virais, DNA/RNA ou formulações lipossomais que estão atualmente em uso contra infecções por Sars-CoV2. A promessa de novos veículos vacinais/adjuvantes, como lipossomas e esporos de *Bacillus subtilis*, e a avaliação de novas vias de imunização, como a via mucosa, também podem trazer perspectivas para novos estudos.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. World Malaria Report; 2019. [Cited 2020 Nov 20]. Available: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2019](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2019).
2. Witkowski B, Lelièvre J, Barragán MJL, Laurent V, Su XZ, Berry A, et al. Increased tolerance to artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(5):1872–7.
3. Phyo AP, Ashley EA, Anderson TJC, Bozdech Z, Carrara VI, Sriprawat K, et al. Declining Efficacy of Artemisinin Combination Therapy Against *P. Falciparum* Malaria on the Thai-Myanmar Border (2003-2013): The Role of Parasite Genetic Factors. *Clin Infect Dis*. 2016;63(6):784–91.
4. Van der Pluijm RW, Imwong M, Chau NH, Hoa NT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, et al. Determinants of dihydroartemisinin–piperaquine treatment failure in *Plasmodium falciparum*

malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study. *Lancet Infect Dis.* 2019;19:952-961.

5. Good MF, Doolan DL. Malaria vaccine design: Immunological considerations. *Immunity.* 2010;33(4):555–66.

6. Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol.* 2006;28:35–49.

7. Chauahan VS, Yazdani SS, and Gaur D. Malaria vaccine development based on merozoite surface proteins of *Plasmodium falciparum*. *Hum. Vaccin.* 2010;6:57-762.

8. Duffy PE, Krzych U, Francis S, Fried M. Malaria vaccines: using models of immunity and functional genomics tools to accelerate the development of vaccines against *Plasmodium falciparum*. *Vaccine.* 2005; 23: 2235-2242

9. Lucas JZ, Sherman IW. *Plasmodium falciparum*: thrombospondin mediates parasitized erythrocyte band 3-related adhesin binding. *Exp. Parasitol.* 1998; 89:78–85

10. Ghosh S, Jiang N, Farr L, Ngobeni R, Moonah S. Parasite-Produced MIF Cytokine: Role in Immune Evasion, Invasion, and Pathogenesis. *Front Immunol.* 2019 Aug 21;10:1995.

11. Saito F, Hirayasu K, Satoh T, Wang CW, Lusingu J, Arimori T, et al. Immune evasion of *Plasmodium falciparum* by RIFIN via inhibitory receptors. *Nature.* 2017 Dec 7;552(7683):101-105.

12. Srinivasan, P., Baldeviano, G.C., Miura, K. et al. A malaria vaccine protects Aotus monkeys against virulent *Plasmodium falciparum* infection. *npj Vaccines.* 2017;2(1):1-10.

13. Drew DR, Beeson JG. PfRH5 as a candidate vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *Cell Press.* 2015;31:87-88.

14. Girard MP, Reed ZH, Friede M, Kieny MP, et al. A review of human vaccine research and development: malaria. *Vaccine.* 2007;25:1567-1580

15. Olotu A, Moris P, Mwacharo J, Vekemans J, Kimani D, Janssens M, et al. Circumsporozoite-specific T cell responses in children vaccinated with RTS,S/AS01 E and protection against *P falciparum* clinical malaria. *PLoS One.* 2011;6(10).

16. White MT, Bejon P, Olotu A, Griffin JT, Riley EM, Kester KE, et al. The Relationship between RTS,S Vaccine-Induced Antibodies, CD4+ T Cell Responses and Protection against *Plasmodium falciparum* Infection. *PLoS One.* 2013;8(4).

17. McColl DJ, Anders RF. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). *Mol Biochem Parasitol.* 1997;90:21–31.
18. Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Grass-Masse H, Lepers JP, Ralamboranto I, Tartar A, et al. A novel merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP-3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1994;89:77-80.
19. Imam M, Shailja S, Naveen KK, Virander SC. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3: Oligomerization, self-assembly, and heme complex formation. *J. Biol. Chem.* 2013;7:3856–3868.
20. Deshmukh A, Chourasia BK, Mehrotra S, et al. *Plasmodium falciparum* MSP3 Exists in a Complex on the Merozoite Surface and Generates Antibody Response during Natural Infection. *Infect Immun.* 2018;86(8).
21. Pearce JA, Mills K, Trigllia T, Cowman AF, Anders RF. Characterisation of two novel proteins from the asexual stage of *Plasmodium falciparum*, H101 and H103. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 2005;139:141-151.
22. Singh S, Soe S, Mejia JP, Roussilhon C, Theisen M, Corradin G, et al. Identification of a conserved region of *Plasmodium falciparum* MSP3 targeted by biologically active antibodies to improve vaccine design. *J. Infect. Dis.* 2004;190:1010-1018.
23. Huber W, Felger I, Matile H, Lipps HJ, Steiger S, Beck HP. Limited sequence polymorphism in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;87:231–234.
24. Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. *Plasmodium falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. *Infect Immun.* 1992;60(4):1473-1481.
25. Pattaradilokrat S, Sawaswong V, Simpalipan P, Kaewthamasorn M, Siripoon N, Harnyuttanakorn P. Genetic diversity of the merozoite surface protein-3 gene in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Malar J.* 2016;15:517.
26. Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Tiono, AB; Konate, AT; Gansane A, et al. Humoral and cell-mediated immunity to MSP3 peptides in adults immunized with MSP3 in malaria endemic area, Burkina Faso. *Parasite immunology.* 2009;31(8):474-480.



27. Theisen M, Soe S, Brunstedt K, Follmann F, Bredmose L, Israelsen H, et al. A *Plasmodium falciparum* GLURP–MSP3 chimeric protein; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies. *Vaccine*. 2003;22:1188-1198.
28. Daher LJ, Demanga CG, Prieur E, Pérignon JL, Bouharoun-Tayoun H, Druilhe P. Toward the rational design of a malaria vaccine construct using the MSP3 family as an example: contribution of immunogenicity studies in models. *Infection and immunity*. 2010;78(1):477–485.
29. Lin CS, Uboldi AD, Epp C, Bujard H, Tsuboi T, Czabotar PE, et al. Multiple *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 Complexes Mediate Merozoite Binding to Human Erythrocytes. *J Biol Chem*. 2016;291(14):7703-7715.
30. Hisaeda H, Saul A, Reece JJ, Kennedy MC, Long CA, Miller LH, et al. Merozoite Surface Protein 3 and protection against malaria in *Aotus* monkeys. *J Infect Dis*. 2002;185:657–664.
31. Carvalho LJ, Oliveira SG, Theisen M, Alves FA, Andrade MC, Zanini GM, et al. Immunization of *Saimiri sciureus* monkeys with *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 and glutamate-rich protein suggests that protection is related to antibody levels. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2004;59:363–372.
32. Carvalho LJ, Alves FA, Bianco C Jr., Oliveira SG, Zanini GM, Soe S, et al. Immunization of *Saimiri sciureus* monkeys with a recombinant hybrid protein derived from the *Plasmodium falciparum* antigen glutamate-rich protein and merozoite surface protein 3 can induce partial protection with Freund and Montanide ISA720 adjuvants. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;2:242-248.
33. Singh S, Soe S, Mejia JP, Roussilhon C, Theisen M, Corradin G, et al. Identification of a conserved region of *Plasmodium falciparum* MSP3 targeted by biologically active antibodies to improve vaccine design. *J Infect Dis*. 2004;190: 1010–1018.
34. Druilhe P, Spertini F, Soesoe D, Corradin G, Mejia P, Singh S, et al. A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. *PLoS Med*. 2005;2:e344.
35. Sirima SB, Nebie I, Ouedraogo A, Tiono AB, Konate AT, Gansané A, et al. Safety and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 long synthetic peptide (MSP3-LSP) malaria vaccine in healthy, semi-immune adult males in Burkina Faso, West Africa. *Vaccine*. 2007;25:2723–2732.

36. Lusingu JP, Gesase S, Msham S, Francis F, Lemnge M, Seth M, et al. Satisfactory safety and immunogenicity of MSP3 malaria vaccine candidate in Tanzanian children aged 12–24 months. *Malar J.* 2009;8:163.
37. Sirima SB, Tiono AB, Ouédraogo A, Diarra A, Ouédraogo AL, Yaro JB, et al. Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate MSP3 long synthetic peptide in 12-24 months-old Burkinabe children. *PLoS One.* 2009;4(10):e7549. Erratum in: *PLoS One.* 2010;5(4).
38. Esen M, Kremsner PG, Schleucher R, Gässler M, Imoukhuede EB, Imbault N, et al. Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. *Vaccine.* 2009;27(49):6862-8.
39. Mordmüller B, Szywon K, Greutelaers B, Esen M, Mewono L, Treut C, et al. Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate GMZ2 in malaria-exposed, adult individuals from Lambaréné, Gabon. *Vaccine.* 2010;28(41):6698-703.
40. Béliard S, Issifou S, Hounkpatin AB, Schaumburg F, Ngoa UA, Esen M, et al. A randomized controlled phase Ib trial of the malaria vaccine candidate GMZ2 in African children. *PLoS One.* 2011;6(7):e22525.
41. Sirima SB, Mordmüller B, Milligan P, Ngoa UA, Kironde F, Atuguba F, et al. GMZ2 Trial Study Group. A phase 2b randomized, controlled trial of the efficacy of the GMZ2 malaria vaccine in African children. *Vaccine.* 2016;34(38):4536-4542.
42. Dassah S, Adu B, Sirima SB, Mordmüller B, Ngoa UA, Atuguba F, et al. Extended follow-up of children in a phase 2b trial of the GMZ2 malaria vaccine. *Vaccine.* 2021;39(31):4314-4319.
43. Dejon-Agobe JC, Ateba-Ngoa U, Lalremruata A, Homoet A, Engelhorn J, Nouatin OP, et al. Controlled Human Malaria Infection of Healthy Adults With Lifelong Malaria Exposure to Assess Safety, Immunogenicity, and Efficacy of the Asexual Blood Stage Malaria Vaccine Candidate GMZ2. *Clin Infect Dis.* 2019;69:1377-1384.
44. Amoani B, Gyan B, Sakyi SA, Abu EK, Nuvor SV, Barnes P, et al. Effect of hookworm infection and anthelmintic treatment on naturally acquired antibody responses against the GMZ2 malaria vaccine candidate and constituent antigens. *BMC Infect Dis.* 2021;21:332.
45. Nouatin O, Mengue JB, Dejon-Agobé JC, Fendel R, Ibáñez J, Ngoa UA, et al. Exploratory analysis of the effect of helminth infection on the immunogenicity and efficacy of the asexual blood-stage malaria vaccine candidate GMZ2. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2021;15(6):e0009361

## *Capítulo 2*

Neste capítulo é exposto um *short communication* pronto para submissão, o qual refere-se ao objetivo específico 2 deste trabalho, de padronizar um método de quantificação e análise de acoplamento dos esporos de *B. subtilis*, utilizando *Beads Trucount*, juntamente com a dupla marcação dos esporos (marcação de DNA com brometo de etídio e marcação da superfície dos esporos com anticorpo fluorescente) para leitura em citômetro de fluxo. Esta metodologia teve como objetivo refinar a quantificação dos esporos, permitindo quantificar pequenas concentrações, além de analisar a taxa de acoplamento do anticorpo fluorescente à superfície dos esporos, realizada quimicamente. Foi possível analisar ainda a influência do processo de autoclavagem no acoplamento aos esporos. Sendo assim, foi possível demonstrar que a metodologia apresentada foi capaz de melhorar a acurácia da quantificação, além de possibilitar a análise de acoplamento na superfície dos esporos. Outro dado encontrado no estudo foi que a taxa de acoplamento foi maior nos esporos autoclavados. Desta forma, é descrita uma metodologia capaz de quantificar esporos recombinados ou acoplados à proteína de interesse, de forma eficaz e com menor possibilidade de erro.

#### **Informações sobre o artigo**

**Título do artigo original:** Improvement of *Bacillus subtilis* spore quantification using beads and fluorescent labels in flow cytometry

**Situação:** Pronto para submissão; **Revista a ser submetida:** Biotechnology & Biotechnological Equipment

## Short communication

### Melhoria da quantificação de esporos de *Bacillus subtilis* usando grânulos e marcadores fluorescentes em citometria de fluxo

Késsia Souza Alves<sup>a,b</sup>; Yury Chaves<sup>a,c</sup>; Maria Edilene Almeida<sup>a,c</sup>; Ezio Ricca<sup>e</sup>; Juliane Corrêa Glória<sup>a,b</sup>; Rachele Istatico<sup>e</sup>; Juliana Zuliani<sup>g</sup>; Charles Boeno<sup>g</sup>; Mauro Paloschi<sup>g</sup>; Luís André Mariúba<sup>a,b,d,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de diagnóstico e controle de doenças infecciosas na Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia, Manaus, Rua Teresina 476, Brazil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;

<sup>e</sup> Department of Biology, Federico II University, Napoli – IT

<sup>f</sup> Programa de Pós-graduação Strictu sensu em Biologia celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (PGBCM)/IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil

<sup>g</sup> Laboratório de Imunologia Celular Aplicada à saúde, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil.

Corresponding Author: Luís André Moraes Mariúba (andre.mariuba@fiocruz.br) **Abstract**

Esporos de *Bacillus subtilis* têm sido propostos como sistema de *delivery* na mucosa e para imobilização de enzimas. As análises baseadas em citometria de fluxo foram previamente propostas como abordagens rápidas, confiáveis e específicas para a detecção de células marcadas de *B. subtilis*. Aqui, foi proposto o uso de citometria de fluxo para avaliar a eficiência de exibição de um anticorpo fluorescente na superfície do esporo e quantificar o número de esporos usando marcação fluorescente do DNA do esporo. Para isso, utilizou-se brometo de etídio como marcador de DNA e APC anti-IL-10 humana, acoplada aos esporos, como marcador de superfície. Os esporos marcados foram então lidos em um citômetro de fluxo, no qual a qualidade do acoplamento foi analisada. Além disso, sugerida a quantificação desses esporos utilizando esferas BD TruCOUNT™, uma vez que esta técnica demonstra alta acurácia na detecção de células. Como resultado, foi demonstrado que a dupla marcação melhorou a precisão da quantificação na citometria de fluxo, e também foi constatado que houve uma maior sensibilidade quanto à análise do acoplamento de

proteínas fluorescentes na superfície dos esporos. Este método deve auxiliar no desenvolvimento de estudos que focam no uso de esporos como plataforma biotecnológica em outras aplicações.

## Introdução

*Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram-positiva em forma de bastonete capaz de produzir esporos quiescentes quando as condições ambientais não permitem o crescimento celular (McKennney, Driks & Eichenberger, 2013). Os esporos são formas celulares extremamente estáveis e as de várias espécies, incluindo *B. subtilis*, são amplamente utilizadas como probióticos para uso humano e animal (Cutting, 2011). Devido às suas propriedades de resistência e segurança, o esporo de *B. subtilis*, que apresenta proteínas heterólogas, tem sido proposto como adjuvante de mucosa, sistema de liberação de vacina e plataforma de imobilização enzimática (Ricca et al., 2014).

Análises baseadas em citometria de fluxo (FC) foram previamente propostas como abordagens rápidas, confiáveis e específicas para detectar células marcadas de *B. subtilis*. Godjafrey e Alsharif (2003) sugeriram o uso de *beads* TruCOUNT™ para quantificação por FC de esporos não marcados. Karava et al. (2019) descreveram o uso de FC para monitoramento da esporulação em *B. subtilis* por rotulagem do DNA do esporo. Enquanto Isticato et al. (2019) usaram FC para avaliar a quantidade de proteínas marcadas com fluorescência na superfície do esporo.

