



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE  
JOAQUIM VENÂNCIO

**Caio César de Araujo Evaristo**

**ESTUDO DA MALÁRIA: BIOLOGIA, IMUNOLOGIA DOS PARASITOS E  
ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS COM PRIMATAS NÃO HUMANOS**

**Rio de Janeiro  
2022**

**Caio César de Araujo Evaristo**

**ESTUDO DA MALÁRIA: BIOLOGIA, IMUNOLOGIA DOS PARASITOS E  
ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS COM PRIMATAS NÃO HUMANOS**

**Monografia apresentada à Escola Politécnica de  
Saúde Joaquim Venâncio – Fundação Oswaldo  
Cruz (EPSJV-Fiocruz) como requisito parcial  
para aprovação no curso de Análises Clínicas.**

**Orientador(a):** Etelcia Moraes Molinaro.

**Coorientador:** Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro.

**Rio de Janeiro  
2022**

## LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e prevenção de Doenças);
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais;
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal;
CONEP	Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos;
CSP	<i>Circumsporozoite Protein</i> (Proteína Circumesporozoíta);
EMA	<i>European Medicines Agency</i> ;
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i> ;
GSK	GlaxoSmithKline;
HBSAG	<i>Hepatitis B Surface Antigen</i> (Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B);
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana);
HRP-2	<i>Histidine Rich Protein 2</i> (Proteína 2 Rica em Histidina);
IFN- $\gamma$	<i>Interferon gama</i> ;
IGG	Imunoglobulina do tpo G;
IL	Interleucina;
LSA-3	<i>Liver Stage Antigen 3</i> (Antígeno 3 de Estágio Hepático);

MC	Malária Cerebral;
MG	Malária Grave;
MSP	<i>Merozoite Surface Protein</i> (Proteína de Superfície de Merozoíto);
OMS	Organização Mundial de Saúde;
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase);
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1</i> (Proteína 1 de Membrana Eritrocitária de <i>Plasmodium falciparum</i> );
PfRAP-1	<i>Plasmodium falciparum rhoptry associated protein 1</i> (Proteína 1 Associada ao Rhoptry de <i>Plasmodium falciparum</i> );
PfRAP-2	<i>Plasmodium falciparum rhoptry associated protein 2</i> (Proteína 2 Associada ao Rhoptry de <i>Plasmodium falciparum</i> );
PMIF	<i>Plasmodium Macrophage Migration Inhibitory Factor</i> (Fator de Inibição da Migração de Macrófagos);
PNH	Primatas Não Humanos;
SMA	Anemia Malárica Grave;
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i> (Livre de Patógeno Específico);
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i> (Fator de Crescimento Transformador Beta);
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral);
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde).

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> Ciclo biológico <i>Plasmodium</i> .....	13
<b>FIGURA 2</b> Fêmea de <i>Anopheles quadrinnulatus</i> em repasto sanguíneo .....	16
<b>FIGURA 3</b> Trofozoítas de <i>P. falciparum</i> em esfregaço sanguíneo .....	23
<b>FIGURA 4</b> Comparativo entre CSP ( <i>P. falciparum</i> ) e RTS, S.....	36
<b>FIGURA 5</b> Fotografia de Chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> ).....	48
<b>FIGURA 6</b> Fotografia de Rhesus ( <i>Macaca mulatta</i> ).....	49
<b>FIGURA 7</b> Fotografia de Macaco-da-Noite ( <i>Aotus infulatus</i> ).....	51
<b>FIGURA 8</b> Fotografia de Macaco de Cheiro ( <i>Saimiri sciureus</i> ).....	51

## **LISTA DE QUADROS**

<b>QUADRO 1</b> Comparativo de protozoários infectantes ao homem .....	19
--	----

## RESUMO

Pensar em malária envolve compreender a realidade de centenas de milhões de adoecidos e centenas de milhares de mortos anualmente. O incentivo no desenvolvimento e produção de tecnologia capaz de gerar resposta imune eficaz, possibilitando a diminuição dos números de infectados e mortos, pode servir como instrumento de melhoria na qualidade de vida e de saúde, principalmente em territórios com menos recursos, como o continente africano. A geração de tecnologia de imunobiológicos com eficácia, segurança e imunogenicidade tem como parte indissociável a experimentação prévia em animais. Para isso, se faz indispensável a utilização de modelos primatas, escolhidos de maneira criteriosa de acordo com suas características, em ensaios de experimentação, de forma a manter a ética e a segurança no desenvolvimento científico e tecnológico com potencial benefício para humanos. A utilização de Primatas Não Humanos em pesquisa biomédica é peça chave no processo de experimentação, posto que são os animais de maior proximidade filogenética com a espécie humana.

Palavras-Chave: Primatas Não Humanos; Malária; *Plasmodium falciparum*; Vacinas.

## ABSTRACT

Thinking about malaria involves understanding the reality of several hundred million people sickened and hundred thousand of deaths annually. The incentive in the development and production of technology capable of generating effective immune response, allowing the reduction of the numbers of infected and dead, can serve as a tool for improving the quality of life and health, especially in territories with lower resources, such as the African continent. The generation of immunobiological technology with efficacy, safety and immunogenicity has as an indissociable part the experiments conducted on animals. For this, it is essential to use primate models, carefully chosen according to their characteristics, in experimental trials, in order to maintain ethics and safety in scientific and technological development with potential benefit to humans. The use of non-human primates in biomedical research is a key element in the experimentation process, since they are the animals with the greatest phylogenetic proximity to the human species.

Key- Words: Non Human Primates; Malaria; *Plasmodium falciparum*; Vaccines.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 A MALÁRIA .....</b>	<b>12</b>
2.1 Ciclo biológico .....	12
2.2 Agente etiológico.....	17
2.2.1 Agentes etiológicos de malária humana não <i>falciparum</i> .....	19
2.2.2 Agentes etiológicos de malária zoonótica.....	20
2.2.3 <i>Plasmodium falciparum</i> .....	22
2.3 Imunologia da malária .....	27
<b>3 CANDIDATAS VACINAIS PARA MALÁRIA .....</b>	<b>30</b>
3.1 Os princípios do desenvolvimento vacinal .....	33
3.2 Molécula vacinal antimalárica RTS, S e R21/MM .....	34
<b>4 A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL E BIOMODELOS.....</b>	<b>38</b>
<b>5 O MODELO ANIMAL PRIMATA NÃO HUMANO.....</b>	<b>44</b>
5.1 Apes (Grandes Primatas) .....	46
5.2 Primatas do Velho Mundo .....	47
5.3 Primatas do Novo Mundo .....	47
<b>6 PRIMATAS NÃO HUMANOS NA PESQUISA EM MALÁRIA .....</b>	<b>48</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>54</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A malária é uma das mais importantes causas de mortes humanas. Sua forte incidência, principalmente em países localizados nos trópicos, a torna relevante no contexto epidemiológico mundial (THEEL; PRITT, 2021).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2021, 400.000 pessoas, aproximadamente, evoluíram para a morte através de complicações dessa infecção, em especial no Continente Africano. Dessas, mais de 260.000 eram crianças. Nesse sentido, percebe-se a vulnerabilidade desse público por dois fatores: a precariedade no acesso à saúde (nas regiões subsaarianas africanas) e a imaturidade do sistema imunológico. Em 2013, a malária foi causadora de cerca de 413.000 mortes ao redor do mundo. Em 2018, 405.000 pessoas evoluíram à morte. Esses dados indicam a tendência de estabilidade no número de óbitos pela doença nos últimos anos. Tomar *et al* (2015) também trazem dados alarmantes, em que mais de 1,2 bilhão de pessoas se encontram em áreas de proliferação de mosquitos do gênero *Anopheles*.

A partir da análise das infecções que, em caráter alarmante, se fazem presente em áreas subdesenvolvidas e periféricas, é possível afirmar que as doenças parasitárias destacam-se com relação às diversas outras como importantes causas de adoecimento populacional.

As doenças transmissíveis guardam estreita relação com as condições sociais e econômicas de indivíduos e populações representando, portanto, um indicador sensível de seus níveis de saúde e de vida. Deste modo, a realização de estudos (...) das doenças infecciosas e parasitárias (...) podem aportar importantes subsídios para a orientação de intervenções (...) (TEIXEIRA, *et al*, p.492, 2002).

Doenças parasitárias, como a malária, se instalam em ambientes de pobreza e medíocre acesso a insumos de saúde e bens de consumo. Elas são, portanto, patologias ligadas às condições de vida da população. Por essa razão, regiões de precário, acesso a saneamento básico, alimentação e saúde, como a região dos trópicos, apresentam altos índices de infecções parasitárias (NEVES, 2016).

Em regiões endêmicas, a malária apresenta alguns grupos de risco, os principais são: crianças abaixo dos cinco anos de idade e indivíduos imunossuprimidos, como transplantados ou portadores de doenças autoimunes usuários de medicações imunossupressoras. Mulheres grávidas também despontam como parte do grupo de risco para casos graves da infecção. Isso ocorre por esses grupos apresentarem déficits imunológicos importantes para processos de resposta imunológica e inflamatória. O que permite que infecções maláricas, em especial as advindas de *Plasmodium falciparum*, desenvolvam quadros graves em seu hospedeiro (OKAFOR; FINNIGAN, 2021).

As discussões que envolvem a gravidade clínica da malária, assim como seus componentes imunológicos, são extensas, primeiramente devido à não aquisição de imunidade plena capaz de impedir o estabelecimento da infecção, mesmo em indivíduos de área endêmica. O que é observado é a aquisição parcial de imunidade, em indivíduos expostos repetidas vezes ao parasito, em altas quantidades de inóculo. Com a aquisição de imunidade parcial, o organismo adquire certa proteção contra malária grave (CROMPTON *et al.*, 2014).

A imunidade parcial diminui a probabilidade de quadros graves e mortes pela doença. Indivíduos que cresceram nessas regiões e não vieram à óbito por complicações em casos graves na infância, normalmente, adquirem esse tipo de imunidade na idade adulta. Entretanto, áreas de transmissão reduzida não possibilitam o desenvolvimento desse tipo de resistência. Os indivíduos moradores de regiões de baixa transmissão parasitária continuam suscetíveis a quadros graves da doença em qualquer estágio de vida (FOWKES; BOEUF; BEESON, 2016). Outra importante questão é a crescente notificação de cepas parasitárias resistentes ao tratamento com antimaláricos. Já se sabe que *P. falciparum*, por exemplo, não responde mais ao tratamento com administração de cloroquina (ARIEY *et al.*, 2014).

Além disso, os vetores anofelinos também estão desenvolvendo resistência aos inseticidas piretróides utilizados nas regiões de alta transmissão. Esse tipo de inseticida é o mais utilizado nos mosquiteiros impregnados (RANSON; LISSENDEN, 2016). Já são observadas também mudanças comportamentais nos vetores, de forma que os horários clássicos de alimentação presentes na literatura, em determinados casos, não representam a realidade do nicho ecológico dos anofelinos (KILLEEN, 2014).

Tendo esse quadro alarmante em vista, pode-se dizer que a discussão acerca de ferramentas que possibilitem novas estratégias de combate a infecções deve ser uma das prioridades da comunidade científica da área da malariologia. Os esforços para o desenvolvimento de candidatos vacinais são essenciais nesse sentido, portanto..

Dentro da lógica de testagem de moléculas candidatas, a utilização de modelos animais em ensaios de experimentação *in vivo* é indispensável, sendo uma estratégia de obtenção de dados comparativos acerca dos efeitos de uma tecnologia. Os modelos Primatas Não Humanos são os melhores para esse tipo de ensaio, já que são os animais que mais se assemelham ao homem morfológica e geneticamente (ANDRADE, 2002; ANDRADE *et al.* 2010).

A partir dessa discussão inicial, o presente trabalho tem por objetivo realizar um levantamento da literatura científica, a partir de livros técnicos e artigos científicos encontrados em plataformas como pubmed e scielo, acerca da utilização de modelos primatas como biomodelos em ensaios experimentais de testagem de candidatas vacinais para malária, realizando então uma breve revisão do estado da arte dessa temática.

## 2 A MALÁRIA

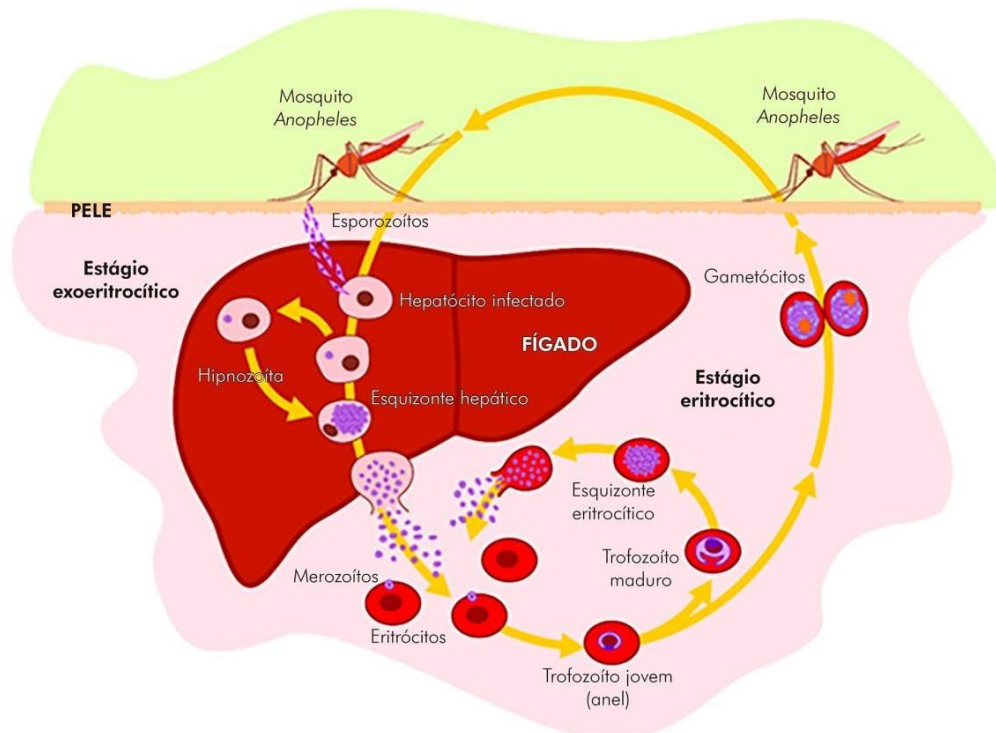
As primeiras descrições de quadros de malária são milenares. Escritos chineses, datados de 2700 a.C, foram encontrados contendo descrições de uma doença com características semelhantes ao observado em casos de malária nos dias atuais. Também foram encontrados textos em placas de barro da Mesopotâmia, de aproximadamente 2000 a.C, com indícios semelhantes. Na Grécia Antiga, com Hipócrates, também foram feitas descrições de febres maláricas em indivíduos moradores de áreas próximas a pântanos, com baço aumentado (COX *et al*, 2010).

Por cerca de 2500 anos a teoria vigente acerca da ocorrência da doença dizia que sua transmissão estava diretamente ligada aos miasmas presentes em regiões pantanosas. Com isso, o termo “mau aire” foi a primeira denominação dada à doença. Essa definição significa, em italiano, “ar ruim”, uma referência direta à teoria dos miasmas (COX *et al*, 2010).

A consolidação de conhecimento acerca da doença, porém, se inicia com a descoberta do agente etiológico por Charles Louis Alphonse Laveran, no ano de 1880, na França. 17 anos depois, em 1897, Ronald Ross descreve a transmissão da doença por mosquitos, inicialmente, em casos de malária aviária. Posteriormente, entre os anos 1898 e 1900, a confirmação de mosquitos como vetores também da malária humana foi feita pelos italianos Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Angelo Celli, Camillo Golgi e Ettore Marchiafava (COX *et al*, 2010).

### 2.1 Ciclo biológico

O ciclo evolutivo de *Plasmodium* spp. em hospedeiro vertebrado se encontra representado na figura 1. A figura apresenta também a formação de hipnozoítos, forma característica de malária *vivax*, mas não de malária *falciparum* (VARO; CHACCOUR; BASSAT, 2020).

**FIGURA 1- Ciclo biológico de *Plasmodium*.**

1-O ciclo de desenvolvimento tem início com a inoculação de esporozoítos através do repasto sanguíneo de fêmeas anofelinas. Essa forma percorre a corrente sanguínea e chega até o fígado, onde invade hepatócitos. 2-No interior da célula, ocorre a formação de trofozoítos jovens, que originam formas trofozoítos maduras e, através da esquizogonia hepática, formam esquizontes, contendo merozoítos. 3- O esquizonte lisa a célula hospedeira inicial, liberando merozoítos na corrente sanguínea. A depender da espécie, pode ocorrer a formação de formas de latência, denominadas de hipnozoítos, que reiniciarão o ciclo hepático após algumas semanas ou meses, como na infecção causada pelos *P. vivax* e *P. ovale*. 4- Os merozoítos, na corrente sanguínea, invadirão eritrócitos, formando novamente trofozoítos. Os trofozoítos eritrocitários se alimentam da hemoglobina intracelular, formando esquizontes repletos de merozoítos. 5- Ocorrerá lise do eritrócito, liberando novas formas merozoítos na corrente, preparadas para uma nova invasão de eritrócitos e um novo ciclo sanguíneo. 6- Após alguns ciclos sanguíneos, alguns merozoítos não formarão esquizontes, mas formas sexuadas de desenvolvimento, o microgameta (masculino) e macrogameta (feminino), que em repasto sanguíneo darão origem ao ciclo esporogônico em hospedeiro invertebrado anofelino. 7- Nessa etapa ocorrem diversos processos de maturação celular, originando novas formas esporozoítas, prontas para a infecção de hospedeiro vertebrado, fechando o ciclo de desenvolvimento do parasito.

Fonte: Figura de LIMA-JUNIOR; PRATT-RICCIO, 2016.

O ciclo biológico se inicia com a inoculação dos esporozoítos na derme do hospedeiro intermediário vertebrado, através do repasto sanguíneo das fêmeas anofelinas infectantes. Essas formas adentram a corrente sanguínea e têm acesso ao fígado, ao atravessarem a barreira sinusoidal. No órgão, os esporozoítos podem invadir os hepatócitos e se estabelecer na célula, formando o vacúolo parasitóforo. Nas células, o parasito se diferencia em trofozoíto

e realiza um processo reprodutivo conhecido como esquizogonia, dando origem a esquizontes hepáticos, ou esquizontes teciduais primários. Essas formas do parasito, morfologicamente, se assemelham a sacolas repletas de núcleos (ALVARADO; FERREIRA, 1982). Essa etapa de maturação leva cerca de uma ou duas semanas para se completar, dependendo da espécie de protozoário contraído pelo hospedeiro. O *P. falciparum*, assim como o *P. vivax*, leva aproximadamente uma semana para concluir a etapa exoeritrocítica de maturação. Já o *P. malariae* leva cerca de duas semanas (BRAGA; FONTES, 2004).

Um detalhe importante a ser destacado é que nem todo inóculo parasitário entregue pelo mosquito consegue atingir os capilares e adentrar a corrente sanguínea. Uma parte desse inóculo pode ser drenado pelos vasos linfáticos, atingindo o linfonodo mais próximo. Nesse local, parte da população parasitária é degradada, porém, alguns parasitos conseguem desenvolver sua forma exoeritrocítica nesse local, interagindo com o sistema imune do hospedeiro. É importante que estudos futuros investiguem o potencial da entrega de antígenos via vasos linfáticos, já que essa via de apresentação poderia atuar de duas formas: auxiliando no processo de articulação de resposta imune ou estimulando tolerância aos antígenos parasitários da forma esporozoíta (AMINO *et al*, 2006).

O esporozoíta, alcançando o fígado, preencherá o espaço intracelular do hepatócito durante a formação do esquizonte, a ponto de rompê-lo, liberando novas unidades celulares do protozoário, então denominadas de merozoítos. Os merozoítos são liberados na corrente sanguínea em vesículas compostas por fragmentos da membrana plasmática da última célula parasitada. Essa vesícula é chamada de merossoma (MENARD *et al*, 2013).

Pensando no desenvolvimento de quadros clinicopatológicos, tem-se que são as formas de interação estabelecidas pelo parasito com seu respectivo hospedeiro, que serão importantes para a expressão de sintomatologia. A fase hepática da doença é assintomática, enquanto o estágio de desenvolvimento em eritrócitos é responsável pelo desenvolvimento da sintomatologia clássica da doença. Um dos possíveis agravamentos clínicos derivados da fase eritrocitária, por exemplo, é a anóxia<sup>1</sup> (NEVES, 2016) decorrentes do obstrução dos vasos capilares por hemácias parasitadas aderidas ao endotélio e entre elas.

No fígado, algumas espécies são, ainda, capazes de gerar formas latentes de desenvolvimento, chamadas de hipnozoítas. Essa característica é clássica de *P. vivax* (GARCIA, 2010). O tempo de latência pode variar de semanas a meses, provocando diversas recaídas no quadro clínico de malária, mesmo após um único repasto sanguíneo por anofelino infectado (WHITE, IMWONG, 2012).

---

<sup>1</sup> Elevado consumo de oxigênio dos eritrócitos infectados (NEVES,2016)

Após a chegada dos merozoítos na corrente sanguínea, essas formas invadirão os eritrócitos, dando origem novamente a trofozoítos, e realizarão a esquizogonia sanguínea. Um esquizonte pode originar um total de oito a 32 novos merozoítos, após o rompimento do eritrócito. Os merozoítos liberados, por apresentarem tropismo pela mesma população celular, perpetuarão essa fase de desenvolvimento parasitário (ALVARADO; FERREIRA, 1982).

No interior dos eritrócitos o parasito se comporta de maneira “amebóide”, com configuração morfológica composta por núcleo, protoplasma<sup>2</sup> e por um pigmento que, após técnicas de coloração, como a coloração de Romanowsky, pode ser utilizado para a detecção e diagnóstico da infecção via microscopia de campo claro. A esse pigmento dá-se o nome de pigmento malárico ou hemozoína (ALVARADO; FERREIRA, 1982).

O merozoíto, para realizar a invasão, interage com diversos receptores de membrana dos eritrócitos, assim como libera substâncias químicas auxiliares (BURNS *et al*, 2019). Os receptores do parasito podem ser alvos moleculares promissores para o desenvolvimento de drogas antimaláricas ou para o desenvolvimento de um imunobiológico. A partir de interações de baixa intensidade realizadas pelo MSP (merozoite surface protein, de tradução literal, proteína de superfície do merozoíto) com proteínas de membrana do eritrócito, ocorrerá a reorientação do merozoíto. A reorientação consiste na mudança de posição do parasito, que então aponta seu complexo apical para a membrana do eritrócito. A partir de duas organelas presentes no complexo apical, róptrias e micronemas, substâncias são secretadas para o auxílio no processo de invasão celular (GRUSZCZYK *et al*, 2018).

O fenômeno que ocorre entre essas duas organelas é chave para a interação irreversível entre parasito e célula hospedeira. Os micronemas irão secretar a *microneme-secreted apical membrane antigen-1*<sup>3</sup> (AMA-1), que se ligará a um complexo protéico presente na superfície de róptrias, formando um cordão de ligação entre as duas células (protozoário e hospedeiro). Uma cascata de ligações entre proteínas de membrana da célula invasora e hospedeira ocorre e esses fenômenos podem ser estudados visando a caracterização de alvos em estratégias de combate terapêuticas e vacinais à infecção (HORUK, *et al*, 1993).

Em um dado momento do ciclo eritrocitário, os merozoítos podem originar, ainda, através da esquizogonia, células sexuadas, então denominadas gametócitos (masculino e feminino). O *P. vivax*, tende a gerar gametócitos mais rapidamente do que outras espécies. Essa particularidade do ciclo dessa espécie torna o seu controle mais difícil por que, na prática, isso quer dizer que o sangue de um paciente com malária *vivax* é infeccioso para mosquitos, garantindo a manutenção da transmissão da malária, desde os primeiros momentos em que o paciente tem parasitos no sangue circulante. Formas sexuadas de *P. vivax*. podem

<sup>2</sup> Conteúdo intracelular (ALVARADO; FERREIRO, 1982)

<sup>3</sup> Antígeno de membrana apical 1 secretado por micronema, em tradução literal.

ser observadas em cerca de três dias após o início do ciclo eritrocítico (BOUSEMA; DRAKELEY, 2011).

Em infecções por *P. falciparum*, formas sexuadas geralmente começam a surgir entre 10 dias e 14 dias após o início da etapa assexuada no sangue (BUTTERWORTH *et al*, 2013). Os gametócitos compõem a fase inicial do ciclo sexuado de desenvolvimento do parasito, que será realizado no interior de mosquitos *Anopheles* após um repasto sanguíneo (ALVARADO; FERREIRA, 1982).

Já no organismo do mosquito, o gameta masculino sofrerá um processo de exflagelação, subdividindo-se em oito microgametas. Paralelamente, os gametócitos femininos, ou macrogametas, amadurecerão e transformar-se-ão em gametas. A fusão de gametas masculino e feminino dará origem ao zigoto, que se transformará em oocineto em uma janela de 12h a 18h. O oocineto é uma forma do parasito com boa mobilidade, conseguindo penetrar o epitélio do estômago do mosquito, atravessando-o e originando o oocisto. Essa forma liberará milhares de esporozoítos em cerca de 10 a 12 dias. Os esporozoítos então migrarão para as glândulas salivares do mosquito, e serão inoculados no hospedeiro vertebrado após um novo repasto sanguíneo (TOSTA; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2013).

**FIGURA 2- Fêmea de *Anopheles quadrinnulatus* em repasto sanguíneo**



FONTE: James Gathanv/CDC, 2014.

Com relação a um quadro clínico da doença, a anemia malárica grave (SMA) pode ser observada em infecção por qualquer espécie de plasmódio (WHITE, 2018), sendo desenvolvido principalmente em regiões de alta transmissão parasitária. É um quadro fortemente associado às infecções do público infantil (MARALELDA *et al*, 2017) e corresponde a um dos maiores agravantes letais do desenvolvimento da doença (VARO; CHACCOUR; BASSAT, 2020).

## 2.2 Agente etiológico

Os protozoários do gênero *Plasmodium* spp., do filo Apicomplexa, somam mais de 150 espécies, todas elas causadores de infecções maláricas em répteis, aves e mamíferos. Cerca de 82 espécies são encontradas em parasitismo em répteis e aves, enquanto 22 espécies são encontradas em primatas não humanos (PNH) (STRICKLAND, 1984). Em humanos, encontram-se, majoritariamente, cinco espécies causadoras de malária humana: *P. falciparum* (WELCH, 1897), *Plasmodium malariae* (LAVERAN, 1881), *Plasmodium vivax* (GRASSI; FELETTI, 1890), *Plasmodium ovale walikeri* e *Plasmodium ovale curtisi* (STEPHENS, 1922; RANDAL; SEIDEL, 1985).

Uma sexta espécie causadora de malária em humanos surgiu, em 2004, em países asiáticos, mais especificamente na Malásia, em Borneo, na Tailândia, em Myanmar e nas Filipinas: o *Plasmodium knowlesi*. Essa espécie já era observada nas populações asiáticas de macacos cynomolgus porém diversos casos de infecção humana naquele ano foram confirmados (JONGWUTIWES *et al*, 2004; SINGH *et al*, 2004). Esse episódio expôs a capacidade zoonótica dos parasitos causadores de malária em símios, sinalizando a possibilidade de novas espécies de *Plasmodium* spp., normalmente não encontradas em humanos, atravessarem a barreira das espécies. Atualmente, essa espécie é a principal causadora de malária humana na região, ocasionando em muitos casos quadros letais.

A discussão ligada a quantos e quais são os parasitos causadores de malária humana se estende até os dias atuais. Desde a ascensão do *P. knowlesi*, em fenômeno zoonótico, investigações em outras regiões do globo ganharam força para realizar o mapeamento dos casos de malária, com o objetivo de detectar possíveis novos surtos zoonóticos.

Em 2014, houve a descrição de malária zoonótica eventual, também na Ásia, por *Plasmodium cynomolgi*. No Brasil, a malária era endêmica de quase todo o território nacional, porém, há mais de 50 anos a doença foi eliminada de praticamente todo o território da região extra Amazônica, se concentrando então no norte do país (SIQUEIRA *et al*, 2016). No entanto, após o início de um surto de infecções maláricas na região sudeste do país, no estado do Rio de Janeiro, entre os anos 2015 e 2016, o Laboratório de Pesquisa em Malária do Instituto Oswaldo Cruz iniciou esforços para compreender os possíveis fatores envolvidos nesse episódio, caracterizando a ocorrência de um surto de caráter zoonótico (BRASIL *et al*, 2017).

A média de casos anuais de malária no território de Mata Atlântica no Rio de Janeiro era de cerca de cinco casos, entre a série histórica de 2006 até 2016, embora em 2015 o número de casos absolutos saltou para 33 casos, seguido de 16 casos em 2016. A partir de uma abordagem de sequenciamento genético dos parasitos encontrados nas amostras, percebeu-se que as infecções, antes diagnosticadas como causadas por *P. vivax*, em verdade, foram causadas por *P. simium*. Esse protozoário era considerado exclusivo de PNH. Esse caso

constatou a emergência de uma nova espécie de protozoário causadora de malária humana na região da Mata Atlântica Brasileira (BRASIL *et al*, 2017).

A infecção zoonótica ocorre no momento em que o mosquito anofelino transfere o protozoário de um PNH infectado para um hospedeiro humano em repasto sanguíneo. Esse tipo de fenômeno zoonótico foi descrito, para *P. knowlesi*, *P. cynomlgi* e *P. simium*. A partir de análises moleculares aliadas aos estudos de mapeamento da circulação parasitária em populações de PNH e humanos, foram identificadas oito espécies capazes de infectar humanos, incluindo plasmódios zoonóticos e humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallickeri* (SUTHERLAND *et al*, 2010), *P. knowlesi*, *P. cynomlgi* e *P. simium* (CHIN *et al*, 1965; SINGH *et al*, 2004; TA *et al*, 2014; BRASIL *et al*, 2017)

Mais recentemente, foram detectadas outras quatro espécies que eventualmente podem infectar humanos: *Plasmodium inui*, *Plasmodium inui-like*, *Plasmodium semiovale* e *Plasmodium coatneyi*. Essas espécies foram encontradas infectando humanos em comunidades indígenas da Malásia, após realização de investigações em nível molecular (YAP *et al*, 2021). Não existem trabalhos, porém, que comprovem a transmissão humano-mosquito-humano de espécies de malária zoonótica.

A doença causada pelos plasmódios também se encontra descrita no que diz respeito ao seu quadro clínico, em específico quanto aos ciclos febris. Esses ciclos decorrem do ciclo de maturação das espécies de plasmódio, já que a ruptura dos eritrócitos e a liberação de novos parasitos, toxinas, mediadores inflamatórios e pirogênicos na circulação sanguínea são os responsáveis pelo desencadeamento dos episódios febris (RANDALL; SEIDEL, 1985). A malária causada por *P. falciparum* e *P. vivax* foi denominada de Terça<sup>4</sup> Maligna e Terça Benigna, respectivamente. A malária causada por *P. ovale* se comporta de forma terça, assim como a causada por *P. vivax* (LOBEL; CAMPBELL, 1982).