Aqui, é sugerido o uso de marcação de DNA de esporos em associação ao uso de *beads* para contagem de células em FC para refinar a quantificação de esporos e avaliar a eficiência de acoplamento de anticorpos marcados com fluorescência na superfície do esporo.

## Materiais e métodos

O método de exaustão de nutrientes foi utilizado para promover a esporulação bacteriana. Neste caso, a cepa de *B. subtilis* KO7 foi incubada com meio líquido de esporulação Difco e a formação de esporos foi monitorada usando um microscópio (Nicholson & Setlow, 1990). Após a incubação, as células foram separadas do meio de cultura por etapas de centrifugação a 2.000 xg e três lavagens usando H<sub>2</sub>O ultrapura gelada para obter a suspensão celular, que foi armazenada a 4°C por 24 horas.

Após esse período, metade da suspensão celular foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso, e a segunda metade foi autoclavada por 45 minutos a  $120^{\circ}\text{C}$ , de onde foi retirada uma alíquota de  $40\mu\text{L}$  para cultivo em ágar Luria Bertani para verificar a presença de células vegetativas.

Os esporos obtidos foram quantificados em tubos BD TruCOUNT™ (340334), seguindo as recomendações do fabricante, e posteriormente lidos em citômetro de fluxo (BD FACSCanto II). Assim,  $50\mu\text{L}$  de esporos mais  $10\mu\text{L}$  de esferas BD TruCOUNT™ foram analisados, e o tamanho e a complexidade dos eventos capturados foram considerados como parâmetros de avaliação. A concentração de esporos foi calculada conforme descrito pelas instruções do fabricante:

$$A = X/Y \times N/V$$

onde ,

(A) contagem absoluta da população de células; (X) número de eventos celulares positivos; (Y) número de eventos do cordão; (N) número de *beads* por teste (este valor é encontrado na etiqueta da embalagem de alumínio do tubo BD TruCOUNT™ e pode variar de lote para lote); e (V) volume de teste.

Para marcação de ácidos nucleicos, esporos autoclavados (AS) e não autoclavados (NAS) foram centrifugados e ressuspensos em PBS 1x e incubados com fator de diluição 0,05 (v/v) de brometo de etídio (EtBr) por 30 minutos. Após este período, os esporos foram lavados três vezes com PBS 1x usando centrifugação. Posteriormente, os esporos marcados foram analisados através da leitura do citômetro de fluxo no canal FL3.

Para o teste de dupla marcação, os esporos AS e NAS foram incubados com EDC (cloridrato de (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e NHS (N - hidroxisuccinimida (Sigma Aldrich) para acoplamento ( Falahati -Pour et al., 2015). Primeiramente, as amostras foram submetidas à centrifugação a  $17.949\text{ xg}$  e, em seguida, ressuspensas em  $25\mu\text{L}$  de EDC ( $57\text{ mg/ml}$ ), seguida de incubação por 15 minutos em temperatura ambiente (RT). Após este período,  $25\mu\text{L}$  de NHS ( $50\text{ mM}$ ) foi adicionado à suspensão de esporos, seguido de incubação à temperatura ambiente por 30 minutos e depois colhido novamente. Em seguida, foi adicionado anticorpo fluorescente (FA) APC anti-IL-10 humano (BioLegend) e as amostras foram deixadas durante a noite a  $15^{\circ}\text{C}$ . Os esporos foram então lavados com PBS 1x e marcados com  $10\text{ mg/mL}$  de brometo de etídio (Ludwig

Biotec ), diluídos a 1/50, os esporos marcados foram então deixados por 1 hora em gelo e protegidos da luz. Os esporos foram lavados com PBS 1x e analisados usando um citômetro de fluxo (BD FACSCanto™ II). As mesmas amostras foram analisadas em lâminas para imunofluorescência ao microscópio (Nikon Eclipse 80i), com ampliação de 1000x, e utilizando os seguintes filtros: FITC 480/30nm (verde) e TRITC 540/25 nm (vermelho).

Os dados foram analisados no software GraphPad Prism versão 5, com nível de significância estabelecido em  $p < 0,05$ . As comparações estatísticas entre e dentro dos grupos foram feitas usando o teste de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis, quando apropriado.

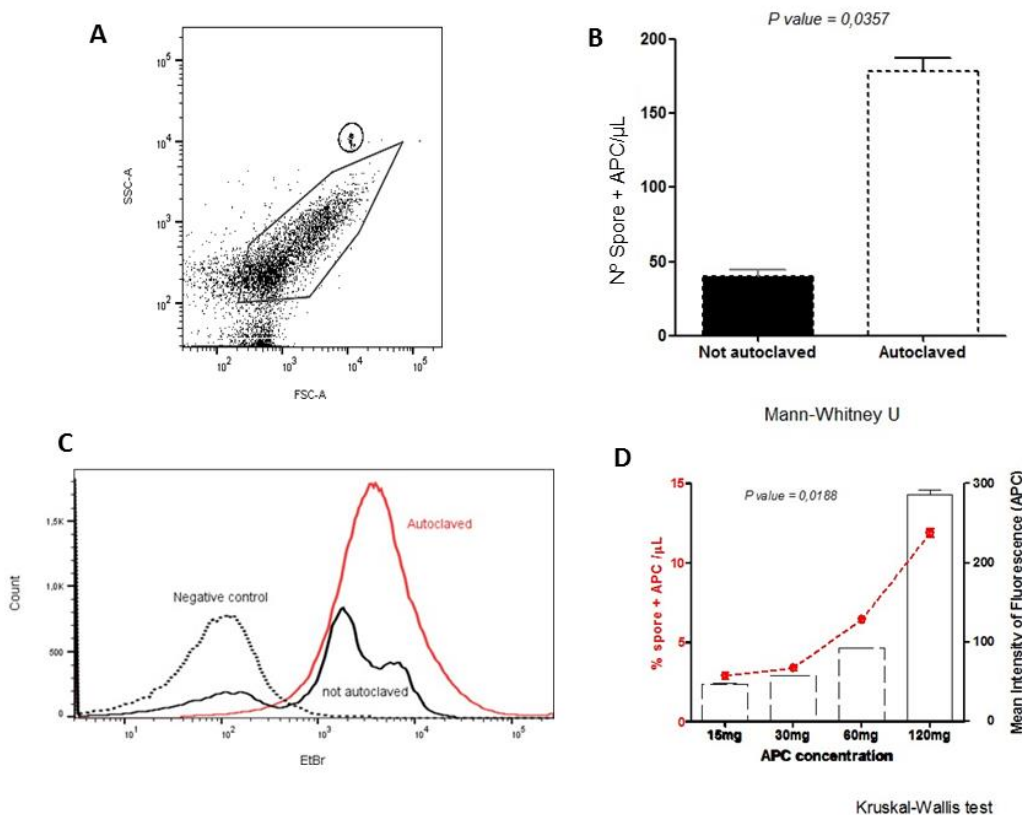
## Resultados

Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de esporos de *B. subtilis* purificados e autoclavados (AS) e não-autoclavados (NAS) foram submetidos à quantificação por citometria de fluxo (FC) usando *beads* BD truCOUNT™. As análises detectaram  $8 \times 10^3$  e  $1,64 \times 10^4$  esporos/ $\mu\text{L}$  em amostras de AS e NAS, respectivamente (Fig. 1A).

Ambos os tipos de amostras de esporos foram utilizados para a análise de acoplamento de um anticorpo fluorescente (APC anti-IL-10 humana), que teve como objetivo avaliar se a inativação dos esporos pelo calor poderia afetar esse processo. Nos experimentos, a intensidade média de fluorescência (MFI) na superfície do AS apresentou maior eficiência de acoplamento quando comparado ao NAS (Fig. 1B).

O material genético de AS e NAS também foi marcado com brometo de etídio (EtBr) com o objetivo de aumentar a precisão da detecção de eventos na FC, confirmando que eram esporos e não detritos. A coloração com EtBr do NAS mostrou menor intensidade de fluorescência do que a coloração do AS, indicando maior coloração do material genético nesta última condição. Além disso, um maior MFI foi observado na população AS marcada do que na população NAS (Fig. 1C, pico em vermelho e pico em preto). O controle, que não foi marcado com EtBr, não apresentou fluorescência significativa (Fig. 1C, pico pontilhado).





**Figura 1.** Análise morfométrica de esporos de *B. subtilis* e beads TruCOUNT™ por citometria de fluxo. (A) Quantificação de esporos de *Bacillus subtilis* usando TruCOUNT™ amostra não diluída (B) Intensidade de fluorescência média do acoplamento de anticorpos fluorescentes em esporos autoclavados e não autoclavados. (C) Histograma de brometo de etídio (EtBr) marcado autoclavado e não autoclavado esporos de *B. subtilis*, onde: pico em vermelho – marcação NAS EtBr, pico em preto – marcação AS EtBr, pico pontilhado – controle sem marcação EtBr. (D) Análise percentual de acoplamento de fluorescência e intensidade de fluorescência média do teste duplamente marcado usando EtBr e APC-Ab acoplado. Os pontos mostram a intensidade de fluorescência média em diferentes concentrações de anticorpo fluorescente, e as barras mostram a porcentagem de fluorescência dos esporos corados com EtBr e acoplados ao anticorpo fluorescente.

A análise de acoplamento com anticorpo fluorescente (FA) e esporos marcados com EtBr permitiu a dupla marcação na citometria de fluxo. Uma porcentagem crescente de fluorescência foi observada de acordo com o aumento da concentração de FA (Fig. 1D). A maior porcentagem foi obtida na concentração de 120 mg de FA, com 12% dos eventos duplamente marcados. Da mesma forma, o MFI dos esporos marcados com FA também varia significativamente ao analisar a concentração de FA, causando maior intensidade de fluorescência na concentração de 120 mg. Estas mesmas amostras apresentaram dupla marcação quando analisadas por imunofluorescência,

confirmando assim a marcação do DNA genômico por EtBr e a superfície dos esporos por FA (Apêndice 1).

## Discussão

A morfologia dos esporos de *B. subtilis* foi observada em análise por citômetro de fluxo. A citometria de fluxo foi capaz de mostrar uma baixa concentração de esporos (dados não mostrados), o que não é possível obter com métodos tradicionais, como contagem de colônias em placas. Esta técnica é demorada e necessita de células viáveis, não permitindo a quantificação de esporos inativados (Harold, Hertel & Gorman-Lewis, 2011). Assim, a FC mostrou-se uma alternativa útil para esse fim.

A população de esporos foi quantificada e analisada de acordo com os parâmetros descritos na patente de Godfrey e Alsharif (2003), e nossos resultados deste estudo apresentaram padrões semelhantes de tamanho e complexidade. Os autores descrevem um método para quantificar esporos viáveis usando esferas FC e TruCOUNT™ como parâmetro para calcular o número de esporos.

A melhora da sensibilidade da FC pode ser obtida pela aplicação de rótulos específicos para permitir a discriminação de artefatos e eventos alvo. Como o brometo de etídio intercala o material genético dos esporos, fez a quantificação com *beads* TruCOUNT™ mais refinadas e eficientes. Uma alta porcentagem da população marcada foi detectada em AS, indicando que a quantificação de *beads* TruCOUNT™ deve sofrer supercontagem nesta condição, além disso acreditamos que a maior marcação de Etbr em AS foi devido ao processo de autoclavagem que provavelmente proporcionou a abertura de poros na estrutura dos esporos possibilitando uma maior intercalação do marcador com o material genético. Os resultados indicam um número elevado de artefatos no NAS, destacando assim a importância da marcação com EtBr. Karava et al. (2019) também aplicaram citometria de fluxo para quantificação de esporos de *B. subtilis* e identificação da fase de esporulação. SYBR1 e SYBR2 foram utilizados como agente intercalante do DNA em associação com a triagem celular, e foi possível quantificar e isolar diferentes fases celulares. É importante destacar que os resultados deste estudo demonstram a possibilidade de realizar essa quantificação de forma mais precisa e sem o uso de tecnologia de classificação de células.

A análise de citometria de fluxo de AS marcado com EtBr acoplado com FA descrito aqui também permitiu a qualificação e quantificação do acoplamento de proteína fluorescente (FPC). Além disso, foi possível inferir se a morfologia e concentração da população de esporos foram afetadas pelo procedimento de conjugação, dando uma compreensão geral do processo que não é obtida pelo método *dot-blot*. Isticato et al. (2019) também analisaram o FPC na superfície do esporo e demonstraram sua viabilidade, confirmando-o tanto por imunofluorescência quanto por citometria de fluxo, dependendo do tipo de proteína que é usada para o acoplamento. Aqui, foi demonstrado que é possível melhorar este ensaio usando EtBr para análise duplamente marcada de FPC na superfície dos esporos aplicando método semelhante ao já descrito por Isticato et al. (2019). Além disso, observamos que o AS apresentou um índice de acoplamento superior ao NAS quando analisado o percentual de fluorescência, conforme já relatado (Song et al., 2012). O resultado obtido provavelmente se deve à presença de protease na condição NAS, que poderia degradar a proteína a ser acoplada. Assim, a degradação das proteases durante a etapa de autoclavagem poderia melhorar significativamente a porcentagem de acoplamento do FPC ao esporo.

Além disso, o método aqui apresentado poderia ser usado para determinação indireta do acoplamento de proteínas não fluorescentes, uma vez que o FA pode ser usado como um repórter da saturação do acoplamento. Desta forma, após a ativação da superfície do esporo com EDC/NHS, uma curva de concentração de proteína não fluorescente pode ser aplicada nas amostras de esporos com subsequente adição de proteína fluorescente. A redução da fluorescência indica que a proteína não fluorescente ocupou os sítios ativados, deixando menos pontos para a proteína fluorescente se ligar.

Como pode ser visto, foi demonstrado um método prático e sensível para quantificação e análise de acoplamento de proteínas fluorescentes de esporos de *B. subtilis* usando citometria de fluxo. O uso de esferas TruCOUNT™ como parâmetro de quantificação, além da marcação de esporos com EtBr, permite uma contagem refinada de esporos e determinação percentual de acoplamento de proteínas fluorescentes. Este método deve auxiliar no desenvolvimento de estudos que enfocam o uso de esporos como plataforma biotecnológica em outras aplicações.

### **Declaração de ética**

O artigo está isento de aprovação do comitê de ética, uma vez que nenhum teste em animais ou humanos foi realizado neste estudo

#### Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

#### Fontes de financiamento

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finanças Código 001.

#### **Contribuições do autor**

KA, MA e JG realizaram os experimentos. LM e YC conceberam e projetaram os experimentos. KA, LM, ER e RI analisaram os dados e escreveram o artigo.

#### **REFERÊNCIAS**

Cutting, S. M. (2011) *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol.* 28 (2), 214-20.

Falahati-Pour, S.K.; Lotfi, A.S.; Ahmadian, G.; Baghizadeh, A. (2015) Covalent immobilization of recombinant organophosphorus hydrolase on spores of *Bacillus subtilis*. *J Appl Microbiol.* 118 (4), 976-88.

Godfrey, A. & Alsharif, R. (2003) Rapid enumeration of viable spores by flow cytometry. Patent US20040023319A1, United States.

Harold, Z., Hertel, M., Gorman-Lewis, D. (2011) Optimizing *Bacillus subtilis* spore isolation and quantifying spore harvest purity. *Journal of Microbiological Methods.* 87, 325-329.

Isticato, R., Ricca, E., Baccigalupi, L. (2019) Spore Adsorption as a Nonrecombinant Display System for Enzymes and Antigens. *J. Vis. Exp.* (145), e59102

Karava, M., Bracharz, F., Kabisch, J. (2019) Quantification and isolation of *Bacillus subtilis* spores using cell sorting and automated gating. *PLoS ONE.* 14 (7), e021989.