Sendo o *Plasmodium* spp. um parasito adquirido através de um inseto vetor, ele se destaca como um microrganismo amplamente difundido na região dos trópicos, sendo o Continente Africano e as Américas Central e do Sul, os principais polos de infecção, além do Continente Asiático. Cada espécie se encontra, mais ou menos, difundida em trechos específicos desses territórios. *P. falciparum*, por exemplo, se concentra em regiões de países africanos, enquanto o *P. vivax* tem sua área de concentração em países americanos e asiáticos (SNOW *et al*, 2005).

A demonstração, nos últimos anos, de diversas espécies de plasmódio simiano passando malária para humanos em transmissão zoonótica, comprova que mais casos semelhantes podem ocorrer, expondo a necessidade urgente da criação de técnicas que possam auxiliar no combate à patologia.

<sup>4</sup> Ocorrida nos dias 1 e 3 (LOBEL; CAMPBELL, 1982).

A proximidade filogenética entre humanos e outros animais é um fator crítico para o surgimento de novos surtos zoonóticos. A partir disto, a possibilidade de, em repasto sanguíneo, o mosquito anofelino realizar a transferência de protozoário símio para organismos humanos aumenta proporcionalmente (RAJA *et al*, 2020).

No quadro 1, demonstra a tendência de distribuição geográfica, os intervalos febris, a capacidade de ocasionar recaídas<sup>5</sup> e a evolução clínica de sete protozoários capazes de gerar episódios de malária humana. As informações foram organizadas de maneira a possibilitar a comparação desses fatores nos diferentes agentes etiológicos da doença.

QUADRO 1- Comparativo de protozoários infectantes ao homem.

ESPÉCIE	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA (TENDÊNCIA)	INTERVALO FEBRIL	RESSURGÊNCIA	EVOLUÇÃO CLÍNICA (TENDÊNCIA DE GRAVIDADE)
<i>P. falciparum</i>	Continente africano	Terça Maligna (48 horas)	Não observada	Evolução clínica grave
<i>P. vivax</i>	Continente americano	Terça Benigna (48 horas)	Observada	Evolução clínica leve
<i>P. knowlesi</i>	Continente asiático	Intervalo de 24 horas	Não observada	Evolução clínica de leve a grave
<i>P. malariae</i>	Continente africano (infecção coincidente com <i>P. falciparum</i> )	Quartã Benigna (72 horas)	Observada	Evolução clínica grave
<i>P. ovale</i>	Continente africano	Comportamento tipo "Terça" (42 horas)	Observada	Evolução clínica leve
<i>P. simium</i>	Região da Mata Atlântica Brasileira	Tipo "Terça Benigna" (48 horas)	Não observada	leve (semelhante ao <i>P. vivax</i> )
<i>P. cynomolgi</i>	Continente asiático	Intervalo de 24 horas	Observada	Evolução clínica leve

Fonte: Adaptado de Antinori (2013), Brasil *et al* (2007), Collins e Jeffery (2007), Garcia (2010), Grande *et al* (2019), Hartmeyer (2019), Naik (2020), Okafor e Finnigan (2021), Oriero (2021), Randall e Seidel (1985), Ta *et al* (2014) e Theel e Spritt (2021).

### 2.2.1 Agentes etiológicos de malária não *falciparum*

O *P. vivax* é a espécie que, mais comumente, produz infecções com menor chance de agravamento clínico. Nessa espécie, algumas formas do parasito se mantêm latentes (hipnozoítos) nos hepatócitos, possibilitando ressurgência. Recaídas ocorrem quando há novamente parasitemia, reiniciando o ciclo de desenvolvimento do parasito, após o “fim” da infecção inicial. Com isso, pode-se perceber que essa espécie, mesmo sendo menos grave em sentido clínico, apresenta complexidades que resultam em maiores dificuldades para seu controle (WHITE *et al*, 2014).

Essa espécie tem uma singularidade: apenas infecta eritrócitos jovens, os reticulócitos (encontradas em menor quantidade no sangue). Além disso, o *P. vivax* não é, ao contrário do *Plasmodium falciparum*, cultivável *in vitro* de forma estável (CHUA; ONG; BIFANI, 2019).

<sup>5</sup> Reinício do ciclo eritrocítico a partir da ativação de hipnozoítos (WHITE *et al*, 2014).

O *P. malariae* é uma interrogação, quando se trata de sua capacidade de ressurgência. Essa espécie seria capaz de ressurgir mesmo 30 anos após a cura da infecção inicial. Embora exista essa possibilidade, nunca foram detectados hipnozoítos parasitando hepatócitos em pessoas infectadas por essa espécie de parasito. É possível que, em vez de apresentar versões dormentes em células do fígado, a espécie seja resistente em fases eritrocíticas (GARNHAM, 1984). Essa espécie tem sua distribuição geográfica coincidente com a do *P. falciparum* (tanto que são comumente encontrados em coinfeção), principalmente no Continente Africano, na região subsaariana, e em parte do Continente Asiático, assim como em algumas ilhas do Pacífico (COLLINS; JEFFERY, 2007). Com relação à sua evolução clínica, a espécie pode gerar quadros graves, caracterizados também pelo desenvolvimento de síndrome crônica nefrótica (EHRICH; EKE, 2007; HEDELIUS *et al*, 2011).

O *P. ovale* é uma espécie de *Plasmodium* endêmica de regiões tropicais ocidentais do Continente Africano. É uma espécie capaz de gerar hipnozoítos, mas não caracterizada por agravamentos em casos clínicos, além de responder bem à administração de drogas antimaláricas, como a cloroquina (OKAFOR E FINNEGAN, 2021). Esse agente etiológico se divide em duas espécies causadoras de infecção (*P. ovale curtisi* e *P. ovale wallikeri*), cuja morfologia é idêntica. Sua diferenciação é complexa, já que apresentam mesmo quadro clínico e respondem bem aos mesmos tipos de tratamentos medicamentosos. As diferenças entre as elas são de natureza genética, apenas diferindo em algumas sequências de nucleotídeos, além de um período de latência mais curto na subespécie *P. ovale wallikeri* (OGUIKE *et al*,2011).

### 2.2.2 Agentes etiológicos de malária zoonótica

São três as espécies de plasmódio capazes de ocasionar episódios zoonóticos de malária simiana: *P. simium*, *P. knowlesi* e *P. cynomlgi* (HANG *et al*, 2021).

O *P. simium* era considerado um parasito exclusivo das populações de Primatas Neotropicais originários da região de Mata Atlântica, assim como outras 20 espécies de plasmódio (STRICKLAND, 1984), porém, após um surto de casos de malária no Rio de Janeiro, em áreas próximas à florestas com alta densidade de animais silvestres, durante os anos de 2015/2016, estudos conduzidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) comprovaram os episódios de zoonose e o potencial infectante desta espécie para indivíduos humanos. A espécie apresenta ainda quadro febril de configuração terçã, semelhante à febre causada por *P. vivax*, espécie de alta semelhança também em níveis morfológicos, se diferenciando apenas por sequências de nucleotídeos específicas. Além disso, é uma espécie que, devido sua recente observação em infecções humanas, não se tem conhecimento acerca da formação de células latentes em fase hepática, embora já tenha sido observada a presença

de gametócitos. A capacidade de infecção humana desses gametócitos ainda é incerta (BRASIL *et al*, 2017).

Após o tratamento com administração de drogas convencionais para malária, descobriu-se que o patógeno não apresenta resistência medicamentosa. Sabe-se também que a malária desenvolvida por essa espécie é de baixa gravidade (BRASIL *et al*, 2017).

Um grande desafio nos casos de zoonose, tomando como exemplo o surto ocorrido entre os anos 2015 e 2016, é a dificuldade na geração de intervenções que impeçam a circulação do parasito no complexo primata-homem-mosquito. Quebrar essa ligação em áreas próximas a matas de grande densidade animal é um dos questionamentos no combate ao fenômeno de zoonose (BRASIL *et al*, 2017).

Ainda no caso do Rio de Janeiro, BRASIL *et al* (2017) compararam o genoma do *P. vivax* com o de *P. simium*, afirmando então que ambos são intimamente semelhantes, diferenciando-se apenas por dois únicos polimorfismos nos nucleotídeos do DNA mitocondrial. Na posição 3535, em vez da base nitrogenada Timina, tem-se Citosina. Na posição 3869, em vez de Adenina, tem-se Guanina (CULLETON *et al*, 2011). Mesmo o quadro febril das duas espécies se observa de maneira similar, sendo de tipo terçã e observada em mais de 90% dos casos. Isto reforça o potencial de subnotificação de novas espécies surgindo em fenômeno zoonótico, no sentido de que apenas estudos de natureza molecular poderiam expôr novos casos de protozoários animais em transposição da barreira das espécies. Análises exclusivamente via microscopia de campo claro podem subnotificar casos de malária zoonótica, tendo em vista que novos protozoários podem ser confundidos com outros já conhecidos. Esse problema ocorreu durante as primeiras observações do *P. knowlesi* em humanos, que inicialmente era subnotificado como *P. malariae* no Continente Asiático (SINGH *et al*, 2004).

O *P. knowlesi* é uma espécie que foi observada em indivíduos humanos há poucos anos. Essa espécie zoonótico é endêmica do Sudeste Asiático, tendo ciclo de desenvolvimento ocorrendo em menor tempo do que o observado em outras espécies. Enquanto a maioria delas leva cerca de 48-72h para completar seu ciclo de desenvolvimento, que culmina na lise de eritrócitos, essa espécie leva cerca de 24h. Em caráter clínico, tem-se que esse parasito pode ser responsável por quadros de leve, média ou alta complexidade (CORDINA *et al*, 2014) (AHMED; COX-SINGH, 2015). O *Anopheles latens* é tido como o único vetor natural dessa espécie (RAJA *et al*, 2020).

O *P. cynomlgi* foi observado em infecções naturais humanas, em 2014, na Malásia, sendo descrito como similar ao *P. vivax*. Emergiu também como infecção zoonótica, sendo identificado após a utilização de técnicas moleculares. Um caso de infecção acidental em ambiente laboratorial com essa espécie foi reportado nos EUA no ano de 1956. Após esse

fato, a espécie foi inoculada com sucesso em ensaios experimentais. Em PNH, essa espécie pode ser observada em *Macaca fascicularis* e *Macaca nemestrina* (LEE; COX- SINGH; SINGH, 2009; RAJA *et al*, 2018).

### 2.2.3 *Plasmodium falciparum*

O *P. falciparum* é um dos cinco plasmódios causadores da malária humana, sendo a espécie que tende a gerar quadros mais graves e letais da doença, respondendo por cerca de 99% das mortes humanas por malária (VARO; CHACCOUR; BASSAT, 2020). Além disso, ele possui complexa estrutura genômica e alta capacidade de escape da resposta do sistema imune (CRABB; COWMAN, 2002).

Alguns fatores podem ser destacados para entender a tendência de alta letalidade que essa espécie possui, em relação às outras. Um fator de relevância é que essa espécie tem a capacidade de infectar eritrócitos de qualquer idade celular, o que significa que tanto células jovens quanto células maduras podem ser parasitadas. Esse fator ajuda a explicar a alta virulência e significativa capacidade de multiplicação dessa espécie (VARO; CHACCOUR; BASSAT, 2020).

Os sintomas clássicos de malária não são específicos, sendo caracterizados por episódios de febre, fadiga, dores de cabeça, náusea, vômito e desconforto abdominal. (VARO; CHACCOUR; BASSAT, 2020). Com relação ao desenvolvimento clínico da infecção, sabe-se que a idade, assim como fatores pré-infecciosos também são determinantes. Alguns quadros, como o aparecimento de lesões agudas nos rins, derivadas da infecção, são mais comuns no público infantil, por exemplo (CONROY *et al*, 2016).

O quadro de MG é comumente associado à infecção por *Plasmodium falciparum*. Cerca de 25% dos adultos e 40% das crianças com esse quadro passam por sofrimento no sistema respiratórios, que são chave para o entendimento das altas taxas de mortalidade em jovens (TAYLOR *et al*, 2012). Esse quadro também é caracterizado por outros fatores clínicos que ocorrem na fase eritrocítica da infecção. O *P. falciparum* possui um receptor de membrana, responsável por sua alta capacidade de infecção celular, conhecida como *erythrocyte membrane protein 1*, ou PfEMP1 (BARUCH *et al*, 1995). Esse receptor atua também no fenômeno de citoadesão, onde células em estágio maduro do processo infeccioso irão aderir umas às outras e também à células não infectadas, formando aglomerados celulares conhecidos como rosetas (UDOMSANGPETCH *et al*, 1989). Essas rosetas podem ainda obstruir os capilares, interrompendo o fluxo sanguíneo. Esse processo também ocorre entre células infectadas e plaquetas, formando os aglomerados mediados por plaquetas (PAIN *et al*, 2001). O fenômeno inutiliza as células que aderiram umas às outras, já que essas deixam de circular, ocasionando episódios de sequestro eritrocitário.

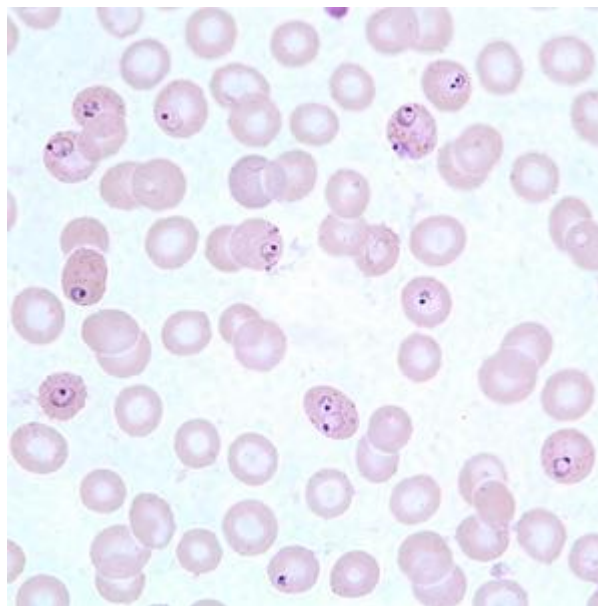
A MC é um quadro caracterizado como um coma proveniente de infecção malárica, sem nenhuma outra explicação possível. Esse quadro, que ocorre após a quebra da barreira hematoencefálica, pode gerar danos no tecido nervoso, ocasionando sequelas cognitivas em cerca de um terço dos indivíduos (BOIVIN, 2002; JOHN *et al*, 2010; ZIMMERMAN; CASTRO-FARIA, 2010; FERNANDO; RODRIGO; RAJAPAKSE, 2010; SHIKANI *et al*, 2012; BANDIRANA *et al*, 2014).

Além disso, a malária grave (MG) e a malária cerebral (MC) possuem papel significativo no processo de desregulação da resposta imune do hospedeiro, causando respostas inflamatórias intensas (DE JONG *et al*, 2016).

O relatório anual de malária (2021), organizado pela OMS, apontou que, em 2019, a maioria das mortes de malária *falciparum* se concentra no Continente Africano, com cerca de 94% dos episódios. Essa região é ainda o local de foco das transmissões de *P. falciparum*. A espécie causa problemas também em outras regiões do globo, como em parte do Mediterrâneo e também do Sul do Continente Asiático. Nesses locais, mais da metade dos casos de malária advém dessa espécie, mais precisamente 69% e 62,8%, respectivamente.

Seu ciclo biológico é representado pelos mesmos estágios observados em outras espécies de *Plasmodium* spp, embora não forme hipnozoítos (VARO; CHACCOUR; BASSAT, 2020).

**FIGURA 3- Trofozoítas de *P. falciparum* em esfregaço sanguíneo**



FONTE: Laboratório de Identificação de Parasitas de Preocupação em Saúde Pública do Centro de Controle de Doenças.

De acordo com o Banco de Imagens de Identificação Parasitária em Malária do Centro de Controle de Doenças (CDC), esquizontes não são comumente encontrados nas amostras de sangue periférico de *P. falciparum*, já que se concentram no fluxo sanguíneo capilar visceral. Observar essas formas em sangue periférico, acompanhado de alta parasitemia, é um indicativo de quadro clínico de grande gravidade. Os gametócitos do *P. falciparum* são característicos, sendo encontrados em formato alongado, semelhante à um eritrócito falciforme. O gametócito feminino (macrogameta) se diferencia do gametócito masculino (microgameta) por seu citoplasma mais pigmentado e por sua cromatina mais densa. O gameta masculino apresenta citoplasma mais pálido e cromatina mais suave (CDC)

Outra proteína expressa pelo parasito através dos eritrócitos infectados é a *histidine-rich protein-2*, ou HRP-2. Essa proteína está relacionada diretamente à quantidade de biomassa parasitária. Sua medição pode ser utilizada para compreender o estágio de desenvolvimento do parasito no hospedeiro (DONDORP *et al*, 2005; DESAKORN *et al*, 2005). Altos níveis de HRP-2 podem sinalizar alto número de parasitemia e com isso uma maior probabilidade de óbito (RUBACH *et al*, 2012; HENDRIKSEN *et al*, 2012). A quantidade de biomassa parasitária também está relacionada com o sequestro de eritrócitos, assim como a instalação de processos inflamatórios e de disfunção na região do endotélio vascular (CUNNINGTON; WALTHER; RILEY, 2013).

Molecularmente, a estrutura de *P. falciparum* é rica e diversa, em especial por dois motivos: o primeiro deles está relacionado a capacidade desses parasitos de realizar mutações e/ou recombinações gênicas, que geram sequências estáveis de DNA capazes de sintetizar antígenos, o segundo está relacionado com a variação antigênica observada nesses parasitos, de forma a serem encontrado diversos antígenos em sua estrutura (FERREIRA; ZILVERSMIT; WUNDERLICH, 2007).

Para iniciar o debate acerca da estrutura molecular deve-se observar que a grande maioria dos antígenos de superfície de plasmódios apresenta sequências antigênicas repetitivas. Essas sequências podem ser encontradas em mais de um tipo de antígeno. É comum que essas regiões compreendam os trechos imunogênicos dominantes de suas respectivas moléculas (SINNIS; NUSSENZWEIG, 1996). A questão mais importante nessa característica é a possibilidade de reação cruzada entre antígenos que apresentem essas sequências repetitivas, de modo a dificultar a maturação de uma resposta específica para determinado antígeno. Algumas dessas sequências podem também estar presentes em autoantígenos do hospedeiro (ANDERS, 1986).

A variação antigênica também pode ser explicada pela existência de genes responsáveis pela síntese de antígenos com funções semelhantes na estrutura genômica do parasito. Essa característica confere aos plasmódios a capacidade de sintetizar determinados antígenos em um dado período e, caso haja pressão imunológica, alterar esse antígeno, de maneira que suas funções metabólicas e celulares se mantenham ativas, porém com estruturas moleculares que induzam respostas imunológicas diferentes. Essas famílias multiantigênicas compõem grupos de antígenos variados na superfície da célula parasitada (FERREIRA; CARLOS; WUNDERLICH, 2011).

De modo geral, tem-se que o genoma do *P. falciparum* é dividido em 14 cromossomos. Cada cromossomo está organizado em regiões conservadas localizadas em sua porção central e em suas extremidades estão localizadas as regiões altamente variáveis. Essas regiões variáveis são responsáveis pela diversidade antigênica das cepas (HERNANDEZ-RIVAS *et al*, 2010).

Existem diversas famílias gênicas, cada uma delas apresentando características transcricionais específicas responsáveis pela diversidade antigênica do parasito. São cinco as famílias relevantes para a compreensão da estrutura molecular dos plasmódios: os genes *var*, os genes *rif*, os genes *stevor*, os genes sintetizadores das proteínas da superfamília 2TM e os genes *surf*. Cada família antigênica sintetiza proteínas com diferentes funcionalidades na biologia do parasito e a maioria pode ser estudada e encarada como possível alvo terapêutico evacinal, em especial as proteínas expressas em localidades mais superficiais, expostas à ação de imunoglobulinas e células do sistema imunológico. Os antígenos sintetizados pelas famílias *var* (BARUCH *et al*, 1995; SMITH *et al*, 1995; SU *et al*, 1999), *rif* (KYES *et al*, 1999) e *surf* (WINTER *et al*, 2005) são encontrados na superfície de membrana dos eritrócitos parasitados, enquanto as demais famílias transcrevem antígenos expressos no citoplasma da célula, mais especificamente nas granulações de Maurer (estrutura tubular parasitária) (SAM-YELLOWE *et al*, 2004).

O primeiro grupo de genes, intimamente relacionado com o processo de evasão do sistema imune, é o grupo de genes *var*. Esse grupo é composto por 60 genes codificantes. Esses genes estão próximos à região telomérica dos cromossomos (região das extremidades cromossomais). Durante uma determinada etapa de vida do parasito, um dentre 60 genes está ativado, sintetizando sua determinada proteína funcional. Essas proteínas são reconhecidas imunogênicas, de modo a incitar a produção de anticorpos específicos. Após a maturação de alguma resposta imunológica o gene é silenciado, enquanto um segundo gene é ativado e suas proteínas transcritas são expressas, substituindo as proteínas anteriormente sintetizadas (CHEN *et al*, 1998; SCHERF *et al*, 1998).

Uma das características mais importantes atribuídas às proteínas sintetizadas pelos genes *var* é a citoaderência. Durante a fase inicial de desenvolvimento do parasito nos eritrócitos, em que ele se configura como um anel jovem, a célula parasitada transita livremente pelo organismo, porém, quando o trofozoíto atinge um estágio maduro de desenvolvimento, a célula parasitada passa a interagir com o endotélio vascular, de forma a se fixar nessa região e deixar de circular. Esse fenômeno também é referido como sequestro de eritrócitos (LEECH *et al*, 1984). Deixar de circular é importante para a sobrevivência do parasito, pois diminui a chance de encontro com células fagocíticas do baço, por exemplo, órgão sabidamente responsável pela destruição de eritrócitos parasitados e pelo controle da parasitemia.

Esses genes comumente apresentam dois éxons, o primeiro sendo responsável pela expressão de antígenos variados na superfície do eritrócito parasitado. A estrutura é responsável pela interação com os receptores de membrana das células do endotélio vascular. Já o segundo éxon expressa estruturas terminais desse antígeno de membrana — geralmente é um gene de estrutura mais conservada por não estar tão exposta à pressão imunológica — que é responsável pela geração de protuberâncias na superfície da membrana celular conhecidas como *knobs* (FERREIRA; CARLOS; WUNDERLICH, 2011).

Esse mecanismo de transcrição de antígenos capazes de interagir com receptores do endotélio vascular é responsável pela observação de quadros de malária grave por *P. falciparum*, a partir do sequestro de eritrócitos em vasos responsáveis pela nutrição dos tecidos sensíveis à danos, como o cérebro. As proteínas (PfEMP-1) são estruturas capazes de se ligar a diferentes receptores de membrana. Esse entendimento é chave para a compreensão de quadros como a malária cerebral (ligação com o receptor ICAM-1) e a malária placentária (ligação com o receptor CSA) (CHEN *et al*, 2000; SMITH *et al*, 2000; ROBINSON *et al*, 2003).

Os genes *rif* compõem o segundo grupo de genes transcritores de antígenos de membrana na superfície do eritrócito parasitado. Esse grupo é composto de 160 genes que, assim como os genes *var*, estão presentes nas regiões teloméricas dos cromossomos. São genes transcritos principalmente na fase de trofozoíta jovem de desenvolvimento plasmodial (KYES *et al*, 2000; WANG *et al*, 2009).

Esse grupo de genes sintetiza os antígenos chamados de RIFINs, que são imunogênicos (ABDEL-LATIF, 2003). Sabe-se que o processo de substituição de suas proteínas expressas no processo de transcrição pode ocorrer mais rápido do que com os genes *var* (CABRAL; WUNDERLICH, 2009), porém, diferentemente do grupo de genes anteriormente discutido, esse não apresenta relação com o fenômeno de sequestro de eritrócitos (FERREIRA; CARLOS; WUNDERLICH, 2011). Os antígenos RIFIN estão

relacionados, em verdade, com o processo de formação das rosetas, já que interagem com os receptores de glicoforina A presente na estrutura dos eritrócitos (GOEL *et al*, 2015).

O terceiro grupo de antígenos variáveis são as proteínas STEVOR, sintetizadas pelos genes *stevor*, que compreendem cerca de 30-40 genes que transcrevem proteínas durante a fase de trofozoíta maduro do parasito, embora também possam ser ativos na fase de gametócito (WEBER, 1988). O quarto grupo de antígenos variantes compreende os genes que sintetizam as proteínas Pfmc-2TM. Esse grupo compreende 13 genes (TEMPLETON, 2009).

### 2.3 Imunologia da malária

Como mencionado acima, no desenvolvimento biológico de plasmódio, o parasito apresenta fases evolutivas extra e intracelulares e cada forma de desenvolvimento apresenta antígenos que podem ser considerados como possíveis constituintes de uma formulação vacinal com capacidade de incitar resposta imune, memória imunológica e capacidade de proteção do hospedeiro (PESSOA; MARTINS, 1974; REY, 2001).

Cabe lembrar que o processo de infecção natural na malária, ao contrário da maioria das infecções, não é capaz de induzir uma resposta imunológica protetora esterilizante. Indivíduos residentes de área endêmica podem apresentar os sintomas da doença inúmeras vezes em um único ano, o que permite concluir que uma prévia apresentação aos antígenos do parasito não incita a produção de resposta imune com memória imunológica capaz de impedir o estabelecimento de novas infecções (TOSTA; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2013).

Entretanto, nesses mesmos indivíduos de área endêmica, o *Plasmodium* spp. é capaz de induzir algum grau de imunidade. A constante apresentação aos antígenos parasitários ao longo da infância até a fase adulta provê ao indivíduo um tipo de resposta imune tida como parcial, ao passo que não gera resposta esterilizante, porém caracteriza uma resposta capaz de reduzir a gravidade do quadro clínico, ou até de manter a infecção assintomática (BULL; MARSH, 2002).

Caso o indivíduo com imunidade parcial saia da área endêmica, de forma que cesse o estímulo antigênico derivado de infecções naturais, a tendência é a de diminuição dessa imunidade incompleta, com o estabelecimento de quadro clínico sintomático até de maior gravidade, em caso de nova infecção (WALKER; BRODIE, 1982). Outro fator de relevância em áreas endêmicas é a sazonalidade da doença, em que os casos de infecção aumentam significativamente após períodos chuvosos, com o aumento da proliferação do vetor. Em períodos de seca, com a redução da reprodução vetorial, ocorre também uma redução dos casos de malária (TOSTA; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2013).

Pode-se concluir então que a imunidade antiplasmodial naturalmente adquirida em área endêmica de transmissão tem duas funções principais: a redução da sintomatologia e a redução da gravidade da doença (TOSTA; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2013; WALKER; BRODIE, 1982; BULL; MARSH, 2002).

O primeiro desafio enfrentado pelo parasito, ainda em forma esporozoíta, é o de atravessar as barreiras físicas do corpo, ou seja, o tecido epitelial e sua população celular (macrófagos e demais células apresentadoras de antígeno como células dendríticas). Após essa superação, o parasito atinge a camada subcutânea da pele e alcança os vasos (sanguíneo e linfático). A presença de anticorpos específicos para CSP, nessa etapa, através da interação e ligação com o esporozoíta, possibilitaria a redução ou o bloqueio da motilidade do parasito, além de opsonizá-lo para células fagocíticas. Uma resposta imune potente nesse momento inicial poderia impedir a chegada do parasito nos tecidos hepáticos (FREVERT, 2004).

Após a invasão bem-sucedida do hepatócito pelo esporozoíta, ainda podem ser encontradas proteínas como a CSP, sintetizadas pelo parasito em sua forma esporozoíta, na superfície da célula hepática, na fase exoeritrocítica do desenvolvimento do parasito. Essas proteínas podem ser moléculas chave para o processo de resposta antiplasmodial na fase exoeritrocítica do parasito. Essas moléculas são reconhecidas, principalmente, por linfócitos TCD4+ e TCD8+, auxiliar e citotóxico, sendo então responsáveis pela atividade citolítica direta, pela destruição de células parasitadas, ou indireta (RODRIGUES *et al*, 1993), pela produção de citocinas pró-inflamatórias, características de resposta linfocitária de perfil Th-1 em especial IFN- $\gamma$  (Interferon gama), TNF (Fator de Necrose Tumoral), IL-1 (Interleucina do tipo 1) e IL-6 (PIED *et al*, 1989). Em indivíduos de áreas endêmicas tais populações celulares, específicas para antígenos de estágio hepático, são encontradas com frequência, indicando o potencial imunogênico dessa forma do parasito (SEDEGAH *et al*, 1992).

Pela natureza da atividade fisiológica do fígado estar intimamente ligada à constante apresentação a antígenos, em especial derivados de processos gastrointestinais, o contexto de apresentação nesse tecido condiciona a resposta ao antígeno ser do tipo de tolerância. Assim, citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF-B (Fator de Crescimento Transformador Beta) são expressas, diminuindo o potencial de resposta imune no tecido. Além disso, o processo de apoptose de linfócitos TCD8+ antiplasmodiais é constante nos tecidos hepáticos, o que pode explicar parcialmente a modesta resposta contra essa fase do parasito (FREVERT, 2004).

Após o amadurecimento do esquizonte e a ruptura do hepatócito parasitado, uma grande quantidade de merozoítos é liberada. Caso essas formas do parasito não caiam rapidamente na corrente sanguínea e invadam eritrócitos, ela serão destruídas por ação de células fagocíticas do sistema imune inato, como macrófagos hepáticos ou esplênicos, caso não deixem o fígado ou cheguem ao baço, respectivamente (TOSTA; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2013).

A partir da interação entre receptores de membrana do parasito e do eritrócito, ocorre a invasão da célula. Assim, a membrana da célula hospedeira, antes íntegra, passa por diversas alterações morfológicas, que permitem, inclusive, a passagem de imunoglobulinas do tipo IgG anti-parasitárias por canais que conectam o vacúolo parasitóforo com a superfície da membrana celular (POUVELLE *et al*, 1991).

Altos títulos de anticorpos específicos para as formas intraeritrocitárias do parasito podem então degenerar o plasmódio, mesmo que ele esteja interno à célula. Essas degenerações são caracterizadas pelo surgimento de formas de crise do parasito (JENSEN *et al*, 1982).

Tem-se que quaisquer formas do parasito apresentam potencial imunogênico e são capazes de induzir resposta imune, propiciando a construção de resposta humoral. Com relação ao desenvolvimento de resposta humoral, a produção de imunoglobulinas específicas para antígenos do estágio eritrocítico do parasito é a mais significativa para o controle da parasitemia, assim como a melhora do quadro clínico dos pacientes infectados (MCGREGOR, 1987).

Observa-se também que os anticorpos antiplasmodiais podem atravessar a barreira transplacentária. Mães moradoras de áreas endêmicas de malária conseguem transferir parte de seus anticorpos da classe IgG para a prole. Deve-se ter em mente, porém, que a carga de anticorpos transferidos da mãe para o bebê tem meia vida curta, ou seja, em poucos meses a carga de imunoglobulinas é degradada (TOSTA; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2013).

Tratando-se do combate ao parasito, a célula mais atuante é o macrófago, capaz de fagocitar eritrócitos parasitados e formas do parasito extracelulares. O fenômeno de opsonização também é relevante, potencializando e facilitando a ação fagocítica (TOSTA; WEDDERBURN, 1980). Além disso, sabe-se que os linfócitos T são essenciais para a formação de uma resposta robusta contra o parasito. A função dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> é, essencialmente, secretar citocinas, capazes de modular a resposta imune, seja através do trabalho em conjunto com plasmócitos na construção de uma resposta humoral, seja a partir de função efetora no recrutamento de células fagocíticas (KUMAR; MILLER, 1990).