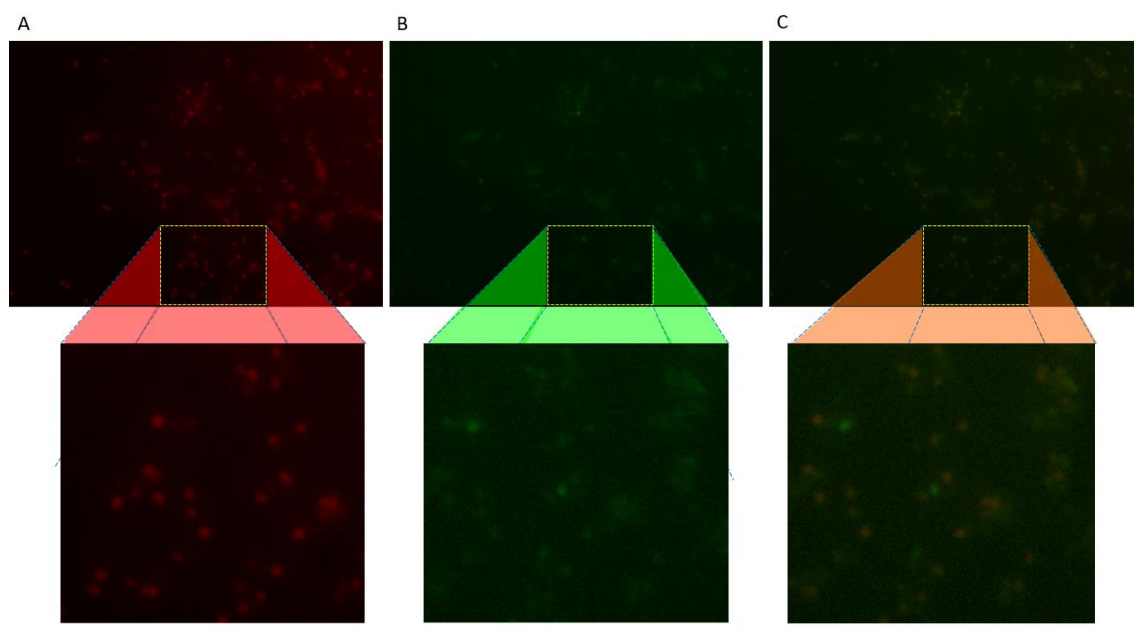
McKenney, P. T., Driks, A., Eichenberger, P. (2013) The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol.* 11 (1), 33-44.

Nicholson, W. L., Setlow, P. (1990) Sporulation, germination and outgrowth. In: Harwood CR, Cutting SM, editors. *Molecular biological methods for bacillus*. Chichester, UK: Wiley.

Ricca, E., Baccigalupi, L., Cangiano, G., De Felice, M., Istickato, R. (2014) Mucosal vaccine delivery by non-recombinant spores of *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact*. 12, 13-115.

Song, M., Hong, H. A., Huang, J. M., Colenutt, C., Khang, D. D., Nguyen, T. V., et al. (2012) Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. *Vaccine*. 30 (22), 3266-77.

## Apêndice



**Apêndice 1.** Imunofluorescência de esporos marcados com Et-br e anticorpo fluorescente (Nikon Eclipse 80i). (A) Esporos com material genético comercializados com Et-br (vermelho). (B) Esporos com superfície marcada com anticorpo fluorescente (verde). (C) Esporos duplamente marcados, com Et-br e FA (laranja).

## *Capítulo 3*

No capítulo 3 são apresentados os resultados obtidos referentes aos objetivos 3 e 4, os quais consistiram na construção de um *B. subtilis* recombinante expressando na superfície de seus esporos a proteína MSP3 de *P. falciparum* e analisar a capacidade dos esporos recombinantes em induzir resposta de IgG sérico em modelo murino. As cepas recombinantes foram obtidas por meio de duas clonagens: uma foi realizada em plasmídeo pGEMCotC, a fim de fundir a sequência da proteína CotC de *B. subtilis* com a sequência da PfMSP3; a outra foi feita em vetor pDG364 para ser integrado ao genoma do *B. subtilis*. Os esporos recombinantes autoclavados foram utilizados para imunização de camundongos, por via oral e nasal. Os resultados obtidos demonstraram o êxito no desenvolvimento de *B. subtilis* recombinante, expressando rPfMSP3 na superfície dos esporos. O grupo BsPfMSP3 foi capaz de induzir, por via oral, uma resposta de IgG sérico mais elevada do que o grupo imunizado por via nasal. Entretanto, ambos apresentaram níveis altos quando comparados aos esporos não recombinantes. Foi realizado um acompanhamento da resposta sendo possível detectar anticorpos circulantes contra rPfMSP3 por 250 dias. Por meio de análise de subclasses de IgG observou-se que BsPfMSP3 foi capaz de elicitar uma resposta imune de perfil Th1 tanto por via oral quanto por via nasal.

#### **Informações sobre o artigo**

**Título do artigo:** Esporos de *Bacillus subtilis* recombinantes como um sistema de entrega em imunizações nasal e oral contendo a Proteína 3 de superfície de merozoíto de *Plasmodium falciparum* e análise de resposta humoral em modelo murino

**Situação:** Em revisão para submissão; **Revista a ser submetido:** Scientific Report



## Artigo Original

### **Esporos de *Bacillus subtilis* recombinantes como um sistema de entrega em imunizações nasal e oral contendo a Proteína 3 de superfície de merozoíto de *Plasmodium falciparum* e análise de resposta humoral em modelo murino**

Késsia Caroline Souza Alves<sup>a,b</sup>; Maria Edilene Martins Almeida<sup>a,c</sup>; Ezio Ricca<sup>e</sup>; Rachele Isticato<sup>e</sup>; Luís André Morais Mariúba<sup>a,b,d,f</sup>.

<sup>a</sup> Laboratório de diagnóstico e controle de doenças infecciosas na Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia, Manaus, Rua Teresina 476, Brazil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;

<sup>e</sup> Department of Biology, Federico II University, Napoli – IT

<sup>f</sup> Programa de Pós-graduação Strictu sensu em Biologia celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (PGBCM)/IOC/Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding Author: Luís André Morais Mariúba ([andre.mariuba@fiocruz.br](mailto:andre.mariuba@fiocruz.br))

## RESUMO

A malária ainda se mostra uma ameaça a saúde pública, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, estando os esforços voltados para o desenvolvimento de uma vacina que possibilite proteção total para a doença. Muitos estudos têm utilizado esporos recombinantes de *Bacillus subtilis* recombinantes como veículos para entrega de antígenos heterólogos, a fim de otimizar a resposta gerada contra o mesmo. Neste estudo, foi expressa a proteína MSP3 de *Plasmodium falciparum* na superfície dos esporos de *B. subtilis* cepa KO7, com imunização de camundongos Balb/C por vias oral e nasal e avaliação da resposta humoral gerada. Os resultados demonstraram que o grupo imunizado por via oral com o esporo recombinante, gerou uma resposta maior de IgG sérico quando comparado ao grupo imunizado por via nasal, além disso foi observada

uma resposta predominante Th1, sendo títulos de anticorpos detectados até 200 dias. Desta forma, o uso de esporos de *B. subtilis* demonstra ser uma ferramenta promissora como adjuvante para uma formulação vacinal.

## INTRODUÇÃO

A malária representa um sério problema de saúde pública, por apresentar altas taxas de incidência de morbidade e mortalidade nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (GREENWOOD *et al.*, 2009). Segundo dados da OMS em 2018 foram registrados mundialmente 228 milhões de casos sendo 405 mil mortes (WHO, 2020).

Devido ao fato de possuírem afinidade com hemácias em qualquer estágio de maturação, o que eleva os níveis de parasitemia, resultando em sintomas mais agudos (GILLES, 2002), os casos de malária por *Plasmodium falciparum* são preocupantes, pois ele é responsável pela ocorrência das formas mais graves da doença e dos óbitos decorrentes destas complicações, principalmente em crianças na África (OMS, 2019).

Atualmente, ainda não há disponível uma vacina eficaz para combater a malária, sendo a vacina mais promissora a RTS'S, direcionada para o estágio pré-eritrocítico do parasita. É a única vacina que alcançou estágios de testes clínicos de fase III, apresentando uma redução de 39% dos casos de malária branda e 31,5% de malária grave.

Inúmeros antígenos têm disso testados a fim de desenvolver uma vacina para malária, um dos antígenos que tem demonstrado ser promissor é a proteína de Superfície de merozoíto 3 (MSP3), do estágio eritrocítico do parasito. Estudos têm descrito resultados interessantes quando utilizam a MSP3 como antígeno vacinal, sendo esta capaz de desencadear resposta de anticorpos citofílicos, principalmente as subclasses IgG1 e IgG3, além de apresentar uma resposta protetora contra o *P. falciparum* (SINGH *et al.*, 2004).

Sendo assim, sabe-se que uma vacina para malária apresenta desafios a serem superados, devendo aumentar e manter os níveis de anticorpos, além de prolongar o período de proteção. Um fator importante a ser considerado para o desenvolvimento de uma vacina são os imunostimulantes e adjuvantes, visto que estes têm a capacidade de aumentar a imunogenicidade de um antígeno, além de permitir uma proteção a longo prazo, aumentando assim a eficácia da vacina (Draper *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020; Mata *et al.* 2013).

Um dos métodos de imunoestimulação e apresentação de antígeno que tem recebido atenção é baseado no uso de esporos de *Bacillus subtilis*. O *B. subtilis* é uma bactéria Gram-positiva, não patogênica, que recebeu o status GRAS (*generally regarded as safe*) pelo FDA Americano (*Food and Drug Administration*), sendo capaz de produzir esporos (SCHALLMEY et al., 2004) que possuem grande resistência às mais variadas condições adversas. Devido a isto é uma ferramenta biotecnológica ideal com diversas aplicações potenciais (SCHALLMEY et al., 2004).

Estudos têm destacado que esporos podem atuar como adjuvantes vacinais, promovendo a elevação da resposta humoral após a co-administração com antígenos tanto acoplados ou integrados à superfície de esporos (SOUZA et al, 2014). Alguns antígenos já foram testados com sucesso em esporos de *B. subtilis* como um adjuvante, como os antígenos de *Rotavírus* (LEE et al, 2010), *Helicobacter acinonychis* (HINC et al., 2010), *Escherichia coli* (GOMES et al., 2009; ISTICATO et al, 2013), *Bacillus anthracis* (DUC et al., 2007), HIV (SOUZA et al., 2014), *Clostridium difficile* (POTOCKI et al., 2017), SARS-CoV-2 (SUNG et al., 2022), malária (ALMEIDA et al., 2022), entre outros, indicando este sistema como uma excelente metodologia de apresentação vacinal.

Dado o grande número de possibilidades do uso de esporos de *B. subtilis* como adjuvante vacinal para inúmeras doenças, em conjunto ao fato da proteína MSP3 ser uma das candidatas vacinais para malária mais promissoras, este trabalho tem como objetivo principal avaliar a resposta imune frente ao antígeno MSP3 de *P. falciparum*, contido na superfície de esporos, por vias nasal e oral.

## MÉTODO

### Desenhos do Gene Sintético em pRSET e obtenção da proteína MSP3 recombinante

O desenho do gene sintético de MSP3 foi feito utilizando sequências de aminoácidos conhecidos na literatura, tais sequências foram usadas em estudos anteriores para testes vacinais (THEISEN et al., 2004). Os códons foram otimizados para melhor expressão em *B. subtilis* utilizando o software online disponível no site da empresa *Life Technologies*. A sequência gênica inserida em vetor plasmidial pRSETA foi feita pela empresa Invitrogen. Sítios de enzimas de restrição (*EcoRI*, *BamHI*, *BglI* e *SalI*) foram adicionados nas extremidades das sequências para permitir a subclonagem em vetores de expressão para a cepa *E. coli* cepa *BL21* e *B. subtilis*. Para expressão e purificação da proteína recombinante foi seguido protocolo descrito por SOUZA et al (2014). Sendo assim, bactérias *E. coli* foram transformadas com esta construção e induzidas para

expressão da proteína recombinante utilizando o indutor IPTG 1 mM , por 3 horas a 37 °C em meio LB, contendo os antibióticos cloranfenicol (34 ug/mL) e ampicilina (50 ug/mL). A purificação da proteína foi realizada utilizando a coluna de níquel NTA (QIAGEN), seguindo as orientações descritas pelo fabricante. Para análise da expressão e purificação da proteína MSP3, utilizou-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE 15, seguindo o protocolo de Maniatis et al., (1989). Após a purificação, foi realizada por “immunoblot” (TOWBIN et al,1979) a detecção da presença da cauda de polihistidina, no antígeno recombinante MSP3.

### **Subclonagem em Vetores pGEMcotC e pDG364**

O gene sintético foi submetido a uma digestão enzimática utilizando as enzimas *BglI* e *Sall*. Em seguida, o produto da digestão passou por purificação por eletroforese em gel de agarose, utilizando “kit” comercial para purificação em gel da empresa Jena Bioscience. O resultado foi analisado novamente técnica de eletroforese em gel de agarose e quantificado com o equipamento Biodrop DUO. O fragmento gerado da rMSP3 foi inserido no plasmídeo pGEMCotC (digerido com as mesmas enzimas *BglI* e *Sall*), para que houvesse a fusão da sequência da rMSP3 com a sequência da proteína de superfície CotC de *B. subtilis*, para isto foi utilizada a enzima T4 ligase (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante. O produto da ligação (fragmento rMSP3+pGTCotC) obtido foi transformado em *Escherichia coli*, cepa TOP 10. A seleção das colônias obtidas foi realizada por meio daquelas que apresentaram o fragmento corretamente inserido no vetor. Para tanto, as colônias obtidas foram inoculadas em meio LB enriquecido com Ampicilina (100 mg/mL) para posterior extração plasmidial utilizando o “kit Miniprep” da empresa QIAGEN, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. O produto da extração foi submetido à nova digestão utilizando as enzimas *SpHI* e *Sall*, confirmando a inserção do fragmento de interesse. Em seguida o fragmento gerado na digestão foi purificado como, descrito anteriormente, e a sequência obtida (MSP3+CotC), foi inserida em plasmídeo pDG364, utilizando a enzima T4 ligase (Invitrogen). Com o produto da ligação (rMSP3+CotC+pDG364) foi realizada a transformação em *E. coli* TOP 10 para extração plasmidial e confirmação da presença do inserto por PCR, utilizando par de iniciadores senso e antisenso específicos para o plasmídeo.

### **Transformação em *Bacillus subtilis***

A cepa *B. subtilis* KO7 foi obtida junto ao “Bacillus Genetic Stock Center”. As células competentes foram preparadas segundo protocolo descrito por Harwood, & Cutting (1990). O vetor recombinante (MSP3-CotC + pDG364). A célula foi incubada a 37°C durante 45 min em constante agitação. O cultivo foi plaqueado em meio ágar LB contendo cloranfenicol (0,5 µg/ml), e incubado à 37°C *overnight*. A análise do clone recombinante foi realizada por técnica de PCR, utilizando os iniciadores *rs*s descritos no tópico anterior.