Porém, ainda é incerta a real importância dessas células na defesa contra o parasito, já que crianças infectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que tem tropismo por linfócitos, especialmente os TCD4<sup>+</sup>, reduzindo drasticamente sua população, não apresentam taxas mais elevadas de infecção por malária nem tem uma tendência maior ao agravamento da doença, quando comparadas com crianças soro negativas (GREENBERG *et al*, 1991).

Porém, ainda é incerta a real importância dessas células na defesa contra o parasito, já que crianças infectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que apresenta tropismo por linfócitos TCD4<sup>+</sup>, reduzindo drasticamente sua população, não apresentam taxas mais elevadas de infecção por malária, nem tem uma tendência maior ao agravamento da doença, quando comparadas com crianças soro negativas (GREENBERG *et al*, 1991).

Na fase final do desenvolvimento biológico dos plasmódios, com a eliminação das formas eritrocitárias assexuadas, os gametócitos formados podem ainda permanecer por alguns dias ou semanas em circulação. Toda a resposta específica montada para os epítomos plasmodiais não parece interferir no desenvolvimento dos gametócitos e sua eliminação não é garantida. O que ocorre é que os antígenos presentes nessas formas do parasito não propiciam reação imunológica cruzada com antígenos de outras formas do plasmódio e as respostas humoral e celular específicas para as proteínas e receptores de membrana de formas assexuadas não são capazes de reconhecer os antígenos das formas sexuadas. Não é comum encontrar anticorpos específicos para gametócitos em regiões endêmicas de malária, o que indica que possivelmente essa forma do parasito é pouco imunogênica, ou não permanece tempo suficiente em circulação para que haja a possibilidade de estruturação de resposta específica (CARTER *et al*, 1989)

Essas formas, porém, são destruídas na presença de citocinas produzidas por células imunes, como TNF e IFN- $\gamma$ . Anticorpos específicos para essa forma do parasito são capazes de interagir com os receptores e proteínas de membrana impedindo sua fecundação no estômago do mosquito vetor. Durante o repasto sanguíneo, as citocinas carregadas para o sistema digestivo do mosquito não agem de maneira a impedir o desenvolvimento do ciclo esporogônico, porém anticorpos sim. As imunoglobulinas, quando não impedem a fecundação do microgameta no macrogameta, podem ainda apresentar certa reatividade cruzada com antígenos do zigoto, interagindo com essas estruturas e impedindo seu desenvolvimento (LENSEN *et al*, 1992; CARTER *et al*, 1988).

Embora essas estratégias de interação do sistema imune com o plasmódio sejam complexas, o parasito apresenta, em contrapartida, diversas estratégias de evasão (ou de escape), ou mesmo de aproveitamento de situações - de caráter imunológico e inflamatório desenvolvidas pelo hospedeiro - a seu favor (TOSTA; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2013).

### **3 CANDIDATAS VACINAIS PARA MALÁRIA**

O cenário de combate à doença não é otimista. Duas estratégias de controle da malária se destacam: controle do agente etiológico, a partir da administração de antimaláricos aos doentes e portadores, e controle do vetor, a partir da aplicação de inseticidas de efeito residual e instalação de mosquiteiros impregnados. Ambas são utilizadas em conjunto em estratégias de saúde pública. A utilização dessas táticas foi importante para a significativa tendência de queda observada durante o período entre 2000 e 2019. Nessa janela temporal, a incidência da doença, que no ano 2000 era de 81 casos para cada 1000 habitantes em áreas de risco, caiu para 56 em 2019. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Porém, já é constatado que existe um aumento na circulação de cepas com quimioresistência. Isto também ocorre com o vetor, que já apresenta certo grau de tolerância aos inseticidas. Com isso, a urgência no estudo de moléculas candidatas vacinais se põe em posição de destaque com relação a outras estratégias (N'GUESSAN *et al*, 2007; DONDORP *et al*, 2010; TOSTA; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2013;

A formulação de uma candidata vacinal, não é tarefa fácil, já que o microorganismo apresenta alta capacidade de mutação protéica. Também são complexas as interações do protozoário com o sistema imune humano, já que a imunidade natural (proveniente do processo de infecção), mesmo para pacientes que já obtiveram contato com a doença, é adquirida de forma temporária e não esterilizante (SCHERF; LOPEZ-RUBIO; RIVIERE, 2008; LANGHORNE *et al*, 2008).

Dada à complexa configuração do ciclo de vida do plasmódio, com estágios eritrocítico e exoeritrocítico, intra- e extra-celulares, a criação de uma formulação vacinal torna-se desafiadora, já que diversos alvos moleculares necessitam de estudos para que seu potencial imunogênico seja analisado (CROMPTON; PIERCE; MILLER, 2010).

O ciclo evolutivo do parasito é composto de uma riqueza considerável de moléculas antigênicas, porém a fase eritrocitária é a que mais se destaca no potencial de produção e apresentação dessas moléculas. A ruptura do eritrócito, além de liberar merozoítos na corrente sanguínea, libera estruturas intracelulares do eritrócito parasitado, além de metabólitos do parasito, como a hemozoína e toxinas, como o Glycosylphosphatidylinositol, ou GPI (WHITE, 1996).

Pode-se pensar ainda que uma resposta contra as fases iniciais (esporozoíta e hepática) conseguiria impedir o estabelecimento da infecção. Respostas contra a etapa eritrocitária assexuada conseguiriam impedir ou diminuir em muito o desenvolvimento de quadro clínico. Já respostas contra as formas sexuadas poderiam bloquear a transmissão do parasito para o vetor mosquito e impedir a propagação da doença para um novo indivíduo (TOSTA; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2013).

A complexidade das relações imunológicas na doença deve ser amplamente estudada para que possíveis estruturas de moléculas vacinais tenham chance de serem eficazes e altamente imunogênicas. Os principais fatores a serem analisados dizem respeito às possíveis estratégias de imunização (CARVALHO; PRATT-RICCIO; DANIEL-RIBEIRO, 2013).

Pensar em formular um composto com base em esporozoítas inteiros em uma lógica de produção em massa, até então, seria inviável, ou pouco provável, já que essa forma apenas consegue ser obtida através da criação em laboratório de vetores infectados, o que exige estruturas específicas não encontradas na maioria dos laboratórios. Pensando nisso, pode-se então dispor de proteínas, ou moléculas de DNA (desenhadas para a síntese de proteínas do

parasito). Além disso, anticorpos monoclonais também podem ser utilizados em esquema imunoterápico. Os alvos podem ser o próprio parasito ou suas toxinas/metabólitos sintetizados e de importância para o desenvolvimento da doença (CARVALHO; PRATT-RICCIO; DANIEL-RIBEIRO, 2013).

É importante, porém, ter em mente que cada espécie de parasito apresenta características próprias, como por exemplo, a formação, ou não, de hipnozoítos. Ao pensar em uma formulação vacinal para *P. vivax*, considerar uma estratégia que compreenda a fase hepática pode ser oportuno e indicado, já que bloquearia o estabelecimento de formas latentes no fígado, além de impedir o prosseguimento do ciclo biológico do parasito (CARVALHO; PRATT-RICCIO; DANIEL-RIBEIRO, 2013).

As proteínas expressas pelo parasito muitas vezes estão envolvidas nos processos de interação com o ambiente e com populações celulares que ali estejam, como a CSP, proteína mais abundante na superfície do esporozoíto. Essa proteína, aliada da TRAP (proteína de adesão relacionada com a trombospondina), está intimamente envolvida na invasão do hepatócito (KALKAL *et al*, 2022). Ao contribuir para a interrupção do ciclo do parasito, uma formulação vacinal pode agir como ferramenta de controle do agravamento da doença, impedindo interações capazes de danificar estruturas teciduais (TOSTA; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2013).

Além disso, novas tecnologias surgiram, possibilitando a geração de formulações mais modernas. Algumas dessas novas possibilidades envolvem candidatas vacinais baseadas em RNA autoreplicável ou mesmo nanopartículas (LAURENS, 2021).

Vacinas compostas por RNA autoreplicável envolvem uma determinada molécula de RNA, capaz de sintetizar antígenos parasitários, sendo entregue juntamente com o maquinário necessário para a replicação dessas moléculas intracelularmente. Sua aplicação poderia ser em dose baixa, visto que uma pequena dosagem do antígeno parasitário já é responsável por iniciar a ativação do sistema imunológico. Este tipo de formulação é pensado para malária a partir de RNA responsável por sintetizar o Fator de Inibição da Migração de Macrófagos específicos para plasmódio, ou PMIF, secretado pelo parasito para inibir a formação de resposta imunológica inflamatória. Formulações deste tipo ainda não foram testadas em humanos (LAURENS, 2021; GARCIA *et al*, 2018; MAHASE, 2021).

A utilização de nanopartículas como estratégia vacinal explora o potencial de estruturas proteicas e peptídicas de interagir com outras moléculas, criando estruturas estáveis quimicamente. A ideia central nessa formulação é unir o máximo de partículas capazes de interagir com o sistema imune do vacinado, gerando resposta imune robusta, tanto em nível celular quanto em nível humoral (BURKHARD; LANAR, 2015; SCHNEIDER *et al*, 2021).

### 3.1 Os princípios do desenvolvimento vacinal

O homem sempre buscou formas de lidar com as patologias que se fizeram presentes ao longo de sua história. Patologias com as quais o homem conviveu por séculos, hoje se encontram eliminadas do cenário epidemiológico mundial, ou ao menos em grande parte dele. Isto se dá graças ao sucesso no desenvolvimento de tecnologia capaz de imunizar humanos contra determinados agentes patogênicos. A ideia de imunizar as populações contra patógenos remonta a Antiguidade Chinesa e Turca, mais especificamente a partir do século 15, quando se utilizou fragmentos da crosta seca obtida na pústula da infecção por varíola em aplicação de técnicas de “inserção” ou “inalação” em indivíduos não infectados (FERNANDES *et al*, 2021).

A técnica, cunhada então como o nome de como “variolização”, foi o primeiro passo para a utilização dos processos de vacinação. Foi uma prática eficaz, embora não regulada ou sequer segura. Além disso, por não ser uma técnica refinada, alguns indivíduos submetidos à técnica desenvolveram varíola grave, indo a óbito em cerca de 2% a 3% dos casos (FERNANDES *et al*, 2021 apud PLOTKIN *et al*, 2018).

Após séculos de desenvolvimento científico a primeira vacina antivariólica, como ela é conhecida atualmente em quesito de tecnologia básica, foi desenvolvida. Tendo como alvo a mesma patologia que, durante séculos, foi foco de estudo em contexto de saúde pública. Edward Jenner, no ano de 1796, desenvolveu a primeira experiência vacinal conhecida. Jenner notou que mulheres que trabalhavam na prática da ordenha de vacas e que se expunham a animais infectados com a varíola bovina não contraíam a varíola humana, ou apenas desenvolviam formas leves da doença. Isto serviu de base para a constatação feita de que o contato com as feridas, ou pústulas, encontradas nas vacas poderia imunizar os indivíduos contra a doença vista em humanos (FERNANDES *et al*, 2021).

Para testar sua hipótese, Jenner inoculou uma porção da secreção da pústula da mão de uma mulher que havia ordenhado uma vaca infectada no braço de um jovem de 8 anos. Como resultado, o menino foi imunizado, não contraindo a doença após inoculação de material proveniente de doente de varíola humana (FERNANDES *et al*, 2021).

Pasteur haveria de continuar os estudos de imunologia no sentido de desenvolver técnicas capazes de imunizar pessoas contra patologias. Em seus estudos, conseguiu atenuar cepas da bactéria *Pasteurella multocida* com o intuito de imunizar um grupo experimental de galinhas contra a cólera aviária. Pasteur acreditava que o enfraquecimento de determinados patógenos poderia ser utilizado para a geração de tecnologia vacinal. Seguindo essa mesma lógica, conseguiu desenvolver vacinas contra a raiva e o antraz. Pasteur realizou o “enfraquecimento”(atenuação) de microrganismos a partir de exposições a fatores ambientais ou sucessivas passagens em animais de experimentação (FERNANDES *et al*, 2021).

Anos mais tarde, as técnicas se modernizaram e novas possibilidades de formulação de vacinas imunogênicas, seguras e eficazes surgiram no contexto da pesquisa científica. Atualmente, diversas metodologias podem ser aplicadas. (FERNANDES *et al*, 2021).

Uma molécula vacinal pode ser construída como uma vacina atenuada, inativada, feita com subunidades moleculares como proteínas e polissacarídeos, toxóide, ou ainda, conjugada. Mais atualmente, porém, novas tecnologias como a construção de moléculas vacinais com base no uso de ácidos nucleicos (DNA e RNA), ou mesmo com o uso de vetores de natureza viral, surgem como alternativas eficazes e promissoras no cenário mundial (FERNANDES *et al*, 2021 apud AFROUGHT; DOWALL; HEWSON, 2019).

Além disso, outros compostos podem ser utilizados para a constituição de um imunobiológico. Substâncias cujo uso podem aumentar a eficácia de uma formulação, ou melhorar suas condições de segurança sob estoque, podem ser utilizadas como constituintes vacinais: adjuvantes, estabilizante, conservantes e moléculas carreadoras (FERNANDES *et al*, 2021 apud VETTER *et al*, 2018).

Adjuvantes são “ (...) substâncias que podem melhorar e modular a imunogenicidade do antígeno durante a resposta adaptativa (...)” onde “(...) atuam como estimuladores da resposta imune contra determinado antígeno (...)”. Estabilizantes são utilizados com o intuito de garantir a estabilidade da molécula vacinal, garantindo sua eficácia mesmo após estocagem por longos períodos ou após seu deslocamento até o território onde será utilizada. Essas moléculas normalmente são aminoácidos ou açúcares. Conservantes são moléculas ou substâncias capazes de impedir a proliferação de outros microrganismos, como fungos e bactérias. Carreadoras são moléculas que apresentam papel de transporte do antígeno principal (alvo molecular da formulação), aumentando a complexidade e imunogenicidade do composto vacinal. Essas moléculas, comumente, são proteínas (FERNANDES *et al*, p. 40. 2021).

A partir da utilização de todos estes compostos, formulações de alta complexidade podem ser obtidas e então submetidas aos devidos ensaios (pré-clínico e clínico) para que seus parâmetros de eficácia e segurança sejam analisados, antes da submissão às agências reguladoras para a validação e posterior uso comercial (FERNANDES *et al*, 2021).

### 3.2 Molécula vacinal antimalárica RTS, S e R21/MM

O desenvolvimento de candidatas vacinais se faz em um processo de décadas de estudo da imunologia da malária. Proporcionar artificialmente imunidade consistente e robusta contra uma patologia que, naturalmente, não induz imunidade esterilizante até mesmo em moradores de áreas endêmicas é um processo extremamente complexo e desafiador (VARO; CHACCOUR; BASSAT, 2020).

O desenvolvimento de candidata vacinal para esses parasitos se inicia há mais de 40 anos. A primeira formulação vacinal conhecida para alguma espécie de plasmódio foi desenvolvida e testada por Jules Freud, no ano de 1945. A molécula vacinal foi desenvolvida com base em *Plasmodium lophurae* inativado com formalina, associado com óleo de parafina e Bacillus de Koch. Essa formulação, após testes pré-clínicos, utilizando patos como modelos experimentais, atestou que a candidata era eficaz, gerando proteção aos animais contra a infecção do parasito na infecção de prova (desafio ou *challenge*), porém, haviam problemas envolvendo reações adversas ao sistema de adjuvante utilizado, o que resultou no descarte da candidata (FREUD, 1945; ALMEIDA *et al*, 2021).

Anos depois, em 1967, novos testes pré-clínicos de formulação vacinal foram conduzidos, dessa vez utilizando modelos murinos. Para esse tipo de animal, foi utilizado o parasito *P. berghei*. O grupo liderado por Ruth Nussenzweig, na Universidade de Nova York, conduziu a atenuação do parasito utilizando emissões de raios-X. Os animais foram inoculados com o parasito inativado e então passaram pelo desafio, com a inoculação de uma determinada carga parasitária de *P. berghei* não atenuados. Os animais não foram imunizados completamente, porém a taxa de sucesso na infecção de parasitos invadindo hepatócitos caiu, indicando que a vacinação surtiu efeito impedindo a evolução de parte dos até o estágio hepático (NUSSENZWEIG, 1967).

Em 1971, um novo estudo de candidata vacinal foi performado na *Walter Reed Military Medical Center*, que realizou os primeiros testes clínicos de potencial candidata vacinal. Utilizando atenuação por raios-X, seguindo os estudos de NUSSENZWEIG *et al*, esporozoítos de *P. falciparum* e *P. vivax* foram utilizados como estímulo vacinal. Um grupo de seis homens saudáveis foi utilizado e todos apresentaram parasitemia, mesmo que em baixos níveis, após inoculação de parasitos em repasto sanguíneo por mosquitos infectados.

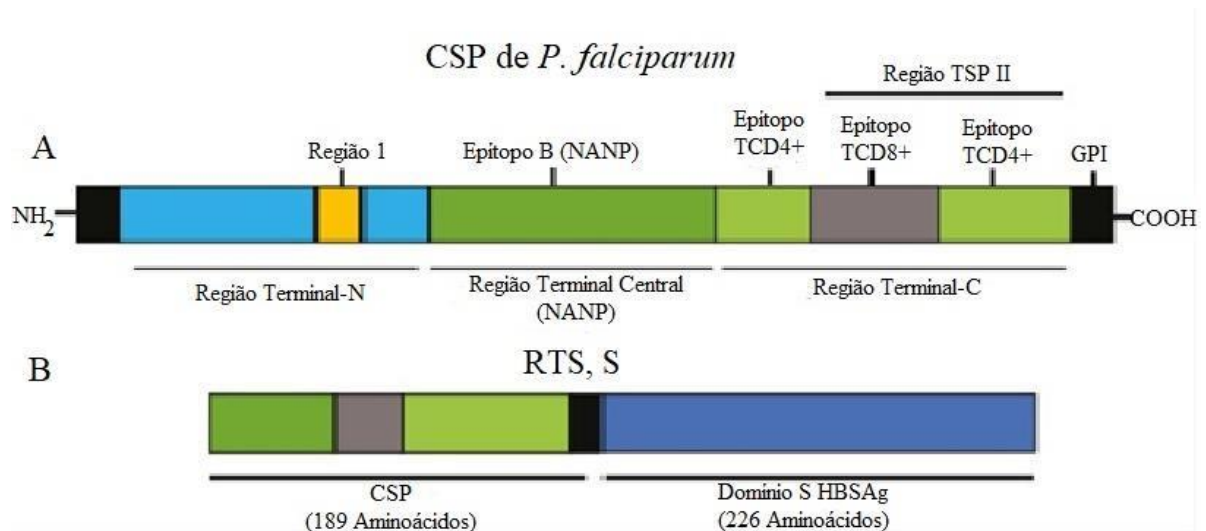
Posteriormente, em 1987, através de parceria com os laboratórios GlaxoSmithKline (GSK), o *Walter Reed Military Medical Center* se debruçou novamente em formulações vacinais para malária (CLYDE *et al*, 1971). Os sucessivos anos de estudo com antigas formulações, assim como os diversos ensaios realizados por todos os pesquisadores que se dedicaram a estudar a imunologia da infecção malárica resultaram na primeira candidata vacinal antimalárica cancelada pela OMS.

Mais de 30 anos de trabalho, porém, foram necessários para que uma candidata vacinal chegasse às fases avançadas de teste clínico. Após diversas reformulações, a vacina RTS-S, contra *P. falciparum*, desenvolvida na Bélgica pelos laboratórios GlaxoSmithKline (GSK), conhecida popularmente como Vacina Mosquirix<sup>TM</sup>, iniciou em 2009 os estudos de fase três em países do continente africano, sendo até então a candidata vacinal mais promissora para utilização em escala global (CROMPTON; PIERCE; MILLER, 2010).

A formulação da vacina RTS, S foi redesenhada inúmeras vezes antes de alcançar a formulação atual. A molécula proveniente do parasito sempre foi a CSP, porém essa já foi conjugada com outras partículas, como epítomos advindos de toxóide e outros adjuvantes, como o alumínio (ALMEIDA *et al*, 2021)

Atualmente, a vacina tem sua formulação baseada em uma porção da região central da CSP, composta pelas últimas 18 seqüências de aminoácidos da porção NANP (reconhecível por células B), além da região conhecida como Terminal-C (composto por três epítomos reconhecíveis por células T), totalizando 189 aminoácidos. Como molécula carreadora, que foi fundida na porção CSP, têm-se 226 aminoácidos do antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBsAg) (ALMEIDA *et al*, 2021).

**FIGURA 4- Comparação entre CSP (*P. falciparum*) e RTS, S**



Fonte: Adaptado de Almeida *et al*. (2021)

Além dessa estrutura molecular, utiliza-se ainda um composto adjuvante. Diversos foram testados ao longo dos anos de desenvolvimento e reestruturação. Cada um deles passou por testes pré-clínicos e alguns chegaram mesmo a ensaios clínicos, porém a formulação mais promissora é a AS01 (ALMEIDA *et al*, 2021).

Os resultados obtidos indicaram que a formulação RTS, S/AS01 era mais imunogênica que as outras testadas, incitando maior resposta específica advinda de linfócitos T perfil Th1 (STEWART *et al*, 2006). Com isso, a formulação supracitada foi levada adiante em ensaios clínicos, que chegaram até a fase três com resultados promissores. Os ensaios foram conduzidos em oito países da África Sub-Sahariana, com centenas de voluntários de idade entre seis semanas de vida até 17 meses. A escolha da faixa etária característica do público infantil reflete a necessidade de imunobiológicos eficazes no grupo populacional mais

vulnerável a quadros graves da doença (THE RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP, 2014).

Os resultados após esquema vacinal de três doses gerou dados que apontam a eficácia da vacinação em desenvolver proteção mesmo após um ano de última dose. Após esse período de tempo, porém, as taxas de imunoglobulinas com boa eficácia e força de ligação com seus antígenos específicos (derivados da CSP) são reduzidas. As subclasses de anticorpos mais geradas são IgG1 e IgG3 (em geral, associados a resposta contra antígenos protéicos), enquanto as subclasses IgG2 (relacionada a resposta contra antígenos polissacarídicos e de carboidratos) e IgG4 (relacionada a processo alérgicos) não são as imunoglobulinas melhor desenvolvidas, se apresentando em menores níveis. Além disso, o ensaio ainda verificou a existência de alguns efeitos adversos como dor e inchaço no local de aplicação da vacina, além de febre. Esses efeitos, porém, são semelhantes aos desenvolvidos por outras vacinas aplicadas nesse mesmo público, não representando perigo ou ameaça que supere os benefícios proporcionados pela vacinação (DOBAÑO *et al*, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Mesmo que essa formulação não apresente uma boa imunogenicidade por um período maior de tempo, além de sua eficácia durar aproximadamente um ano (com proteção variável entre 31,3% no público entre 6 e 12 semanas de vida e 55,8% no público entre 5 e 17 meses), ela permanece a única vacina comprovadamente eficaz em reduzir a mortalidade e taxas de internação por malária no público infantil. Sua utilização em território africano pode representar um avanço significativo no combate ao parasito e na luta contra os altos índices de morte infantil. (RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP, 2015).

Os ensaios ainda ativos estudam a aplicação de uma terceira dose atrasada e fracionada. Essa estratégia, em estudos preliminares, demonstrou eficácia de 87% em adultos sem exposição prévia com malária, após infecção de prova. Atualmente verifica-se essa eficácia em crianças de Ghana e do Kenya (DATOO *et al*, 2021).

Outros ensaios com novas candidatas vacinais são importantes para aumentar a gama de ferramentas contra a infecção, de forma que não exista apenas uma possível vacina nas expectativas dos cientistas. Problemas envolvendo a produção em larga escala da RTS,S/AS01 preocupam a comunidade científica, no sentido de apenas uma empresa ser licenciada para a produção do adjuvante AS01, limitando a escala produtiva. O baixo fornecimento de adjuvante, um composto essencial para a formulação vacinal, pode ser apresentado como um fator de complexidade, dificultando a utilização da tecnologia (MOORTHY; BINKA, 2021).

No último ano, em alternativa ao uso de RTS,S/AS01, uma nova candidata demonstrou-se uma boa alternativa: a R21/MM. A formulação, também baseada na proteína CSP, alcançou eficácia de 77% em ensaio clínico fase dois, que utilizou voluntários com idade entre cinco e 17 meses de idade. O ensaio foi performed com o período de acompanhamento dos voluntários pós-vacinação de 12 meses (DATOO *et al*, 2021).

Sua estrutura compreende uma proteína recombinante HbsAg (Antígeno do Vírus da Hepatite B) fusionada com a Região Terminal Central e Região Terminal C de CSP e com a Região Terminal N de HbsAg. Essa formulação é complementada com um adjuvante à base de saponina, chamado de Matrix-M (DATOO *et al*, 2021). Os resultados obtidos superam a eficácia máxima (55,8%) obtida pela candidata RTS,S/AS01, sendo a R21 a primeira vacina a preferir este nível de eficácia em crianças (RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP, 2015; DATOO *et al*, 2021). Essa candidata apresentou ainda menos efeitos adversos, como dor no local de aplicação e febre, que a RTS,S (DATOO *et al*, 2021).

Após resultados favoráveis em fase dois, a candidata avançou para fase três de ensaio clínico (DATOO *et al*, 2021). Pode-se dizer que, em perspectiva, essa vacina poderia substituir a utilização de RTS,S, no futuro.

#### **4 A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL E BIOMODELOS**

O uso de biomodelos na ciência contemporânea, debruçada em estudar o funcionamento morfológico e fisiológico do organismo humano, data da Antiguidade Grega, com pensadores como Aristóteles, Galeno e Hipócrates. Através da aplicação de animais em suas pesquisas biomédicas, estudos da estrutura e funcionamento de órgãos, a compreensão de fenômenos como a respiração, a digestão e o entendimento dos sistemas sanguíneos, tornaram-se possíveis. Nota-se que esse período é anterior ao início da Era Cristã (ANDRADE, 2002).

De acordo com SANTOS (2002), o homem, nos primórdios da Antiguidade, propunha o uso de animais - pensa-se animais como "cobaias" - com a lógica da inferioridade animal, em que quaisquer outros seres vivos, além do homem, seriam menos evoluídos. Dessa forma, a experimentação receberia legitimidade natural.

Essa lógica se manteve vigente durante muitos anos, a partir da perpetuação do ideal de que animais seriam seres incapazes de ter sensações de mesma maneira que humanos. A visão de que animais são seres à parte, ou seja, diferentes dos homens, foi utilizada como base para a manutenção do uso indiscriminado e não fundamentado de animais na pesquisa científica (RIVERA, 2002).

Foi somente a partir do surgimento de movimentos de defesa dos direitos dos animais, iniciados indiretamente com os estudos evolutivos de Charles Darwin, que postulavam que os humanos seriam animais evolutivamente próximos aos primatas, que a ideia de estender os conceitos de ética humana até os animais entrou em parte dos debates públicos (RIVERA, 2002).

Durante o Séc. XIX, na Inglaterra, nasceram os primeiros grupos que lutavam pela adesão do uso de anestésicos nos procedimentos em pesquisa em que seriam utilizados animais. Logo após o surgimento dessas organizações, essa prática se estendeu pelo Continente Europeu, chegando na Alemanha, na França e em outros países. A partir daí o ideal de superioridade humana acerca dos demais animais existente começa a ser posto de lado pela comunidade científica ao redor do mundo. O Reino Unido, como local de pioneirismo na instituição de técnicas que possibilitam a melhoria das condições de experimentação e de bem-estar animal, caracteriza-se como o “berço” do bem-estar animal. (RIVERA, 2002).

Ao longo desse processo, governos passaram a complexificar, dar origem à legislações acerca do uso de animais, ou ao menos alterar a forma de enxergar os animais na lógica da pesquisa. Nos Estados Unidos, por exemplo, surgem leis que conferem aos animais direitos de garantia das suas necessidades naturais da espécie. Essas leis visam também à proteção contra maus-tratos e agressões físicas. Na Grã-Bretanha também surgem legislações com configuração semelhante. No país, ao contrário dos EUA que visam prover direitos aos animais, a legislação se baseia na atribuição de deveres e responsabilidades ao experimentador e aos donos de animais, no sentido de responsabilizá-los por possíveis maus tratos sofridos pelo animal sob sua guarda (RIVERA, 2002).

Já nos tempos modernos, com o início dos estudos na área da bacteriologia, o uso de animais passou a ser encarado como uma ferramenta, ou artefato necessário para a compreensão de fenômenos biológicos. Com os estudos de Pasteur e Koch, datados do século XVIII, o uso de lagomorfos, e roedores se instaurou como base no universo da experimentação. A utilização desses animais tem tamanha significância que, foi através de sua utilização que imunobiológicos contra a Raiva e o Carbúnculo surgiram (ANDRADE, 2002).

Com a evolução da ciência, cada vez mais amparada em estudos comparativos animal-homem, a ciência de biomodelos se firmou como base para grande parte das pesquisas. Tal fenômeno se intensificou com a necessidade de animais cada vez mais específicos, com características sanitárias e genéticas confiáveis. Dessa forma, os animais foram padronizados quanto à sua estrutura filogenética, alinhada com a identificação das patologias presentes, ou ausentes, em seus organismos. Surgem então os biomodelos SPF (*Specific Patogen Free*), gnotobióticos (com microbiota conhecida), e os animais *germfree* (em tradução literal, ausente

de germes) (ANDRADE, 2002).

Com esses debates, o maior questionamento na utilização de animais na pesquisa biomédica surge: existe legitimidade na utilização dos animais? A partir disso a ideologia vigente se estabelece, de forma a manter aceso durante todo o tempo o objetivo de relacionar a necessidade da pesquisa com as condições às quais os animais serão expostos, assim como a possibilidade de gerar produtos benéficos ao homem e/ou ao animal. O animal é, portanto, visto como parte integrante do processo de desenvolvimento científico, merecedor de atenção e cuidado no desenho de quaisquer processos de experimentação (RIVERA, 2002).

Porém, a utilização dos animais como parâmetro ético obrigatório em contexto anterior a exposição de humanos aos procedimentos clínicos na experimentação em pesquisa nem sempre foi uma realidade. Um dos horrores registrados durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945) foi a utilização de seres humanos como modelos experimentais por médicos da Alemanha Nazista. Após o final do período de guerra, os médicos responsáveis pela experimentação foram julgados por esses crimes, reconhecidos mundialmente como atrocidades. Um dos resultados do julgamento foi o documento conhecido como Tratado de Nuremberg (1947), um conjunto de 10 princípios éticos na experimentação e pesquisa científica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

O documento foi criado com o intuito de garantir a integridade, saúde e dignidade dos indivíduos voluntários em pesquisa clínica, para que não mais ocorram as violações de direitos humanos observadas durante o período de guerra. O terceiro item do documento aborda e institui, então, que a utilização de animais como modelos necessários em etapa prévia aos ensaios é um dos pontos indispensáveis para a garantia da segurança e da ética em pesquisa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

“O experimento deve ser baseado em resultados de experimentação em animais e no conhecimento da evolução da doença ou outros problemas em estudo; dessa maneira, os resultados já conhecidos justificam a realização do experimento.” (Tratado de Nuremberg, item 3, 1947)

A partir deste documento, diversos códigos de ética em instituições de pesquisa clínicas foram instituídos, estabelecendo então, de fato, a utilização prévia de animais como obrigação ética de toda experimentação. No Brasil, um reflexo disso foi a instituição da Resolução N° 01 (1988), pelo Conselho Nacional de Saúde, em que pela primeira vez um órgão público brasileiro instaura normas éticas na experimentação (SCHUELER, 2020).