### **Obtenção e quantificação dos esporos recombinantes e não recombinantes de *B. subtilis* (KO7)**

Tanto os esporos recombinantes quanto os esporos não-recombinantes foram obtidos através de método de exaustão de nutrientes (Isticato et al., 2013), onde a bactéria *B. subtilis* KO7 recombinante foi incubada em meio de cultura para esporulação BD *Difco*<sup>TM</sup> Nutrient Broth, sob agitação. A esporulação foi acompanhada por microscopia (objetiva 10x100) até que houvesse uma maior quantidade de esporos. O meio foi centrifugado a 3.000 xg 4°C, e o pellet obtido foi lavado 3 vezes com água ultrapura gelada. Em seguida, os esporos foram ressuspensos em água ultrapura, e após isso, deixados em suspensão durante 16h a 4°C para que então fossem submetidos a processo de inativação por autoclavagem a 121°C durante 45 minutos. Os esporos foram quantificados utilizando *Beads* da BD Trucount<sup>TM</sup> em Citometro de fluxo, de acordo com o manual do fabricante adaptado por nosso grupo de pesquisa.

### ***Western-blot***

A caracterização para confirmação da presença da rMSP3 na superfície dos esporos recombinantes de *B. subtilis*, foi feita por técnica de *Immunoblot* (Towbin et al., 1979). Para isso, os esporos recombinantes, autoclavados e não autoclavados, foram submetidos à separação por eletroforese em SDS-PAGE 15% e transferidos por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose, embebida em tampão Tris-Glicina (0,025 M Tris; Glicina 0,192 M) pH 8,5 e metanol 20%.

O sistema foi alocado em uma cuba específica para eletrotransferência (*Semi-dry system*, *Bio-rad*, Hercules, USA). O sistema foi submetido à uma voltagem constante de 10 V durante 1 hora e 10 minutos. Após ser retirado da cuba a membrana foi armazenada em PBS 1X à 4°C até o momento da revelação.

Posteriormente foi realizada a revelação onde primeiramente a membrana foi bloqueada por 30 minutos utilizando solução de PBS 1X com BSA 3%, após isso a membrana foi lavada com água MiliQ durante 5 minutos e então foi adicionado o anticorpo Anti-rMSP3 purificado, diluído na concentração de 1:100, ficando em incubação durante 1h. A membrana foi então lavada 3 vezes, durante 5 minutos cada, com solução PBS 1X adicionado de Tween 20 a 0,05%. Foi adicionado o anticorpo secundário fluorescente ALEXA flúor 488 *goat anti-mouse* IgG da Life Technologies, diluído 1:5000 e incubado durante 1 hora. A membrana foi lavada novamente com PBS Tween como descrito anteriormente e água, em seguida a membrana foi visualizada em aparelho Invitrogen iBright FL1000 em canal de fluorescência de filtro verde.

### **Produção de anticorpos anti-MSP3 em modelo murino**

As imunizações nasais seguiram protocolo descrito por Santos et al. (2020), enquanto as imunizações orais seguiram protocolo de Dai et al. (2018). Camundongos Balb/C foram divididos em 2 grupos para imunização nasal, contendo 5 camundongos cada, imunizados três vezes (dias:0, 14, 28), havendo coletas de amostra sanguínea nos dias 0, 14, 28 e 42. Os grupos foram: espora recombinante de *B. subtilis* e espora de *B. subtilis* KO7 (controle negativo). Os camundongos imunizados por via oral receberam duas doses (dias: 0 e 14), sendo as coletas sanguíneas realizadas nos dias 0, 14 e 28. Os animais também foram divididos em 2 grupos: espora recombinante de *B. subtilis* recombinante e espora de *B. subtilis* KO7. Cada animal recebeu inóculo por meio de gavagem.

Foi realizado acompanhamento da resposta humoral por 250 dias nos grupos que apresentaram títulos de anticorpos detectados por ELISA. Os experimentos foram realizados no biotério central do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), com número de registro 037/2018 no comitê de ética em utilização animal.

### **Western-blot com soros dos camundongos imunizados**

A caracterização para confirmação da presença de anticorpo anti-rMSP3 nos soros dos camundongos imunizados com os esporos recombinantes de *B. subtilis* e o não recombinante (KO7) foi realizada por técnica de *Immunoblot* (Towbin et al., 1979), como descrita anteriormente. Para isso, o antígeno MSP3 purificado foi submetido à separação por eletroforese em SDS-PAGE 15% e transferido por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose. Como anticorpo primário,

foi adicionado o soro dos camundongos imunizados, na diluição de 1:400, cada soro foi adicionado a uma fita de membrana de nitrocelulose diferente. Como anticorpo secundário, utilizou-se *anti-mouse phosphatase labeled IgG* (KPL), diluído 1:10.000. Para revelação foi utilizado revelador do Kit *Western Breeze*.

### **Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA indireto)**

Uma placa de 96 poços foi sensibilizada com MSP3 recombinante, diluída em tampão carbonato (pH 9,6) e incubada *overnight* a 4°C. No dia seguinte, os poços foram lavados com PBS1X/Tween 0,05% e bloqueados com BSA 2,5%/PBS1X e incubados a 37°C por 1 hora. Os soros dos camundongos foram diluídos 1:400 em BSA 2,5%/PBS1X e adicionados aos poços e incubados a 37°C por 1 h e depois foram lavados 4x com PBS/Tween 0,05%. Foi adicionado aos poços anticorpo secundário anti-IgG mouse total 1:2000, incubado a 37°C por 1 h e os poços foram lavados novamente conforme descrito. A revelação foi realizada com substrato cromogênico adicionado em cada poço por 20 minutos, e interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2M). A D.O. foi determinada por leitor ELISA (Thermo®) utilizando filtro de 450nm. O mesmo procedimento foi realizado para a detecção das subclasses de anticorpos IgG. A detecção das subclasses nos camundongos imunizados foi realizada substituindo o anticorpo secundário por anticorpos isotipo-específicos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 diluídos 1:2000.

### **Análise Estatística**

Como os dados do experimento seguem dependência longitudinal devido as medidas serem retiradas dos camundongos ao longo do tempo, foi utilizado os modelos lineares mistos, ou seja, uma regressão linear com efeito aleatório, sendo o efeito aleatório aplicado no camundongo. O software estatístico utilizado foi o R na versão 4.0.2, usando o Rstudio versão 1.1.4, com pacotes diversos (tidyverse, lme4, sjPlot e hnp). O nível de significância utilizado foi de 0.05. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . O *cutoff* foi calculado considerando as médias dos controles negativos mais duas e três vezes seu desvio padrão. Gráficos de box plot foram preparados para representar a reatividade dos controles negativos.

## **RESULTADOS**

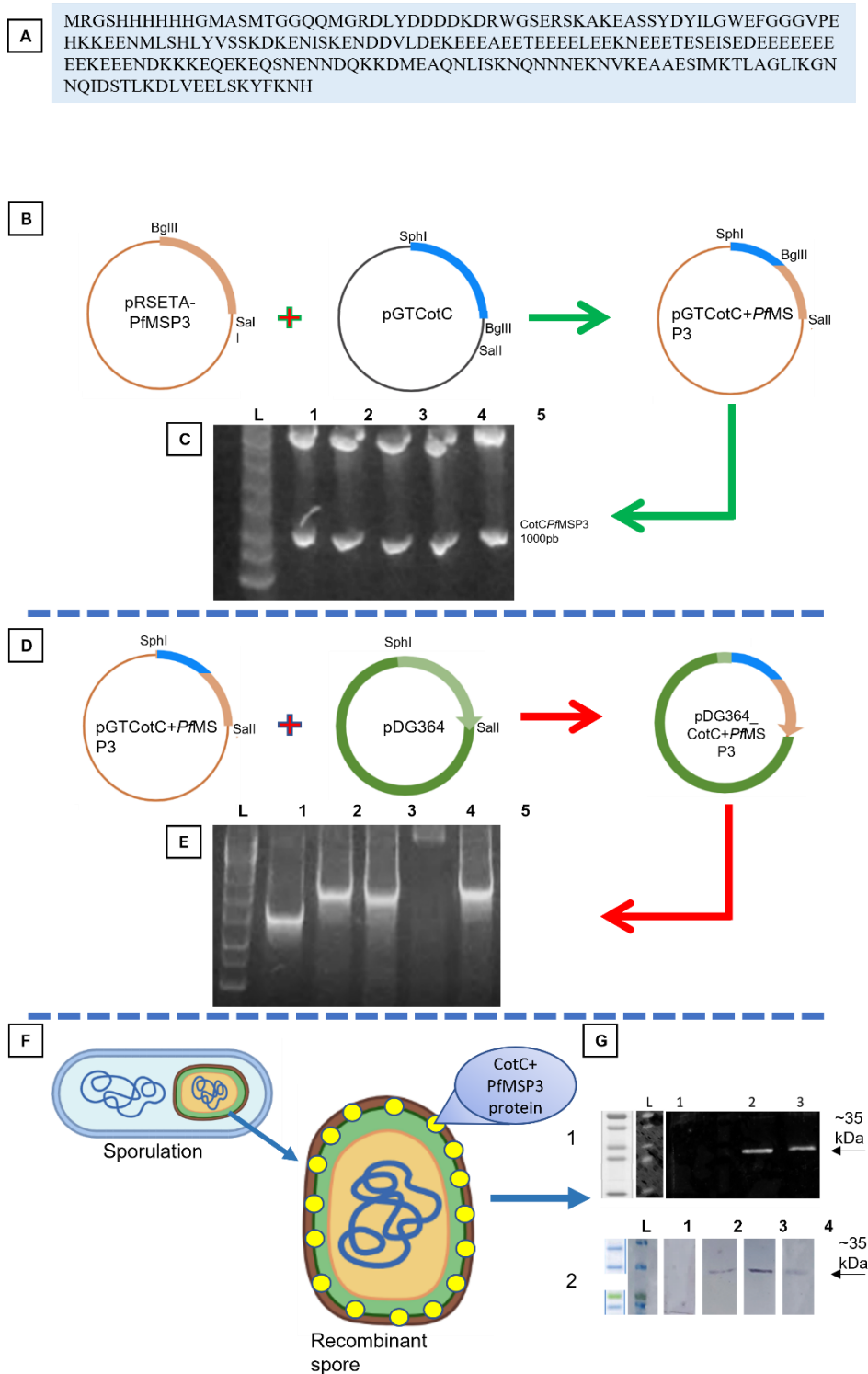
### **Produção de *Bacillus subtilis* recombinante e *Immunoblot* com soro de camundongos imunizados**

**com *BsP*MSP3**

Após a clonagem em *E. coli* (figura 1B), as colônias obtidas foram submetidas à digestão com as enzimas de restrição afim de confirmar a presença do fragmento da rMSP3 que sozinho apresenta tamanho de 550pb, no plasmídeo pGEMCotC. Quando digerido com as enzimas de restrição *Bgl*I e *Sal*I, o fragmento CotCrMSP3 apresentou tamanho molecular de 1000pb (figura 1C, canaletas 1 a 4). Confirmada a fusão pGEMCotC+rMSP3, foi realizado uma subclonagem em plasmídeo pDG364 o qual inseriu a informação genética no genoma de *B. subtilis* (figura 1D). Foi feito um PCR com as colônias obtidas as quais apresentaram fragmento com um perfil molecular de 2000pb (figura 1 E, canaletas 2, 3 e 4), enquanto o plasmídeo sem inserto apresenta um perfil de 1500pb (figura 1E, canaleta 1). Após a transformação de *B. subtilis* com o vetor recombinante pDG364+CotC-rMSP3, uma PCR foi realizada para a confirmação da presença do inserto nessas colônias obtidas onde foi observado que apenas 1 das 3 colônias amplificou para o iniciador utilizado, que amplificou na altura esperada de 2000pb, correspondendo ao apresentado pelo controle (pDG364+CotC-rMSP3). A partir desta colônia, foi realizada a esporulação de *B. subtilis* recombinante e uma análise de *imunoblot* foi feita para confirmar a presença da MSP3 na superfície dos esporos obtidos. Desta forma, foi confirmada a presença da proteína na superfície dos esporos por meio do reconhecimento do anti-rMSP3, apresentando uma banda fluorescente correspondendo a altura de ~ 35 kDa (figura 1G).

Utilizando os esporos recombinantes, camundongos foram imunizados por via nasal e os soros obtidos foram testados quanto a presença de IgG anti-rMSP3 pela técnica *Western-blot*. Nesta etapa foi escolhido um camundongo do grupo imunizado com KO7 (Figura 1G C1). Como observado na figura 1G, os três soros obtidos de camundongos imunizados com *BsP*MSP3 (C2, C3 e C4) apresentaram anticorpo específico capaz de reconhecer a proteína purificada rMSP3 imobilizada na membrana, apresentando tamanho esperado de aproximadamente 35 kDa. Por outro lado o soro obtido do camundongo imunizado com o esporo não recombinante (KO7) não apresentou reconhecimento do antígeno rMSP3, sendo observada a ausência de banda específica.



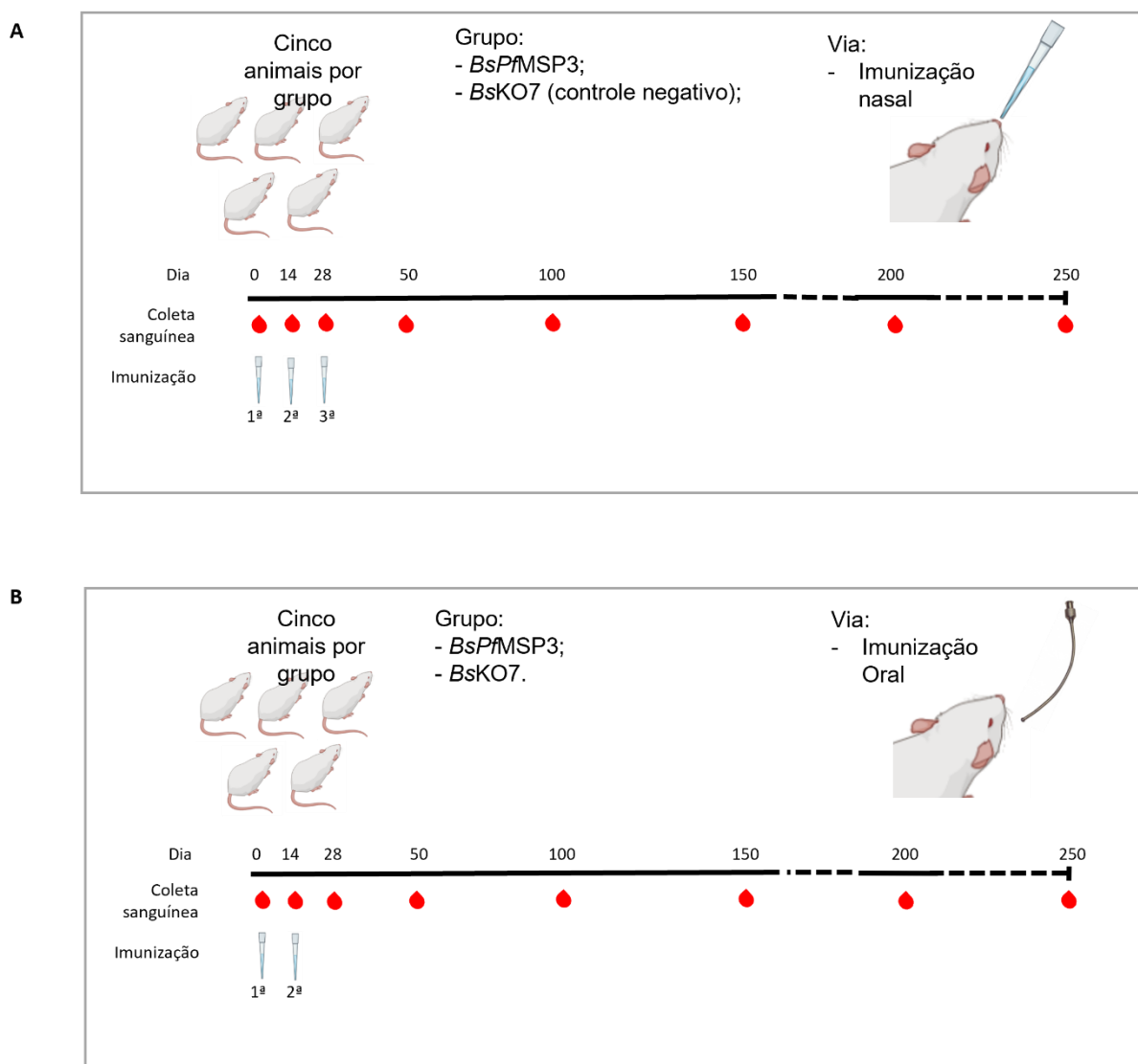


**Figura 1.** Produção de *B. subtilis*, cepa KO7, expressando *rPfMSP3* na superfície de seus esporos. (A) Sequência da proteína *rPfMSP3* utilizada neste trabalho; (B) estratégia de clonagem para fusão da *rPfMSP3* com a proteína CotC de *B. subtilis*; (C) L- Padrão molecular, C1 a C4 - digestão enzimática do plasmídeo obtido das colônias transformadas com pGEMCotC-rMSP3; (D) Estratégia de subclonagem do gene *CotCPfMSP3* no plasmídeo