Porém, na lógica de manter a utilização de animais em níveis não exagerados, estabeleceu-se em 1959, por Russel e Burch, a teoria dos três “Rs” (*reduction, refinement, replacement*). Em tradução, utiliza-se a ideia da redução, do refinamento e da substituição. Com isto, reduz-se o número de animais utilizados ao mínimo para que a pesquisa se

mantenha viável, assim como se refina o método de experimentação para que o animal sofra o menos possível. O último “R” se refere a não utilização do modelo animal, caso haja alguma técnica ou plataforma alternativa ao seu uso, como cultura de células *in vitro*, por exemplo (MOLINARO *et al*, 2009).

Segundo SANTOS (2002. p. 23), o modelo animal “era aquele animal que melhor respondia ao experimento e possibilitava a sua reprodução, de maneira que qualquer pesquisador pudesse ter acesso aos mesmos resultados.” Essa definição norteia o uso de animais, que deve ser baseado na escolha correta do modelo para que a experimentação ocorra da maneira desejada e possibilite sua reprodutibilidade, obtendo dados concordantes, independentemente da equipe responsável ou do local de realização.

Animais também podem ser utilizados com o objetivo, não de entender os efeitos de uma tecnologia, mas sim de compreender a evolução de uma doença. Eles são utilizados para estudos de determinadas infecções para que voluntários humanos, no caso de uma tecnologia voltada para esse público, não sejam postos em risco, ou sejam afetados negativamente. Tem-se que a finalidade da pesquisa biomédica é a geração de tecnologias benéficas ao homem e aos próprios animais. Dessa forma, percebe-se que a utilização de animais de laboratório se fixa com o intuito de prover o resultado de pesquisa, de forma a não expor os homens, ou os animais, aos perigos de substâncias ou técnicas ainda não compreendidas. Qualquer substância, que tenha por princípio a inoculação em humanos, precisa de estudos, denominados Pré-Clínicos, em animais de laboratório (ANDRADE, 2002).

Como fruto dessa condição estabelecida, se pensa então na necessidade de minimizar o sofrimento animal, utilizando, segundo RIVERA (2002), o menor custo de vida e o maior conforto animal para o ganho em conhecimento, esse que deve beneficiar tanto humanos quanto animais. A partir da autora, se estabelece a necessidade de equilibrar esses “valores opostos”.

Somente após resultados favoráveis em animais, drogas, moléculas vacinais, ou quaisquer novas tecnologias, poderão ser submetidas aos testes de desenvolvimento de natureza clínica. Essa fase, conhecida então pela utilização de grupos humanos, se subdivide em fases um, dois, três e quatro. O estudo Clínico inicia-se na fase um, com um grupo candidato humano de porte reduzido. Essa fase busca averiguar a segurança do composto, além da natureza e características da resposta imune induzida. Caso esse estudo obtenha resultados promissores, o mesmo avançará para as fases seguintes, dois, três e quatro, com grupos candidatos que possuem número de participantes crescente (FERNANDES *et al*, 2021).

A experimentação animal é regida por legislações nacionais e internacionais, elaboradas e mantidas por órgãos responsáveis na área de monitoramento das condições de experimentação. Da mesma forma que os protocolos de pesquisa com seres humanos são submetidos à um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e à instância máxima Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CONEP), os protocolos de utilização de animais devem ser submetidos à uma Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Além disso, no Brasil existe ainda uma organização máxima que rege a utilização e o manejo de animais na pesquisa científica, o Centro Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Esse órgão vinculado ao Governo Federal é responsável por emitir normativas que regulam o uso de animais nos experimentos em andamento, se caracterizando como um órgão deliberativo e consultivo acerca da aplicação de biomodelos. O CONCEA também é responsável por estabelecer as normas de regulamentação necessárias para a manutenção de biotérios de todas as naturezas (criação, manutenção e experimentação). Como função primordial, esse órgão também regula quais são os protocolos experimentais passíveis de utilização no país (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO/SBCAL).

A criação do CONCEA ocorreu a partir do sancionamento da Lei N° 11.794, de 8 de outubro de 2008. Conhecida como Lei Arouca, essa lei, composta por 27 artigos, foi um divisor de águas no que tange a utilização de animais em pesquisa e seus parâmetros éticos de experimentação. Com isso, órgãos regulatórios como o próprio CONCEA e as CEUAs adquiriram protagonismo no credenciamento e aprovação de estudos utilizando modelos animais, respectivamente.

O procedimento de padronização e regulação dos protocolos experimentais aceitos em território nacional tem como objetivo garantir o bem-estar dos animais utilizados em ensaios pré-clínicos no Brasil. Os parâmetros preconizados abrangem desde a manutenção de boa alimentação e hidratação no ambiente de experimentação, até mesmo a prevenção de enfermidades indesejadas, dor, desconforto advindo de falta de espaço para movimentação, assim como a utilização de enriquecimentos ambientais (MOLINARO *et al*, 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece padrões e requisitos mínimos necessários para que novas drogas ou candidatas vacinais sejam licenciadas. Todo o processo pode durar anos, comumente de seis a oito anos, onde diversos compostos são rejeitados, ou aprovados, dependendo das necessidades sanitárias pré-estabelecidas pelos especialistas que compõem o órgão (FERNANDES *et al*, 2021). A ANVISA exige, para a aprovação de vacinas, que quaisquer candidatas vacinais passem por ensaios pré-clínicos e, posteriormente, por três fases de ensaios clínico (ANVISA, 2020). Caso exista interesse na exportação de uma dada tecnologia, a sua aprovação por agências

internacionais como pela *Food and Drug Administration (FDA)* e *European Medicines Agency (EMA)*, nos Estados Unidos da América e na União Europeia, respectivamente, pode ser necessária (FERNANDES *et al*, 2021).

Dentre as diversas opções de biomodelos disponíveis para os diferentes patógenos e metodologias de pesquisa – voltadas para estudos de aquisição de imunidade, de entendimento de ciclo biológico, de avaliação pré-clínica de moléculas vacinais candidatas e até mesmo de sequelas pós-infecção – comumente se iniciam os ensaios com biomodelos de pequeno porte, como os modelos murinos (camundongos e ratos), por exemplo (PRATT-RICCIO *et al*, 2021).

Esses modelos, além de possuírem tamanho reduzido, facilitando estruturalmente sua contenção, alimentação e manuseio, possuem longevidade razoavelmente curta, além de rápido período gestacional, o que impulsiona sua reprodução em biotérios. Porém deve-se atentar que, modelos murinos convencionais não são capazes de reproduzir infecções maláricas com *Plasmodium* clássico de infecção humana. Para que esses animais consigam sustentar a infecção por plasmódios humanos, é necessário utilizar estratégias de humanização, obtendo camundongos humanizados, ou seja, quimeras. Existem alguns modelos de camundongo quimera para *P. falciparum* (MOROSAN *et al*, 2006) e *P. vivax* (LUIZA-BATISTA *et al*, 2022), porém determinados modelos podem apresentar insuficiências, como apenas sustentar uma determinada etapa de desenvolvimento do parasito (MOROSAN *et al*, 2006). Diante disso, esse tipo de abordagem ainda necessita de mais avaliações e aperfeiçoamentos.

Nesse sentido, o estudo da infecção malárica em modelo experimental convencional não humanizado se dá com os próprios protozoários murinos. (PRATT-RICCIO *et al*, 2021) Esse fator torna seus resultados não homólogos, ou seja, não relacionados diretamente à realidade de infecção malárica da espécie humana. Não são, portanto, os animais indicados para estudos de substâncias que são visados para uso humano, como em ensaios pré-clínicos de molécula vacinal candidata (PRATT-RICCIO *et al*, 2021).

Isto esclarece a necessidade de modelos cujos resultados possam ser comparados à realidade das infecções e características patológicas da malária em humanos. Para essa conjuntura, faz-se uso dos modelos PNH. Esses animais apresentam estrutura fisiológica, morfológica e genética semelhante aos humanos, sendo então modelos especiais e capazes de prover os resultados de experimentação similares à realidade humana. Isto se soma a capacidade de alguns modelos primatas de desenvolverem a doença provocada pelos próprios protozoários causadores da malária humana, desenvolvendo características patológicas semelhantes às observadas nos indivíduos humanos (PRATT-RICCIO *et al*, 2021).

## 5 O MODELO ANIMAL PRIMATA NÃO HUMANO

Ao passo que estudos evolutivos se iniciam, surgem também esforços para relacionar os animais, de maneira a determinar grupos semelhantes ao homem. Nesse sentido, animais com características morfofisiológicas e genéticas semelhantes aos seres humanos passaram a ser utilizados como base comparativa para aplicações e eventos que correspondam à realidade humana. Os animais mais próximos ao homem nessa classificação, conhecida como Classificação Taxonômica, são os PNH (ANDRADE *et al.* 2010).

Esses animais se localizam na mais elevada ordem de mamíferos, dividindo espaço apenas com o homem. Apresentam como área de origem a faixa tropical do planeta, abrangendo as Américas central e sul, o continente africano e o continente asiático. O país que abriga a maior riqueza primatológica é o Brasil, abrigando enorme diversidade ecológica e genética desses animais (MOLINARO *et al.*, 2009).

Esses animais, da ordem Primatas, se dividem em dois grupos (subordem): Prosimii e Anthropeidea; O grupo dos Prosimii abarca os primatas encontrados na Ilha de Madagascar, além da porção continental do continente africano e em algumas ilhas e países do continente asiático. Evolutivamente, pode-se dizer que são menos evoluídos, quando comparados aos primatas pertencentes ao grupo Anthropeidea, apresentando características físicas como o focinho alongado, olfato desenvolvido e cérebro de menor proporção (PISSINATTI; GOLDSCHMIDT; SOUZA, 2010).

A subordem Anthropeidea, mais evoluída, agrupa primatas que desenvolveram sua visão, seu corpo (de maior porte e com mãos e pés desenvolvidos para a habilidade de manusear objetos) e seu cérebro, porém perdendo parte de sua capacidade olfativa ao passo que sua face se encurta. Essa subordem se subdivide, ainda, em dois outros grupos: os Primatas do Novo Mundo e os Primatas do Velho Mundo, ou respectivamente Platyrrhini e Catarrhini (PISSINATTI; GOLDSCHMIDT; SOUZA, 2010).

Os primatas são animais de grande complexidade social, onde a lógica de convivência e reprodução de cada espécie deve ser respeitada, mesmo em cativeiro/experimentação, de modo com que os hábitos naturais de cada animal não sejam alterados, gerando estresse e irregularidades nos processos de experimentação. Alguns grupos animais vão se organizar em grupos maiores ou menores, com dominância de macho único para diversas fêmeas ou não, além de preferências e adaptações alimentares próprias (MOLINARO *et al.*, 2009).

Segundo Andrade (2002) devido sua “homologia” com o homem, esses animais passaram a ser criados em cativeiro, com o objetivo de utilização em pesquisa, desde a área de pesquisa imunológica, até o entendimento de fenômenos de contágio. Esses mamíferos, assim como os seres humanos, pertencem à ordem *Primates*. Essa ordem abriga desde o PNH mais simples, até o primata mais evoluído, o homem (*Homo sapiens sapiens*).

A partir dos estudos de Wilson e Reeder, em 1993, foi possível entender que existia imensa riqueza primatológica na natureza, cerca de 270 espécies e subespécies primatas. Dessa forma, cada animal apresenta suas particularidades morfológicas e filogenéticas, servindo como base para variados estudos em áreas da biotecnologia, medicina, medicina veterinária e biomedicina, assim como áreas da farmacologia. No início da difusão do uso de PNH, as áreas que mais se utilizavam desses modelos eram a fisiologia, a bioquímica, a oncologia, o estudo de doenças infecciosas e os estudos da biologia de PNH (PISSINATTI; ANDRADE, 2010).

Os principais primatas utilizados em pesquisa, em geral, são o *Chlorocebus aethiops* (Macaco-Verde Africano), *Macaca mulatta* (Rhesus) e *Macaca fascicularis* (Cynomolgus) quando se trata de Primatas do Velho Mundo. Esses animais são utilizados principalmente na área da microbiologia e da virologia, em especial tratando-se de estudos com HIV/AIDS, em pesquisas de neurociência e também de bioquímica/química (CARLSSON *et al*, 2004).

Os modelos primatas podem ser entendidos em três grandes grupos: os Grandes Primatas, ou *Apes*, os Primatas do Velho Mundo e os Primatas do Novo Mundo, ou Neotropicais (CARLSSON *et al*, 2004).

Os PNH são encarados como os animais nobres da experimentação. Esses modelos, por serem classificados como “não convencionais”, são dotados de pesadas legislações, que apenas legitimam sua utilização a partir de comprovações contundentes que apenas esses modelos são capazes de prover a melhor resposta para a pergunta que esteja sendo feita em uma pesquisa de experimentação (RIBEIRO-ANDRADE, 2002).

Após constatação de que apenas esses modelos podem responder às perguntas feitas em dada pesquisa, a seleção da espécie utilizada dependerá diretamente do cunho adotado pelo ensaio. Caso se deseje realizar um ensaio baseado na utilização de agentes etiológicos de doenças tropicais, os melhores primatas são os neotropicais, modelos que comprovadamente são melhor adaptados a esses tipos de enfermidade (RIBEIRO-ANDRADE, 2002).

Esses modelos apenas serão utilizados caso modelos convencionais, como camundongo e lagomorfos, não possam ser aplicados em dada experimentação. Seguindo a tendência de proximidade com a espécie humana, os modelos primatas podem simbolizar, também, alto risco biológico, principalmente em seu manuseio. Por isto, o acondicionamento desses animais tende a ser mais custoso financeiramente, em virtude das necessidades específicas de temperatura, luminosidade, umidade e mesmo de espaço físico, específicas para cada espécie. Deve-se ter em mente que o sucesso de processos de experimentação com esses animais está diretamente relacionado com a qualidade do manejo realizado, assim como as práticas de vigilância sanitária realizadas a partir de constantes avaliações clínicas e laboratoriais dos animais em cativeiro, garantindo sua plena saúde e condições de vida

(RIBEIRO-ANDRADE, 2002).

Além dos fatores ligados à segurança (para animal e experimentador), existem, também, as necessidades de enriquecimento ambiental adaptadas para cada uma das espécies de primata. Esses fatores influenciam para a redução do estresse associado ao processo de experimentação ou do manejo em cativeiro (RIBEIRO-ANDRADE, 2002).

Manter os modelos animais com as menores taxas de estresse é necessário, tendo em vista que esse é um fator determinante para o surgimento de patologias capazes de prejudicar a saúde da colônia ou do grupo de animais utilizados na pesquisa (RIBEIRO- ANDRADE, 2002).

Como esses animais apresentam diversas espécies em contexto de experimentação, dependendo do agente etiológico a ser utilizado, suas características e necessidades mínimas podem variar. A literatura abarca desde PNHs que apresentam como peso normal menos de 1.000 gramas, até animais de mais de 25.000 gramas, necessitando de 150cm<sup>2</sup> até 750cm<sup>2</sup> de piso em gaiola. Além disso, a altura mínima em centímetros recomendada das gaiolas de manutenção desses animais em laboratório pode variar de 50,8cm até mais de 90cm. Cada experimentação necessita de um modelo animal específico, que deve ter suas necessidades mínimas atendidas de acordo com os órgãos regulatórios (MOLINARO *et al*, 2009).