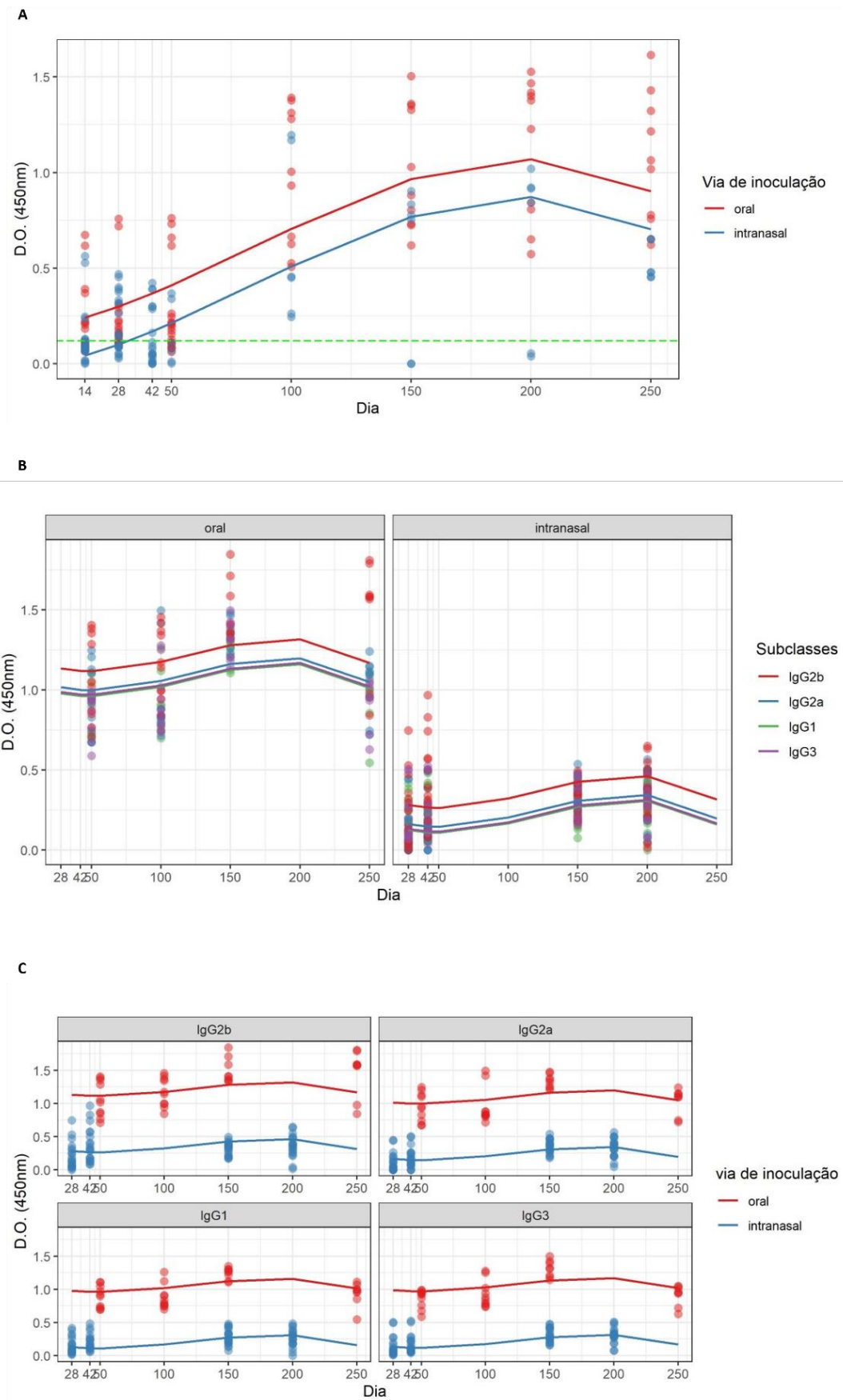
pDG364; (E) L- Padrão Molecular, C1- PCR do plasmídeo pDG364 sem o fragmento, C2, C3 e C4 – PCR colônias contendo o fragmento rMSP3-CotC no plasmídeo pDG364; (F) Representação da localização da proteína recombinante CotCPfMSP3 após expressão na superfície do esporo; (G) Membrana 1: *Immunoblot* fluorescente de esporos recombinantes de *B. subtilis*. L - Marcador molecular para proteína, C1 controle negativo (esporos não recombinantes de *Bacillus subtilis*), C2 - Esporo não autoclavado *BsPfMSP3*. C3 - Esporo autoclavado *BsPfMSP3*; Membrana 2: *Immunoblot* com soro de camundongos imunizados com esporo recombinante e não recombinante. L - marcador molecular para proteína, C1 – Controle negativo (soro de camundongos imunizados com esporos não recombinantes), C2 a C4 – soros de camundongos imunizados com *BsPfMSP3*.

### ***B. subtilis* recombinante foi capaz de induzir por via oral e nasal resposta humoral anti-MSP3 detectável no soro dos animais**

Os camundongos imunizados com *BsPfMSP3*, por via oral, seguindo esquema de imunização anteriormente descrito (figura 2B), produziram níveis de IgG anti-MSP3 sérico maiores, quando comparados aos camundongos imunizados por via nasal (Figura 3A). A concentração de anticorpos no grupo oral ultrapassou a linha de *cutoff* (linha verde pontilhada no gráfico) desde o D14, enquanto o grupo imunizado por via nasal, seguindo esquema de imunização apresentada (figura 2B) só apresentou valor superior ao *cutoff* a partir do D42, sendo observada diferença estatística (p-valor <0.001) com o outro grupo em todo período de acompanhamento. Quanto à análise de subclasses (Figura 3B e 3C), na imunização por via oral, IgG2b apresentou maior reatividade (p-valor IgG2a = IgG1 = IgG3) em todos os dias do experimento (D50, D100, D150, D250). Para imunização por via nasal foi observada a mesma predominância de subclasse, entretanto os níveis de concentração obtidos foram menores, em comparação com a via oral, em todos os dias do experimento (D28, D42, D150, D200).

• **Figura 2.**

**Figura 2.** Representação do esquema de imunização dos camundongos.

• **Figura 3.**

**Figura 3.** Avaliação da resposta humoral contra os esporos recombinantes por inoculações via intranasal e oral em modelo murino. (A) Gráfico da reatividade da resposta humoral IgG total dos grupos *BsPfmSP3* via oral e *BsPfmSP3* via nasal, *BsKO7* (controle negativo), eixo X = dias de coleta sanguínea dos animais estudados, eixo Y densidade óptica (450 nm); (B) Gráfico da reatividade da resposta humoral IgG subclasses 1, 2a, 2b, 3 dos grupos *BsPfmSP3* oral e nasal, eixo X = dias de coleta sanguínea dos animais estudados, eixo Y densidade óptica (450 nm); (C) Gráficos da reatividade de subclasses IgG 1, 2a, 2b e 3 individualmente, eixos X = dias de coleta sanguínea dos animais estudados, eixos Y densidade óptica (450 nm).

## DISCUSSÃO

Desde que foi identificada, muitos estudos vêm utilizando a MSP3 como antígeno para algumas vacinas candidatas contra malária, associando-a a diferentes adjuvantes. Neste estudo, foi descrita pela primeira vez na literatura a aplicação de esporos recombinantes expressando o antígeno *rPfmSP3* em sua superfície, sendo analisada a resposta humoral produzida após imunização por via oral e nasal.

Os resultados observados utilizando anticorpo anti-rMSP3 e anticorpo secundário fluorescente, confirmaram a expressão da proteína rMSP3 na superfície dos esporos de *B. subtilis* fusionada com a proteína CotC, proteína abundante na região da camada externa do revestimento do esporo. Importante destacar que a massa observada da proteína detectada no ensaio corresponde ao valor esperado obtido das análises de bioinformática, não havendo alteração tanto nos esporos autoclavados quanto não autoclavados, indicando que este processo não interfere na integridade da proteína. Esta foi detectada em uma única banda, indicando não ter sofrido processo de clivagem por proteases do hospedeiro bacteriano. Na literatura há relatos tanto de sucesso na expressão íntegra de proteínas heterólogas na superfície dos esporos (Wang et al, 2019; Tang 2016), e de insucesso como descrito por Hinc et al. (2010), que ao expressar a proteína UreA de *Helicobacter acinonychis*, não obtiveram êxito na produção da proteína de forma íntegra em fusão com CotC ou CotG em *B. subtilis* WT. Além disso, em um estudo anterior realizado por esta equipe, também foram observadas clivagens ao expressar a proteína MSP1-19 de *P. falciparum* na superfície de esporos da cepa *B. subtilis* WB800 (dados não publicados). O uso da cepa *B. subtilis* KO7 no presente estudo pode ter contribuído para a obtenção do resultado positivo de expressão da proteína *PfmSP3*, visto que esta possui sete genes de protease nocauteados.

Após as imunizações, foi observada por meio de ELISA e “western blot” que a *BsPfmSP3* foi capaz de gerar uma resposta imune humoral específica contra MSP3. Houve uma maior

produção de anticorpos reativos no grupo imunizado por via oral, quando comparado ao grupo imunizado por via nasal. Lee et al. (2010) relatam um resultado distinto ao imunizarem camundongos com esporos de *B. subtilis* expressando o antígeno TTFC de tétano, havendo uma resposta anti-TTFC mais robusta por via nasal do que por via oral. Os autores relataram ainda que as doses requeridas para desencadear uma resposta sistêmica significativa por via nasal eram consideravelmente menores do que na via oral. Sun et al. (2018) também relataram uma alta produção de anticorpos após imunização oral contra um antígeno de *Clonorchis sinensis* expresso na superfície de esporos de *B. subtilis*, necessitando, contudo, de um maior número de imunizações. Sung et al. (2020) não só observaram uma resposta sistêmica induzida por via oral, ao imunizar camundongos com *B. subtilis* expressando uma proteína de SARS-CoV-2, mas também em um teste piloto realizado em humanos. Além disso a cepa desenvolvida por eles se manteve estável por até 6 meses de armazenamento em temperatura ambiente, destacando a vantagem de uma vacina baseada em esporos também na facilidade de distribuição da mesma em locais remotos.

Desta forma, os resultados observados na imunização oral utilizando *B. subtilis* recombinante corrobora com outros estudos que utilizaram esta ferramenta para imunização pela mesma via, e observaram índices significativos de IgG séricos (Zhou et al., 2015; Zhou et al., 2017; Lega et al., 2016)

Por mais que a resposta de IgG anti-rPfMSP3 tenha sido mais exacerbada por via oral, a resposta observada por via nasal também foi significativa, apresentando títulos de anticorpos semelhantes aos relatados em outros estudos (Wang et al., 2019; Istitato et al., 2013; Lee et al., 2010). Resultados semelhantes foram observados por Song et al. (2012), que obtiveram altos índices de IgG sistêmico ao imunizar camundongos, por via nasal, com esporos de *B. subtilis* inativados por calor carreando a proteína H5N1 do vírus da influenza.

Os títulos de IgG anti-rPfMSP3 se mantiveram crescentes por 200 dias após a última imunização, apresentando leve declínio a partir do D250, indiferente da via de imunização. A reatividade observada neste último dia de coleta indica que a presença de anticorpos no soro dos animais seria detectável ainda por algumas semanas. Almeida et al. (2022) relataram uma reatividade de IgG total crescente até o D150 em camundongos imunizados por via nasal com uma forma recombinante da proteína de superfície de circunsporozoíto de *P. falciparum* (PfCSP) acoplada a esporos de *B. subtilis*. Esta diferença no tempo de ascensão da concentração de

anticorpos observa entre os estudos pode estar relacionado à capacidade imunogênica intrínseca de cada antígeno ou nos métodos de apresentação da proteína abordados.

Com base na reatividade das subclasses de IgG observada nos grupos imunizados com os esporos recombinantes, o perfil de resposta predominante foi Th1, diferindo-se de outros estudos que utilizaram esporos de *B. subtilis* onde foi observada uma resposta balanceada Th1/Th2 (Amuguni et al, 2012; Sun et al., 2018; Barnes et al., 2007). Entretanto, Isticato et al., (2013) também observaram uma resposta imune predominante Th1 ao imunizar camundongos por via nasal com a proteína LTB carregada por esporos de *B. subtilis*. Um resultado de resposta imune Th1 também foi observado por Zhou et al. (2017) ao imunizar camundongos por via oral com esporos de *B. subtilis* expressando o antígeno UreB de *H. pylori*. O padrão de subclasses despertado é de grande importância para ser avaliado, visto que na malária, as subclasses IgG1 e IgG3, que caracterizam uma resposta Th1 em humanos, são as mais observadas durante o combate à infecção, cujas características citofílicas demonstram ajudar no declínio da parasitemia (Nebie et al., 2009; Perez-Mazliah et al., 2015). Em camundongos, as subclasses IgG2a/b estão associadas a uma resposta Th1 (Sisto et al., 2003), pois apresenta função citofílica, demonstrando assim que os esporos recombinantes aqui produzidos podem gerar uma resposta apropriada contra a malária.

## CONCLUSÃO

Portanto foi demonstrado neste estudo que os esporos de *B. subtilis* expressando a proteína PfMSP3 em sua superfície apresentam capacidade imunoestimuladora por via de mucosa, com maior concentração de anticorpos reativos observada na imunização por via oral. A resposta imune manteve-se detectável até D250, apresentando um perfil de resposta Th1. Os resultados aqui apresentados destacam o potencial uso dos esporos de *B. subtilis* como uma estratégia vacinal para malária. Estudos posteriores buscarão entender com maior profundidade a resposta imune celular gerada, além do potencial uso em outros modelos animais.

## REFERÊNCIAS

Greenwood, B. & Targett, G. Do we still need a malaria vaccine?. *Parasite Immunol.* 31, 582–586 (2009).

World Health Organization (WHO). *World Malaria Report 2020.*

- Gilles HM. Historical outline. In: Warrell DA, Gilles HM, editors. *Essential Malariology*. 4th edn Arnold; London: 2002. pp. 1–7
- Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Grass-Masse H, Lepers JP, Ralamboranto I, Tartar A, et al. A novel merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP-3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1994;89:77-80.
- Imam M, Shailja S, Naveen KK, Virander SC. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3: Oligomerization, self-assembly, and heme complex formation. *J. Biol. Chem.* 2013;7:3856–3868.
- Singh S, Soe S, Mejia JP, Roussilhon C, Theisen M, Corradin G, et al. Identification of a conserved region of *Plasmodium falciparum* MSP3 targeted by biologically active antibodies to improve vaccine design. *J. Infect. Dis.* 2004;190:1010-1018.
- Mata, E. et al. Malaria vaccine adjuvants: Latest update and challenges in preclinical and clinical research. *BioMed Research International*, v. 2013, 2013.
- Draper SJ, Sack BK, King CR, Nielsen CM, Rayner JC, Higgins MK, Long CA, Seder RA. Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. *Cell Host Microbe*. 2018 Jul 11;24(1):43-56.
- Lin, Z., Sun, H., Ma, Y., Zhou, X., Jiang, H., Wang, X., . . . Yu, X. (2020). Evaluation of immune response to *Bacillus subtilis* spores expressing *Clonorchis sinensis* serpin3. *Parasitology*, 147 (10), 1080-1087.
- Schallmey, M. et al. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *J. Microbiol*, v. 50, p. 1–17, 2004.
- Dai X, Liu M, Pan K, Yang J. 2018. Exibição de superfície de OmpC de *Salmonella* sorovar Pullorum em esporos de *Bacillus subtilis*. *PLoS One* 13:e0191627.
- Souza RD, Batista MT, Luiz WB, Cavalcante RC, Amorim JH, Bizerra RS, Martins EG, Ferreira LC. *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. *PLoS One*. 2014 Jan 27;9(1):e87454.
- Lee S, Belitsky BR, Brinker JP, Kerstein KO, Brown DW, Clements JD, et al. Development of a *Bacillus subtilis*-based rotavirus vaccine. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(11):1647–55.
- Hinc K, Isticato R, Dembek M, Karczewska J, Iwanicki A, Peszyńska-Sularz G, et al. Expression and display of UreA of *Helicobacter acinonychis* on the surface of *Bacillus subtilis* spores. *Microb Cell Fact*. 2010;9:1–11.



- Gomes PA, Bentancor LV, Pancez JD, Sbrogio-Almeida ME, Palermo MS, Ferreira RC, Ferreira LC. Antibody responses elicited in mice immunized with *Bacillus subtilis* vaccine strains expressing Stx2B subunit of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Braz J Microbiol.* 2009 Apr;40(2):333-8.
- Isticato R, Sirec T, Treppiccione L, Maurano F, De Felice M, Rossi M, Ricca E. Non-recombinant display of the B subunit of the heat labile toxin of *Escherichia coli* on wild type and mutant spores of *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact.* 2013 Oct 29;12:98.
- Duc le H, Hong HA, Atkins HS, Flick-Smith HC, Durrani Z, Rijpkema S, Titball RW, Cutting SM. Immunization against anthrax using *Bacillus subtilis* spores expressing the anthrax protective antigen. *Vaccine.* 2007 Jan 4;25(2):346-55
- Potocki W, Negri A, Peszyńska-Sularz G, Hinc K, Obuchowski M, Iwanicki A. The combination of recombinant and non-recombinant *Bacillus subtilis* spore display technology for presentation of antigen and adjuvant on single spore. *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):151.
- Sung JC-C, Liu Y, Wu KC, Choi MC, Ma CH-Y, Lin J, He EIC, Leung DY-M, Sze ET-P, Hamied YK, Lam DM-K, Kwong KW-Y. Expression of SARS-CoV-2 Spike Protein Receptor Binding Domain on Recombinant *B. subtilis* on Spore Surface: A Potential COVID-19 Oral Vaccine Candidate. *Vacinas.* 2022; 10(1):2.
- de Almeida, M.E.M., Alves, K.C.S., de Vasconcelos, M.G.S. *et al.* *Bacillus subtilis* spores as delivery system for nasal *Plasmodium falciparum* circumsporozoite surface protein immunization in a murine model. *Sci Rep* **12**, 1531 (2022).
- Theisen M, Soe S, Brunstedt K, Follmann F, Bredmose L, Israelsen H, Madsen SM, Druilhe P. A *Plasmodium falciparum* GLURP–MSP3 chimeric protein; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies. *Vaccine*, 2004 Sep; 22 (9-10):1188-98. Maniatis et al., (1989
- Santos FDS, Mazzoli A, Maia AR, Saggese A, Isticato R, Leite F, et al. A probiotic treatment increases the immune response induced by the nasal delivery of spore-adsorbed TTFC. *Microb Cell Fact.* 19 de fevereiro de 2020;19(1).
- Wang, Y. et al. Mucosal and systemic immune responses induced by intranasal immunization of recombinant *Bacillus subtilis* expressing the P97R1, P46 antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biosci. Rep.* 39, 10 (2019).

- Tang Z, Shang M, Chen T, et al. The immunological characteristics and probiotic function of recombinant *Bacillus subtilis* spore expressing *Clonorchis sinensis* cysteine protease. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):648.
- Zhou Z, Gong S, Yang Y, Guan R, Zhou S, Yao S, et al. Expression of *Helicobacter pylori* urease B on the surface of *Bacillus subtilis* spores. *J Med Microbiol*. 2015;64(1):104–10.
- Zhou Z, Dong H, Huang Y, Yao S, Liang B, Xie Y, et al. Recombinant *Bacillus subtilis* spores expressing cholera toxin B subunit and *Helicobacter pylori* urease B confer protection against *H. pylori* in mice. *J Med Microbiol*. 2017; 66(1):83-89.
- Wang, J., Wang, Y., Zhang, E. et al. Intranasal administration with recombinant *Bacillus subtilis* induces strong mucosal immune responses against pseudorabies. *Microb Cell Fact*. 2019 18, 103.
- Łęga T, Weiher P, Obuchowski M, Nidzworski D. Presenting Influenza A M2e Antigen on Recombinant Spores of *Bacillus subtilis*. *PLoS One*. 2016;11(11):e0167225.
- Amuguni H, Lee S, Kerstein K, Brown D, Belitsky B, Herrmann J, Keusch G, Sonenshein A, Tzipori S. Sublingual immunization with an engineered *Bacillus subtilis* strain expressing tetanus toxin fragment C induces systemic and mucosal immune responses in piglets. *Microbes Infect*. 2012 May;14(5):447-56.
- Sun H, Lin Z, Zhao L, et al. *Bacillus subtilis* spore with surface display of paramyosin from *Clonorchis sinensis* potentializes a promising oral vaccine candidate. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):156.
- Barnes AG , Cerovic V , Hobson PS , Klavinskis LS . Esporos de *Bacillus subtilis*: um novo adjuvante de micropartículas que pode instruir uma resposta imune Th1 e Th2 equilibrada a um antígeno específico . *Eur J Immunol* 2007 ; 37 : 1538-47
- Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Tiono, AB; Konate, AT; Gansane A, et al. Humoral and cell-mediated immunity to MSP3 peptides in adults immunized with MSP3 in malaria endemic area, Burkina Faso. *Parasite immunology*. 2009;31(8):474-480.
- Perez-Mazliah, D. & Langhorne, J. CD4 T-cell subsets in malaria: TH1/TH2 revisited. *Front. Immunol*. 5, 671 (2015).

Sisto F, Miluzio A, Leopardi O, Mirra M, Boelaert JR, Taramelli D. Differential cytokine pattern in the spleens and livers of BALB/c mice infected with *Penicillium marneffeii*: protective role of gamma interferon. *Infect Immun.* 2003 Jan;71(1):465-73.

### *III. Discussão Geral*

Os esporos de *B. subtilis* tem se mostrado um método de apresentação de antígenos muito interessante devido às suas inúmeras vantagens, como resistência a altas e baixas temperaturas, alteração de pH, dentre outras situações extremas. Além disso, possuem o status GRAS concedido pelo FDA, o que o torna um microrganismo seguro para utilização em humanos e animais (SCHALLMEY et al., 2004).

Dentre as aplicações dos esporos de *B. subtilis* está seu uso como adjuvante vacinal, principalmente para inoculação por via mucosa (nasal, oral e sublingual) (Amuguni, 2012). Os esporos já foram utilizados em pesquisas para o desenvolvimento de vacinas para doenças como tuberculose (Das, 2016), clonorquíase (Tang, 2016; Sun, 2018), COVID-19 (Sung, 2022), entre outras. Estes estudos observaram uma elevação de resposta humoral após a administração de esporos expressando ou acoplado o antígeno de interesse em sua superfície.

Visto o potencial uso desta ferramenta para finalidade de apresentação de antígenos, foram desenvolvidos neste trabalho esporos recombinantes expressando em sua superfície o antígeno PfMSP3 de *P. falciparum*. No capítulo 1, foi apresentado um artigo de revisão recentemente publicado pelo grupo na revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Neste foi feito um levantamento bibliográfico do estado da arte do antígeno MSP3 como candidato vacinal para malária, descrevendo sua estrutura e imunogenicidade e como o uso de diferentes adjuvantes influenciaram na qualidade desse antígeno como um bom candidato vacinal para malária do estágio eritrocítico. Destacam-se também trabalhos recentes que comprovaram sua eficácia e segurança, viabilizando seu atual estágio de fase II de uma vacina para malária.

No capítulo 2 foi apresentado um artigo com o intuito de obter uma quantificação mais precisa da concentração de esporos que seriam inoculados nos animais do presente estudo. Este trabalho originou-se da dificuldade em quantificar com precisão os esporos, sua integridade e confirmar o acoplamento de antígenos em sua superfície utilizando as técnicas tradicionais descritas na literatura (Isticato et al., 2013). Deste modo, foi realizada uma padronização de uma metodologia que permitisse superar estas dificuldades utilizando a citometria de fluxo. Para isso, foi utilizado brometo de etídio como marcador de DNA em associação com *beads trucount* para contagem celular, a fim de melhorar a acurácia da quantificação (esporos íntegros). Para análise do acoplamento, um anticorpo fluorescente foi ancorado à superfície dos esporos para confirmação, permitindo a avaliação da performance do método de acoplamento e análise de porcentagem de marcação na população dos esporos. A técnica aqui apresentada ainda não foi descrita na literatura.

Uma análise similar foi realizada por Isticato et al. (2019) ao analisar a eficiência da adsorção de proteínas autofluorescentes na superfície dos esporos seguida de avaliação por citometria de fluxo, onde determinaram a quantidade de moléculas fluorescentes e a determinação quantitativa da fluorescência. Contudo, não houve quantificação precisa da quantidade de esporos utilizando o método de *beads trucount*. Karava et al. (2019) utilizaram a leitura por citometria de fluxo para quantificação dos esporos durante a esporulação por meio de coloração fluorescente de ácido nucleico, conseguindo estabelecer as diferentes subpopulações de esporos, ao longo do processo de esporulação. Foi observada uma influência do processo de autoclavagem dos esporos no acoplamento de proteínas à sua superfície, visto que nos esporos autoclavados houve uma maior taxa de acoplamento em relação aos esporos não autoclavados, fato também observado em outro estudo (Song et al., 2012). Portanto, foi apresentado neste artigo uma forma de obtenção de resultados muito mais próximos aos valores reais presentes na amostra do que os obtidos através dos métodos tradicionais, reduzindo a chance de erros na quantificação e, conseqüentemente, nas dosagens a serem inoculadas nos camundongos.

No capítulo 3, foi apresentado o desenvolvimento de esporos de *B. subtilis* expressando com sucesso a proteína *rPfMSP3* em sua superfície. Com esta ferramenta (*BsPfMSP3*) camundongos foram imunizados por via oral e nasal, sendo analisada a resposta humoral desencadeada. Não foi observada reatividade cruzada quando comparados os grupos imunizados com *BsPfMSP3* e imunizados apenas com esporos de *B. subtilis*, confirmando que os títulos de anticorpos foram obtidos devido à presença do antígeno na superfície dos esporos. Nestes resultados foi observado que *BsPfMSP3* inoculada por via oral, induziu níveis de IgG séricos significativos e maiores do que os detectados no grupo imunizado por via nasal. Lee et al. (2010) ao imunizar camundongos com esporos expressando o antígeno TTFC de tétano, observaram uma maior produção de IgG por via nasal do que em camundongos imunizados por via oral. Por sua vez, Oh et al. (2020) ao imunizar camundongos com *B. subtilis* recombinante expressando um antígeno de *Bacillus anthracis* na superfície dos esporos, não observaram diferença significativa entre os grupos imunizados por via oral, nasal e sublingual, demonstrando em todas as vias títulos significativos de anticorpos contra o antígeno. Um estudo de Zhou et al., (2015; 2017), ao imunizar camundongos por via oral, também observaram níveis altos de IgG séricos contra o antígeno UreB de *H. pylori* expresso na superfície de esporos recombinantes de *B. subtilis*, além de uma atividade protetora desses anticorpos contra *H. pylori*. Outro grupo de pesquisa testou o uso de esporos

recombinantes por via oral, desta vez expressando antígeno M2 de Influenza e observaram igualmente níveis de IgG anti-M2, desse modo reforçando a alta imunogenicidade de antígenos recombinado a esporos de *B. subtilis* (Zhao et al., 2014). Wang et al. (2019), relataram indução de altas taxas de IgG sérico ao imunizar camundongos por via intranasal com esporos recombinantes de *B. subtilis* carregando o antígeno do vírus da pseudo-raiva. Logo, a capacidade de indução de uma resposta sérica através de imunização por via mucosa parece estar intimamente ligada à imunogenicidade do antígeno trabalhado.

Este grupo de pesquisa foi o primeiro a acompanhar os níveis de anticorpos após estimulação por via mucosa usando esporos de *B. subtilis* em modelo murino. Em um trabalho anterior desenvolvido por Almeida et al. (2022), foi utilizada a proteína PfCSP acoplada a esporos de *B. subtilis* para estimular a resposta humoral por via nasal. Os resultados obtidos indicaram altos títulos de anticorpos detectáveis contra o antígeno PfCSP, esses anticorpos permanecendo circulantes por 250 dias. No presente estudo, também foi possível observar altos títulos de anticorpos contra o antígeno PfMSP3 e uma resposta prolongada detectável até o D250, com uma leve diminuição dos níveis de IgG após esse período. Ambos apresentaram resultados semelhantes considerando que neste trabalho foram aplicados esporos recombinantes, enquanto em Almeida et al. (2022) o antígeno foi apresentado de forma quimicamente acoplada à superfície dos esporos, demonstrando o grande potencial de esporos de *B. subtilis* como adjuvante para a via mucosa.

A estratégia de imunização utilizada no presente artigo discutido no capítulo 3, gerou níveis de IgG séricos prevalentes de subclasse IgG2b, com níveis baixos e estatisticamente iguais de IgG1, IgG2a e IgG3. Desta forma, conclui-se que a abordagem adotada de apresentação do antígeno PfMSP3 expresso na superfície dos esporos induziu um perfil de resposta Th1, uma vez que as subclasses IgG 2a/b estão associadas ao perfil Th1 (Sisto et al., 2003). Apesar da maioria dos estudos que utilizaram *B. subtilis* indicarem uma resposta mais balanceada Th1/Th2 (Auguni et al., 2012; Tang et al., 2016; Wang et al., 2019), outros estudos corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, como a pesquisa realizada por Zhou et al., (2017) ao imunizar camundongos por via oral com esporos recombinantes de *B. subtilis* expressando um antígeno da clonorrúfase observaram um perfil de resposta Th1, assim como Mauriello et al. (2007) que imunizaram camundongos por via oral com esporos recombinantes de *B. subtilis* como estrutura carreadora de um antígeno do tétano, onde observaram o mesmo perfil de resposta. Segundo Auguni et al. (2012) o uso de esporos parece ser uma metodologia que depende do antígeno com o qual está sendo

administrado para determinar o tipo de resposta a ser desencadeada, sugerindo uma explicação para variação dos perfis de resposta Th1, Th2 ou balanceada descritos na literatura.

Como relatado no capítulo 1, a resposta requerida para o combate à infecção por malária é uma resposta citofílica. Visto que a resposta de perfil Th1 se caracteriza citofílica em modelo murino, os esporos recombinantes de *Bacillus subtilis* podem ser uma alternativa promissora para uma vacina de mucosa contra malária.

Neste trabalho, camundongos foram imunizados por via oral e nasal apenas com rPfMSP3 e a proteína rPfMSP3 acoplada quimicamente à superfície dos esporos. De forma inesperada, quando somente a proteína foi inoculada por via oral, ela induziu uma resposta de IgG sérico elevada (anexos 1 e 3). Acreditava-se que, devido a proteína ter sido inoculada de forma intragástrica diretamente no estômago, sem uso de adjuvante ou qualquer molécula que a protegesse das proteases presentes nessa região, esta seria facilmente degradada, impossibilitando que a proteína fosse apresentada ao sistema imune. É sugerido que pelo fato de ter sido inoculada junto com leite desnatado, pode ter possibilitado a mesma de ser apresentada na sua forma íntegra. Quanto aos grupos imunizados por via nasal apenas com a rPfMSP3 e a proteína acoplada quimicamente à superfície dos esporos, assim como no trabalho de Almeida et al. (2022), houve uma produção de altos títulos de IgG específico contra o antígeno. Entretanto, neste trabalho não houve diferença estatística entre os grupos (anexo 3). Desta forma, pretende-se investigar como a proteína isolada é capaz de despertar títulos tão significativos de IgG específico, sem uso de adjuvantes e por via mucosa.

Trabalhos futuros buscarão compreender melhor como ocorre esta resposta do antígeno PfMSP3 associado a esporos de *B. subtilis*, principalmente a resposta imune celular. Teste de inibição de invasão *in vitro* também deverão ser realizados a fim de observar a capacidade dos anticorpos gerados após as imunizações em inibir a invasão de *P. falciparum* às células sanguíneas. A metodologia aqui desenvolvida poderá ser aplicada a outras doenças de humanos ou animais, que necessitem de uma resposta imunológica tanto mucosa quanto sistêmica, abrindo com isso a possibilidade de parcerias com outros grupos de pesquisa. A análise de viabilidade patentária do probiótico recombinante aqui desenvolvido está sendo analisada pelo setor de gestão tecnológica da Fiocruz (Gestec/NIT-FIOCRUZ), podendo após este processo a tecnologia ser ofertada para instituições públicas/privadas e empresas da área de biotecnologia. Os *royalties* gerados poderão fomentar o desenvolvimento de novas pesquisas.





## *IV. Conclusão*

A partir deste estudo conclui-se que:

- Com base na revisão de literatura realizada, constata-se que a proteína MSP3 é uma candidata vacinal promissora do estágio eritrocítico de *P. falciparum*, devido à alta imunogenicidade observada nos ensaios clínicos publicados;
- O teste de citometria de fluxo para leitura de esporos duplamente marcados, junto com a aplicação de *Beads trucount*, demonstrou ser uma técnica que aumenta a acurácia da quantificação de esporos;
- A expressão da proteína recombinante rPfMSP3 em *B. subtilis* foi obtida com sucesso, sendo expressa de forma íntegra na superfície dos esporos;
- Os esporos recombinantes de *B. subtilis* foram capazes de gerar uma resposta imune humoral significativa em camundongos imunizados por via oral e nasal, sendo a resposta induzida por via oral superior. Os níveis de IgG foram detectáveis até o D250.
- As análises de subclasses de IgG revelaram que o perfil de resposta predominante gerado pelo BsMSP3, foi Th1 nas imunizações tanto por via oral quanto por via nasal.

## *V. REFERÊNCIAS*

Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, et al. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;364:1411–20

Amuguni, H & Tzipori, S. Bacillus subtilis: a temperature resistant and needle free delivery system of immunogens. *Hum Vaccin Immunother*. 2012;8, 979-86.Da

Aps L, Tavares MB, Rozenfeld JHK, Lamy MT, Ferreira LCS, Diniz MO. Bacterial spores as particulate carriers for gene gun delivery of plasmid DNA. *J Biotechnol*. 2016;228:58-66

Aziz MA, Midha S, Waheed SM, Bhatnagar R. Oral vaccines: New needs, new possibilities. *BioEssays*. 2007;29(6):591–604.

Bastola R, Noh G, Keum T, Bashyal S, Seo JE, Choi J, et al. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Archives of Pharmacal Research*. 2017;40(11):1238–48.

Bélar S, Issifou S, Hounkpatin AB, Schaumburg F, Ngoa UA, Esen M, et al. A randomized controlled phase Ib trial of the malaria vaccine candidate GMZ2 in African children. *PLoS One*. 2011;6(7):e22525.

Besteiro S., Dubremetz J.F., Lebrun M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell. Microbiol*. 2011; 13: 797-805

Brasil M da S. Dia mundial de luta contra a malária. *Boletim Epidemiológico*. 2021;52(15):1–27.

Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health*. 2017;5(10):e1038–46.

Brasil. Ministério da Saúde. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília, Distrito Federal. 2010.

Carter, R.; Mendis, K. N. Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. *Clin. Microbiol. Rev*, v. 15, n. 4, p. 564–594, 2002.

Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010;33(4):492–503. 104.

Cowman AF, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *The Journal of cell biology*. 2012;198(6):961–71.

Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 2016;167(3):610–24.

Dai X, Liu M, Pan K, Yang J. Exibição de superfície de OmpC de Salmonella sorovar Pullorum em esporos de Bacillus subtilis . *PLoS One*. 2018;13:e0191627.

Das K, Thomas T, Garnica O DS. Recombinant *Bacillus subtilis* spores for the delivery of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B-CFP10 secretory antigens. *Tuberculosis*. 2016;101:S18-S27.

Dassah S, Adu B, Sirima SB, Mordmüller B, Ngoa UA, Atuguba F, et al. Extended follow-up of children in a phase2b trial of the GMZ2 malaria vaccine. *Vaccine*. 2021;39(31):4314-4319.

De Almeida, M.E.M., Alves, K.C.S., de Vasconcelos, M.G.S. *et al.* *Bacillus subtilis* spores as delivery system for nasal *Plasmodium falciparum* circumsporozoite surface protein immunization in a murine model. *Sci Rep*. 2022; **12**, 1531.

Drew DR, Beeson JG. PfrH5 as a candidate vaccine for Plasmodium falciparum malaria. *Cell Press*. 2015;31:87-88.

Driks, A. Maximum shields: The assembly and function of the bacterial spore coat *Trends in Microbiology*, 2002.

Druilhe P, Spertini F, Soesoe D, Corradin G, Mejia P, Singh S, et al. A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill Plasmodium falciparum. *PLoS Med*. 2005;2:e344.

Duc le H, Hong HA, Atkins HS, Flick-Smith HC, Durrani Z, Rijpkema S, Titball RW, Cutting SM. Immunization against anthrax using Bacillus subtilis spores expressing the anthrax protective antigen. *Vaccine*. 2007 Jan 4;25(2):346-55

Duc, L. H.; Cutting, S. M. Bacterial spores as heat stable vaccine vehicles. *Expert opinion on biological therapy*. 2003 v. 3, n. February, p. 1263–1270.

Esen M, Kremsner PG, Schleucher R, Gässler M, Imoukhuede EB, Imbault N, et al. Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. *Vaccine*. 2009;27(49):6862-8.

Fundação de vigilância sanitária do Amazonas. Disponível em <http://www.saude.am.gov.br/>. Acesso em 01 de março de 2022.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2002;419:498–511.

Gellin, B. G.; Salisbury, D. M. Communicating the role and value of vaccine adjuvants.

Gilles HM. Historical outline. In: Warrell DA, Gilles HM, editors. *Essential Malariology*. 4th edn Arnold; London: 2002. pp. 1–7.

Girard MP, Reed ZH, Friede M, Kieny MP, et al. A review of human vaccine research and development: malaria. *Vaccine*. 2007;25:1567-1580

Godfrey, A. & Alsharif, R. Rapid enumeration of viable spores by flow cytometry. Patent US20040023319A1. 2003 United States.

Gomes PA, Bentancor LV, Pancez JD, Sbrogio-Almeida ME, Palermo MS, Ferreira RC, Ferreira LC. Antibody responses elicited in mice immunized with *Bacillus subtilis* vaccine strains expressing Stx2B subunit of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Braz J Microbiol*. 2009 Apr;40(2):333-8.

Grau, G. E. R., & Craig, A. G. Cerebral malaria pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. *Future Microbiology*. 2012; 7(2), 291–302.

Greenwood, B. & Targett, G. Do we still need a malaria vaccine?. *Parasite Immunol*. 31, 582–586 (2009).

Grignard L, Shah S, Chua TH, William T, Drakeley CJ, Fornace KM. Natural Human Infections With *Plasmodium cynomolgi* and Other Malaria Species in an Elimination Setting in Sabah, Malaysia. *Journal of Infectious Diseases*. 2019;220(12):1946–9. 13.

Health I, Malaria RB. Severe malaria. *Tropical medicine & international health: TM & IH*. 2014;19 Suppl 1:7–131.

Hinc K, Isticato R, Dembek M, Karczewska J, Iwanicki A, Peszyńska-Sularz G, De Felice M, Obuchowski M, Ricca E. Expression and display of UreA of *Helicobacter acinonychis* on the surface of *Bacillus subtilis* spores. *Microb Cell Fact*. 2010 Jan 18;9:2.

Huber W, Felger I, Matile H, Lipps HJ, Steiger S, Beck HP. Limited sequence polymorphism in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3. *Mol Biochem Parasitol*. 1997;87:231–234.

Imam M, Shailja S, Naveen KK, Virander SC. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3: Oligomerization, self-assembly, and heme complex formation. *J. Biol. Chem*. 2013;7:3856–3868.

Israeli, E. et al. Adjuvants and autoimmunity. *Lupus*, v. 18, n. 13, p. 1217–1225, 1 nov.

Isticato R, Cangiano G, Tran HT, Ciabattini A, Medagliani D, Oggioni MR, et al. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*. 2001;183(21):6294–301.

Isticato R, Sirec T, Treppiccione L, Maurano F, De Felice M, Rossi M, Ricca E. Non-recombinant display of the B subunit of the heat labile toxin of *Escherichia coli* on wild type and mutant spores of *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact*. 2013 Oct 29;12:98.

Isticato, R.; Ricca, E. Spore Surface Display. *Microbiol Spectr*. v. 2(5), 2014.

Karava, M., Bracharz, F., Kabisch, J. Quantification and isolation of *Bacillus subtilis* spores using cell sorting and automated gating. *PLoS ONE*. 2019; 14 (7), e021989.

Kim, J.; Schumann, W. Display of proteins on *Bacillus subtilis* endospores. *Cell. Mol. Life Sci*. 2009; 66, 3127–3136.



Lee S, Belitsky BR, Brinker JP, Kerstein KO, Brown DW, Clements JD, Keusch T, Tzipori S, Sonenshein AL, Herrmann JE. Development of a *Bacillus subtilis*-based rotavirus vaccine. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Nov;17(11):1647-55.

Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. 2010;28(3):C25–C36. 109.

Lin, Z., Sun, H., Ma, Y., Zhou, X., Jiang, H., Wang, X., et al. Evaluation of immune response to *Bacillus subtilis* spores expressing *Clonorchis sinensis* serpin3. *Parasitology*. 2020;147 (10), 1080-1087

Lusingu JP, Gesase S, Msham S, Francis F, Lemnge M, Seth M, et al. Satisfactory safety and immunogenicity of MSP3 malaria vaccine candidate in Tanzanian children aged 12–24 months. *Malar J*. 2009;8:163.

Marciani DJ. Elucidating the Mechanisms of Action of Saponin-Derived Adjuvants. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2018;39(6):573–85.

Mata, E. et al. Malaria vaccine adjuvants: Latest update and challenges in preclinical and clinical research. *BioMed Research International*. 2013;v. 2013.

Mauriello EM, Cangiano G, Maurano F, Saggese V, de Felice M et al. Germination-independent induction of cellular immune response by *Bacillus subtilis* spores displaying the C fragment of the tetanus toxin. *Vaccine* 2007; 25:788–793

Miller A , Lider O , Roberts AB , Sporn MB , Weiner HL . As células T supressoras geradas pela tolerância oral à proteína básica da mielina suprimem as respostas imunes in vitro e in vivo pela liberação do fator de crescimento transformador beta após o desencadeamento específico do antígeno . *Proc Natl Acad Sci EUA* 1992 ; 89 : 421-5

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. pathogenic basis of malaria, Miller 2002. 2002;415(February):673–80.

Mordmüller B, Szywon K, Greutelaers B, Esen M, Mewono L, Treut C, et al. Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate GMZ2 in malaria-exposed, adult individuals from Lambaréné, Gabon. *Vaccine*. 2010;28(41):6698-703.

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

Mwong M, Madmanee W, Suwannasin K, Kunasol C, Peto TJ, Tripura R, et al. Asymptomatic natural human infections with the simian malaria parasites *plasmodium 88 cynomolgi* and *plasmodium knowlesi*. *Journal of Infectious Diseases*. 2019;219(5):695– 702.

Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Grass-Masse H, Lepers JP, Ralamboranto I, Tartar A, et al. A novel merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* (MSP-3) identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1994;89:77-80.

Oh Y, Kim JA, Kim CH, Choi SK, Pan JG. *Bacillus subtilis* spore vaccines displaying protective antigen induce functional antibodies and protective potency. *BMC Vet Res*. 2020;16(1):259.

Olotu A, Moris P, Mwacharo J, Vekemans J, Kimani D, Janssens M, et al. Circumsporozoite-specific T cell responses in children vaccinated with RTS,S/AS01 E and protection against *P falciparum* clinical malaria. *PLoS One*. 2011;6(10).

Organização Mundial de Saúde, 2019. World Malaria Report. disponível em: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2019](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2019).

Pan, J. G.; Kim, E. J.; Yun, C. H. *Bacillus* spore display. *Trends in Biotechnology*. 2012;v. 30.

Pashine, A., Valiante, N. M., & Ulmer, J. B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nature medicine*. 2005;11(4), S63-S68.

Phyo AP, Ashley EA, Anderson TJC, Bozdech Z, Carrara VI, Sriprawat K, et al. Declining Efficacy of Artemisinin Combination Therapy Against *P. Falciparum* Malaria on the Thai-Myanmar Border (2003-2013): The Role of Parasite Genetic Factors. *Clin Infect Dis*. 2016;63(6):784–91.

Potocki W, Negri A, Peszyńska-Sularz G, Hinc K, Obuchowski M, Iwanicki A. The combination of recombinant and non-recombinant *Bacillus subtilis* spore display technology for presentation of antigen and adjuvant on single spore. *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):151.

Schallmey, M. et al. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *J. Microbiol.* 2004; v. 50, p. 1–17.

Shah, R. R., Hassett, K. J., & Brito, L. A. Overview of Vaccine Adjuvants: Introduction, History, and Current Status. *Vaccine Adjuvants.* 2016;1–13.

Singh S, Soe S, Mejia JP, Roussillon C, Theisen M, Corradin G, et al. Identification of a conserved region of *Plasmodium falciparum* MSP3 targeted by biologically active antibodies to improve vaccine design. *J Infect Dis.* 2004;190: 1010–1018.

Sirima SB, Tiono AB, Ouédraogo A, Diarra A, Ouédraogo AL, Yaro JB, et al. Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate MSP3 long synthetic peptide in 12-24 months-old Burkinabe children. *PLoS One.* 2009;4(10):e7549. Erratum in: *PLoS One.* 2010;5(4).

Sisto F, Miluzio A, Leopardi O, Mirra M, Boelaert JR, Taramelli D. Differential cytokine pattern in the spleens and livers of BALB/c mice infected with *Penicillium marneffeii*: protective role of gamma interferon. *Infect Immun.* 2003 Jan;71(1):465-73.

Souza RD, Batista MT, Luiz WB, Cavalcante RC, Amorim JH, Bizerra RS, Martins EG, Ferreira LC. *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. *PLoS One.* 2014 Jan 27;9(1):e87454.

Song, M., Hong, H. A., Huang, J. M., Colenutt, C., Khang, D. D., Nguyen, T. V., et al. Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. *Vaccine.* 2012; 30 (22), 3266-77.

Srinivasan, P., Baldeviano, G.C., Miura, K. et al. A malaria vaccine protects Aotus monkeys against virulent *Plasmodium falciparum* infection. *npj Vaccines.* 2017;2(1):1-10.

Sturm, A, Amino, R, van de, SC, Regen, T, Retzlaff, S, Rennenberg, A, Krueger, A, Pollok, JM, Menard, R, and Heussler V. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006;313:1287–90.

Sun H, Lin Z, Zhao L, et al. *Bacillus subtilis* spore with surface display of paramyosin from *Clonorchis sinensis* potentializes a promising oral vaccine candidate. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):156.

Sung JC-C, Liu Y, Wu KC, Choi MC, Ma CH-Y, Lin J, He EIC, Leung DY-M, Sze ET-P, Hamied YK, Lam DM-K, Kwong KW-Y. Expression of SARS-CoV-2 Spike Protein Receptor Binding Domain on Recombinant *B. subtilis* on Spore Surface: A Potential COVID-19 Oral Vaccine Candidate. *Vacinas* . 2022; 10(1):2.

Takala SL, Plowe CV. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming ‘vaccine resistant malaria’ *Parasite Immunol*. 2009;31:560–73.

Tang Z, Shang M, Chen T, et al. The immunological characteristics and probiotic function of recombinant *Bacillus subtilis* spore expressing *Clonorchis sinensis* cysteine protease. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):648.

Tavares J, Formaglio P, Thiberge S, Mordelet E, van Rooijen N, Medvinsky A, et al. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(5):905–15.

Theisen M, Soe S, Brunstedt K, Follmann F, Bredmose L, Israelsen H, Madsen SM, Druilhe P. A *Plasmodium falciparum* GLURP–MSP3 chimeric protein; expression in *Lactococcus lactis*, immunogenicity and induction of biologically active antibodies. *Vaccine*, 2004 Sep; 22 (9-10):1188-98.

Thera MA, Plowe CV. Vaccines for malaria: how close are we?. *Annu Rev Med*. 2012;63:345-357.

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

Van der Pluijm RW, Imwong M, Chau NH, Hoa NT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, et al. Determinants of dihydroartemisinin–piperaquine treatment failure in *Plasmodium falciparum*

malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study. *Lancet Infect Dis*. 2019;19:952-961.

Wang, H., Wang, Y., Yang R. Recent progress in *Bacillus subtilis* spore-surface display: concept, progress, and future. *Applied Microbiology and Biotechnolog*. 2017;v. 101, n. 3, p. 933–949.

Wang, J., Wang, Y., Zhang, E. et al. Intranasal administration with recombinant *Bacillus subtilis* induces strong mucosal immune responses against pseudorabies. *Microb Cell Fact*. 2019 18, 103.

Wassmer, S. C. et al. Investigating the pathogenesis of severe malaria: A multidisciplinary and cross-geographical approach. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2015;v. 93, p. 42–56.

Weiss GE, Gilson PR, Taechalertpaisarn T, Tham WH, de Jong NWM, et al. Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes. *PLOS Pathogens*. 2015 11(2): e1004670

White MT, Bejon P, Olotu A, Griffin JT, Riley EM, Kester KE, et al. The Relationship between RTS,S Vaccine-Induced Antibodies, CD4+ T Cell Responses and Protection against *Plasmodium falciparum* Infection. *PLoS One*. 2013;8(4).

WHO. Guidelines for malaria - 16 february. 2021; Available from: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme>

WHO. WHO recommends groundbreaking malaria vaccine for children at risk. World Health Organization. 2021.

Witkowski B, Lelièvre J, Barragán MJL, Laurent V, Su XZ, Berry A, et al. Increased tolerance to artemisinin in *plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(5):1872–7.

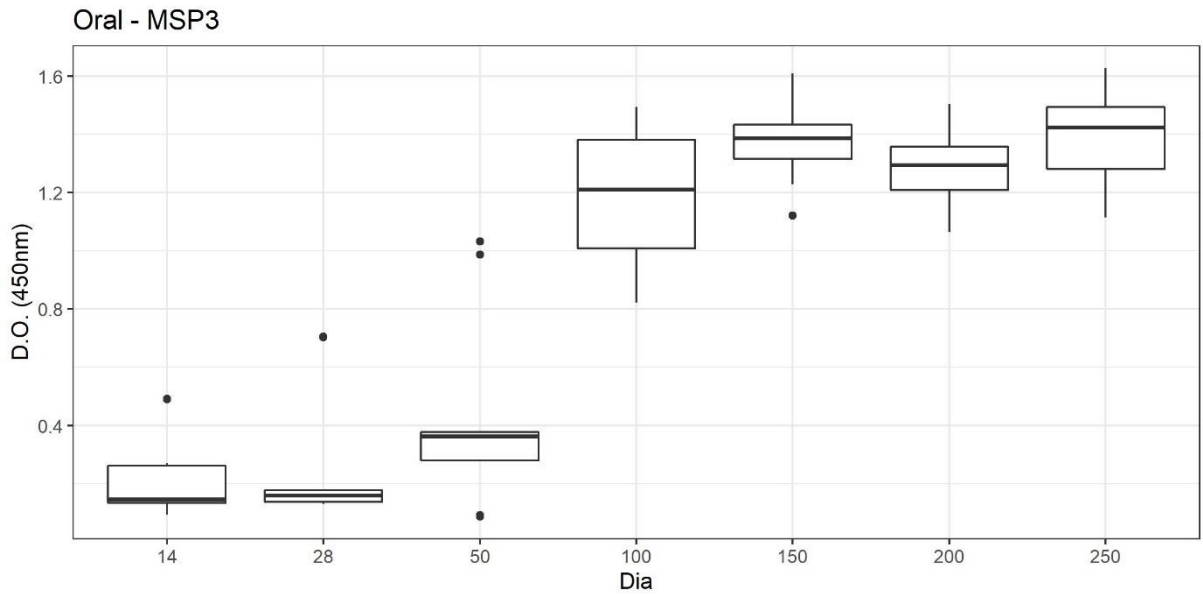
Yamauchi, L. M. et al. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cellular microbiology*. 2007; v. 9, n. 5, p. 1215–22.

Zhao G, Miao Y, Guo Y, et al. Development of a heat-stable and orally delivered recombinant M2e-expressing *B. subtilis* spore-based influenza vaccine. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(12):3649-3658.

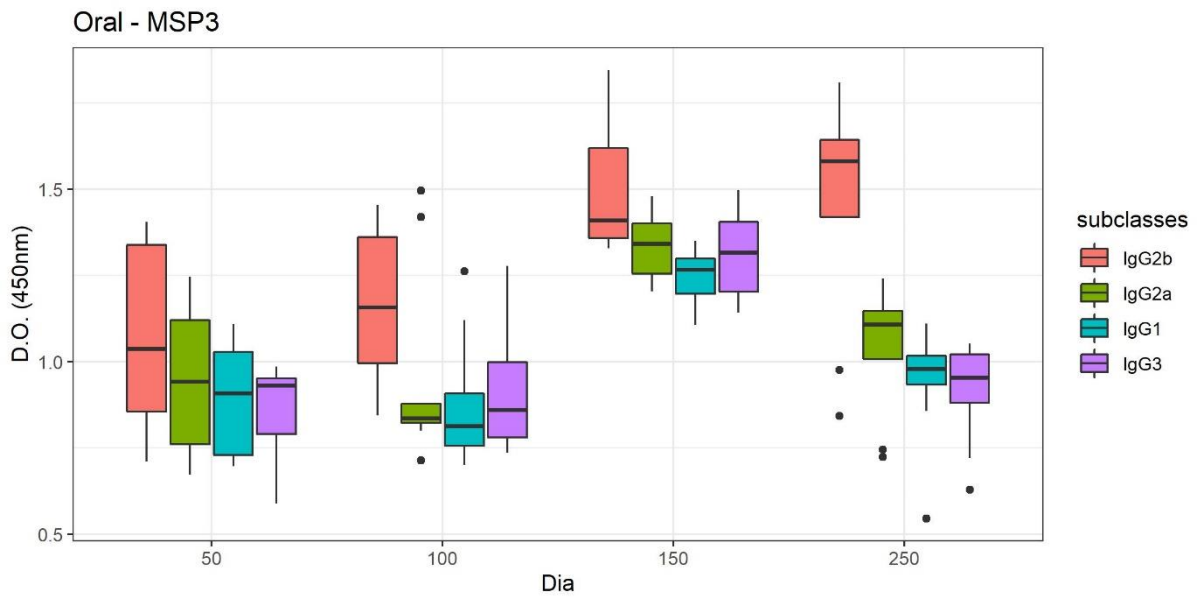
Zhou Z, Dong H, Huang Y, Yao S, Liang B, Xie Y, et al. Recombinant *Bacillus subtilis* spores expressing cholera toxin B subunit and *Helicobacter pylori* urease B confer protection against *H. pylori* in mice. *J Med Microbiol.* 2017; 66(1):83-89.

Zhou Z, Gong S, Yang Y, Guan R, Zhou S, Yao S, et al. Expression of *Helicobacter pylori* urease B on the surface of *Bacillus subtilis* spores. *J Med Microbiol.* 2015;64(1):104–10.

## *VI. ANEXOS*

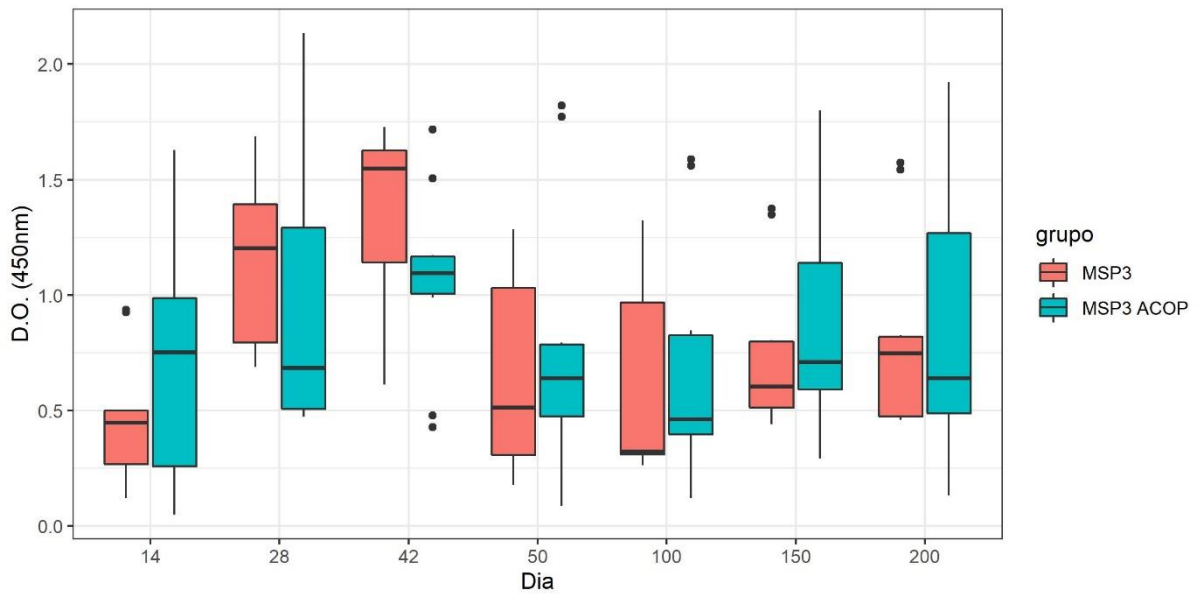


**Anexo 1.** Avaliação da resposta humoral *PfMSP3* por inoculações via oral em modelo murino. (A) Gráfico da reatividade da resposta humoral IgG total do grupo *PfMSP3* Via oral, eixo X = dias de coleta sanguínea dos animais estudados, eixo Y densidade óptica (450 nm).

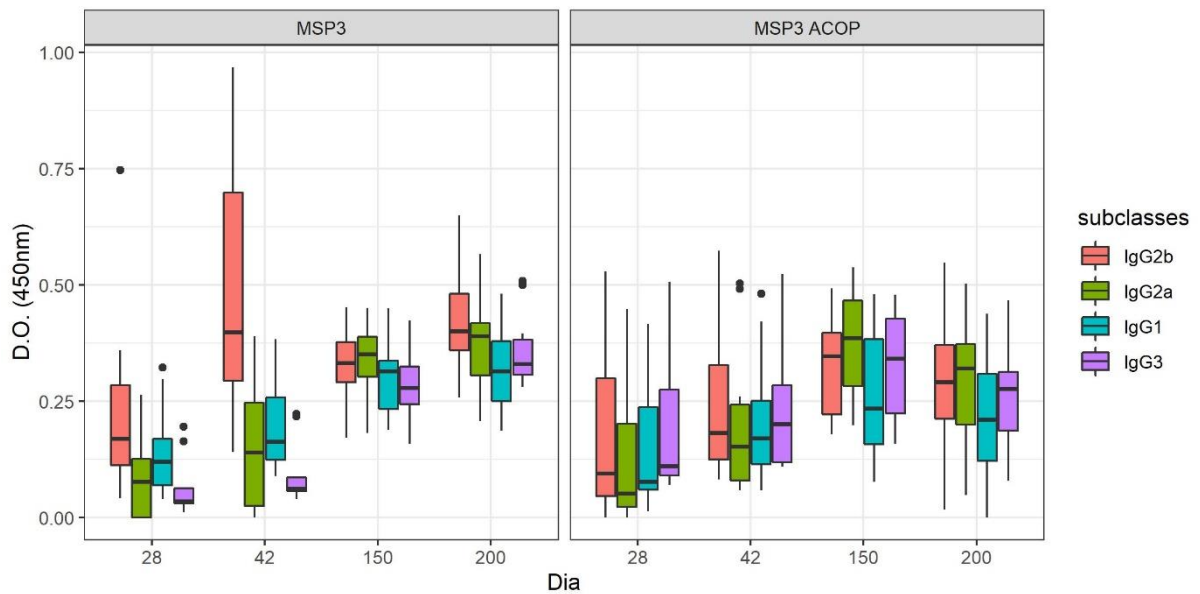


**Anexo 2.** Gráfico da reatividade da resposta humoral IgG subclasses 1, 2a, 2b, 3 do grupo *PfMSP3* oral, eixo X = dias de coleta sanguínea dos animais estudados, eixo Y densidade óptica (450 nm).





**Anexo 3.** Avaliação da resposta humoral contra os *PfMSP3* acoplada à superfície dos esporos de *B. subtilis* e *PfMSP3* por inoculação via intranasal em modelo murino, eixo X = dias de coleta sanguínea dos animais estudados, eixo Y densidade óptica (450 nm).



**Anexo 4.** Gráfico da reatividade da resposta humoral IgG subclasses 1, 2a, 2b, 3 dos grupos rMSP3 Acoplada aos esporos e *PfMSP3* inoculados por via nasal, eixo X = dias de coleta sanguínea dos animais estudados, eixo Y densidade óptica (450 nm).