Obedece-se a lógica de que quanto maior o animal, maior seu espaço e necessidades alimentícias necessárias. Isto deve ser levado em conta também para o planejamento de custos de um projeto de experimentação que vá manter grupos animais por longos períodos de tempo (MOLINARO *et al*, 2009).

### 5.1 *Apes* (Grandes Primatas)

Os *Apes* seriam os melhores modelos, em especial para ensaios pré-clínicos de molécula vacinal, em vista que dentre os primatas, são os animais mais próximos aos humanos. Porém, apresentam rigorosa legislação de uso, sendo mesmo proibidos de serem utilizados na maioria dos países. Sua dificuldade de manuseio também é relevante, pois apresentam grande porte, necessitando de espaços significativos, além de maior quantidade de alimento. São animais de baixa fecundidade, o que dificulta sua reprodução em cativeiro. Além disso, em quase totalidade, se encontram em perigo de extinção na natureza. Todas essas características os tornam animais de alto custo. Por isso, não são amplamente difundidos em experimentação (PRATT-RICCIO *et al*, 2021).

## 5.2 Primatas do Velho Mundo

Esses animais, da subordem Catarrhini, podem ser encontrados no território que compreende o continente africano, assim como em parte do continente asiático e suas ilhas. Além disso, existem na região de Gibraltar (*Macaca sylvanus*), após uma provável introdução artificial originária do norte do continente africano, e no Japão (duas subespécies de *Macaca fuscata*) (PISSINATTI; GOLDSCHMIDT; SOUZA, 2010).

Essa subordem foi muito estudada, sendo rearranjada em 2001, quando GROVES (2001) classificou as principais famílias como Cercopithecidae, Hylobatidae e Pongidae-Hominidae (classificados juntos). A família Cercopithecidae agrupa os gêneros mais utilizados em pesquisa, destacando o gênero *Macaca* e *Papio*). Essa família apresenta morfologicamente dois pré-molares, além de dentes cúspides reunidos em transversal. Sua dentição, em geral, é maior em machos e sua locomoção é quadripedal. Podem não apresentar cauda, como nos representantes de Hominidae (*Pongo*, *Gorilla*, *Pan* e *Homo*). Em alguns animais pode-se observar também tuberosidades isquiáticas (*Macaca*, *Cercopithecus* e *Papio*) e/ou inchaço vulvar e secreção no período reprodutivo (PISSINATTI; GOLDSCHMIDT; SOUZA, 2010).

Os principais primatas utilizados são *Macaca mulatta* (rhesus) e outras espécies como *M. fascicularis* e *M. nigra*, assim como *M. nemestrina*, mesmo que em proporções menores quando comparadas às primeiras espécies citadas do gênero *Macaca* (gênero mais significativo e utilizado na pesquisa médica). Esses animais foram capturados em larga escala, muitas das vezes com o intuito de utilização em fundação de colônias para abastecer a enorme demanda dos laboratórios de experimentação. Esse processo resultou na preocupante situação atual, em que diversas espécies desse gênero se encontram sob risco de extinção em seu habitat natural (PISSINATTI; GOLDSCHMIDT; SOUZA, 2010).

Os primatas do velho mundo, mesmo sendo alternativas ao uso dos grandes primatas, também encontram barreiras semelhantes. Embora sejam menores que os apes, e mais acessíveis em matéria de custo de aquisição e manutenção, ainda necessitam de espaços e condições de habitação significativas. Além disso, ainda apresentam alta expectativa de vida e longos períodos de gestação. Também são animais classificados como de cara manutenção em experimentação e mesmo em criação (PRATT-RICCIO *et al*, 2021).

## 5.3 Primatas do Novo Mundo

Os Platyrrhini são animais que ocorrem na região neotropical do globo, que se estende do norte da Argentina até o sul do México, abrangendo a maior parte da América do sul e central. As cinco famílias principais que compreendem essa subordem são: Callitrichidae, Cebidae, Aotidae, Pitheciidae e Atelidae (PISSINATTI; GOLDSCHMIDT; SOUZA, 2010).

As principais características que definem esses primatas são a presença de três pré-molares, nariz achatado com narinas abertas para os lados e cauda longa. Os Cacajao são exceção, pois apresentam cauda encurtada e preênsil em alguns gêneros (PISSINATTI; GOLDSCHMIDT; SOUZA, 2010).

## 6 PRIMATAS NÃO HUMANOS NA PESQUISA EM MALÁRIA

No contexto de experimentação com parasitos causadores de malária, os símios utilizados dependerão da natureza da pesquisa a ser realizada. A descoberta de infecções maláricas em Orangotangos (por *Plasmodium pitheci*) na natureza, por Laveran em 1905, foi essencial para o início dos estudos acerca da inoculação de parasitas em primatas, já que mostrou que PNH poderiam servir como modelos de estudos da doença. Logo em seguida, outras espécies de primatas foram encontradas em processo de parasitismo por *Plasmodium* spp. (HALBERSTADTER; VON PROWAZEK, 1907).

Foram observados pela primeira vez, o *Plasmodium inui* e o *P. cynomlgi* em *M. fascicularis* e, desde então, cerca de nove espécies de plasmódio simianos já foram descritas, incluindo duas espécies de primatas neotropicais (do Novo Mundo), duas espécies em Lêmures em Madagascar e uma espécie parasitando Macacos Verde Africano (MARTINELLI; CULLETON, 2016).

O Chimpanzé (*Pan troglodytes*) é um modelo possível, já que pode ser infectado por inoculação de todas as espécies de *Plasmodium* conhecidas por causar malária em humanos, com a exceção apenas do *Plasmodium knowlesi*. Seu uso, porém, é proibido, assim como o uso de todos os outros *Apes*, pela União Europeia. Nos Estados Unidos seu uso também é restrito (ALTEVOGT *et al*, 2012).

**FIGURA 5- Fotografia de Chimpanzé (*Pan troglodytes*)**



Fonte: Aaron Logan (2014)

Esse primata foi utilizado por Daubersies *et al* (2002), em ensaio pré-clínico para a avaliação da imunogenicidade de moléculas baseadas em Antígeno de Estágio Hepático 3 (LSA-3) de *P. falciparum*. Nove animais foram utilizados e em seis deles foi constatada a formação de resposta protetora após a realização da prova de infecção (desafio) com inoculação de esporozoítos viáveis.

Ainda dentre os Primatas do Velho Mundo, o Rhesus também pode ser utilizado em ensaios vacinais. Em 1945, o grupo de Freud (1945), que realizou ensaios vacinais em patos (já debatido no capítulo 3), realizou novos testes, dessa vez com *P. knowlesi*, utilizando a mesma lógica de formulação utilizada anteriormente. Os resultados obtidos, porém, foram concordantes com os testes realizados anteriormente no grupo experimental de patos no que tange a efeitos adversos (FREUD, 1945; ALMEIDA *et al*, 2021).

**FIGURA 6- Fotografia de Rhesus (*Macaca mulatta*)**



Fonte: Einar Fredriksen, 2009)

Ainda com esse modelo, Nussenzweig *et al* (1971) repetiu o ensaio experimental realizado em candidatos humanos. Os resultados obtidos foram semelhantes, o que confirma a capacidade do modelo em prover resultados com homologia ao homem (ALMEIDA *et al*, 2021).

O ensaio pré-clínico da candidata RTS,S, que obteve aprovação protocolar para a experimentação pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* (Comitê Institucional de Uso e Cuidado de Animais) no ano de 2006, também utilizou esse modelo. O objetivo do experimento era avaliar o melhor adjuvante para a formulação vacinal. Em macacos Rhesus, quatro formulações de adjuvantes foram testadas: RTS, S/AS01, RTS, S/AS02, RTS/S/AS05 e RTS, S/AS06 (STEWART *et al*, 2006).

Os primatas utilizados, de origem indiana, foram selecionados de acordo com seu status sanitário (SPF), não podendo ser portadores de retrovírus símio. Além disso, também não poderiam ter tido contato prévio com algum protozoário do gênero *Plasmodium*. Tinham cinco anos e meio de idade média e apresentavam peso médio de cinco quilogramas e quatrocentas gramas (STEWART *et al*, 2006).

Os animais, todos portadores de condições fisiológicas saudáveis, que totalizavam quarenta e oito primatas, foram divididos em seis grupos, cada um designado para uma formulação vacinal, além de um grupo utilizado para um esquema de vacinação especial (acelerado). Um dos grupos foi inoculado com solução salina, para atuar como grupo controle. Os animais foram agrupados de maneira a balancear a idade, gênero e peso nos grupos. Os testes foram randomizados e até o fim da pesquisa foi utilizada a lógica do duplo-cego (STEWART *et al*, 2006). Os resultados do ensaio já foram debatidos anteriormente.

Dentre os modelos primatas, apenas alguns neotropicais são capazes de serem utilizados como modelos símios em estudos que envolvam a inoculação de parasitos causadores de malária humana (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*). Em outros modelos, o protozoário precisaria ser adaptado, já que os parasitas humanos, em condições normais, não os infectariam. Apenas o protozoário *Plasmodium ovale* não se adapta aos modelos de PNH neotropicais. Todos os objetos de estudo envolvendo a maturação do protozoário em estágios extraeritrocítico ou eritrocítico, a formação de gametócitos, a capacidade de infecção por inoculação de esporozoítos ou por eritrócitos infectados, dependem diretamente da escolha do modelo condizente com a espécie de protozoário a ser inoculada (COLLINS, 1992; COLLINS, 2002).

Os primatas neotropicais, em geral de menor porte, com necessidade de menores volumes de alimento e dimensões menores de gaiola, quando comparados aos outros modelos primatas do velho mundo. Com isso, são as melhores alternativas devido seu manuseio facilitado. São animais amplamente difundidos na fauna Sul-Americana, especialmente em território brasileiro, onde grande parte desses animais não se encontra em perigo de extinção (PRATT-RICCIO *et al*, 2021).

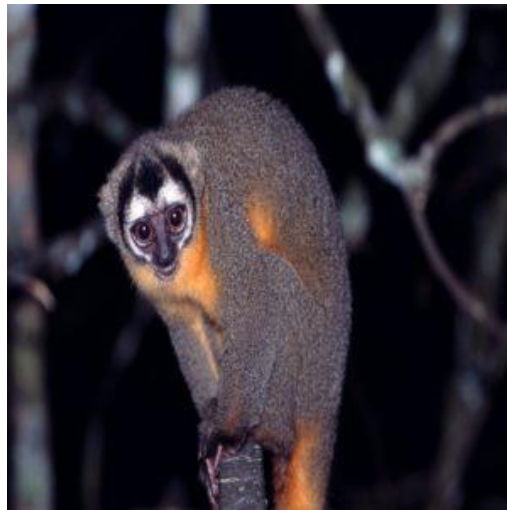
Os principais primatas desse grupo caracterizados pela capacidade de sustentar a infecção por plasmódios são os modelos do gênero *Saimiri* e *Aotus*, sendo esses primatas, inclusive, os modelos recomendados pela OMS para ensaios pré-clínicos de moléculas vacinais (PRATT-RICCIO *et al*, 2021).

O modelo do gênero *Aotus* se destaca, porém, como o melhor modelo símio para inoculação de esporozoítos ou eritrócitos infectados, devido à sua alta suscetibilidade de infecção por ambas as formas do protozoário. Isto ocorre tanto com parasitos *Plasmodium falciparum*, quanto *Plasmodium vivax*, sem que haja a necessidade de realizar a esplenectomia

no animal (HERRERA *et al*, 2002).

Animais da espécie *Aotus nancymai* não esplenectomizados foram utilizados por Hisaeda *et al* (2002), em ensaio pré-clínico de avaliação de imunogenicidade de candidatas vacinais baseadas nas moléculas MSP-1 e MSP-3. O ensaio consistiu na vacinação de dois grupos animais, com sete animais cada, com duas doses de imunizante. Após a realização da infecção de prova com a inoculação de eritrócitos infectados por *P. falciparum* cepa FVO, constatou-se que cinco dos sete animais imunizados com MSP-1 adquiriram proteção. Com relação aos animais imunizados com MSP-3, seis dos sete animais foram protegidos.

**FIGURA 7- Fotografia de Macaco-da-Noite (*Aotus infulatus*)**



Fonte: Centro Nacional de Primatologia (CENP)

Os modelos *Saimiri* spp também podem ser utilizados, provendo altas taxas de infecção por *P. falciparum* e *P. vivax* (COLLINS, 2002). Porém, a esplenectomia nesse modelo era um procedimento necessário para que o animal apresente alta parasitemia em inoculação de eritrócitos infectados (CONTAMIN *et al*, 2000).

**FIGURA 8- Fotografia de Macaco de Cheiro (*Saimiri sciureus*)**



Fonte: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio)

Com isso, Cunha *et al* (2017) propuseram uma nova estratégia para a obtenção de parasitemia significativa nesse modelo: a esplenectomia química como alternativa à cirurgia propriamente dita. A utilização de lipossomos clodronato como tratamento paralelo ao processo de infecção foi testada como possível estratégia alternativa à cirurgia de esplenectomia. O tratamento proposto, embora consiga reduzir a atividade celular contra formas do parasitário no tecido, mantém as funções fisiológicas gerais do órgão.

A molécula consiste em um envelope lipídico contendo um componente bifosfato que, ao ser fagocitado por macrófagos, pode induzir o perfil pró-apoptótico na célula ou inativam suas funções metabólicas. Esta droga mostrou resultados no processo de depleção de macrófagos e monócitos (CUNHA *et al*, 2017 apud VAN ROOIJEN; VAN NIEUWMEGEN, 1984; MATHES *et al*, 2006; KIM *et al*, 2008)

Os animais tratados com lipossomos clodronato apresentam maior parasitemia quando comparados com animais não tratados. Em conjunto, a fagocitose de hemozoína por leucócitos fagocíticos é menor em animais tratados (CUNHA *et al*, 2017).

Animais da espécie *Saimiri boliviensis* foram utilizados por Collins *et al* (2000), para a avaliação de imunogenicidade de candidatas vacinais baseadas nas moléculas RAP-1 (Proteína 1 Associada ao Rhoptry de *P. falciparum*) e RAP-2 (Proteína 2 Associada ao Rhoptry de *P. falciparum*), utilizando diferentes adjuvantes. Após a realização da infecção de prova, três dos seis animais vacinados com molécula híbrida de PfRAP-1 e PfRAP-2, com adjuvante Freund's, não necessitaram de tratamento com antimaláricos. Já quatro de seis animais vacinados apenas com RAP-2, com adjuvante Montanide ISA720, não necessitaram de tratamento.

Dentre os primatas do gênero *Aotus*, o *A. griseimembra* (encontrado principalmente no norte da Colômbia) se destaca como um modelo de alta capacidade de geração de infecção malárica, tanto por vias eritrocíticas (sangue infectado de um doador), quanto pela via de inoculação de esporozoítos. Esse animal, porém, é de difícil obtenção, sendo menos utilizado em pesquisa. Em paralelo, o modelo *A. infulatus* se destaca como um modelo de fácil obtenção no contexto da Amazônia Brasileira, sendo mais utilizado no Brasil para pesquisas de experimentação (PRATT-RICCIO *et al*, 2021).

Esse modelo, esplenectomizado ou não, pode prover bons resultados de parasitemia. É necessário pontuar, porém, que animais esplenectomizados podem não conseguir controlar o avanço da parasitemia, em vista que as células do baço são importantes agentes de resistência à infecção malárica. Nesse caso, pode ser necessária a utilização de drogas antimaláricas durante os procedimentos de experimentação. Já os modelos não esplenectomizados possuem a capacidade de regular naturalmente a parasitemia, mantendo-a em níveis baixos, embora

desenvolvendo quadros mais graves de anemia. Esses modelos podem servir, para além dos ensaios pré-clínicos vacinais, também para a análise do processo de desenvolvimento clínico de quadros de anemia grave, com queda de até mais da metade das taxas normais de hematócrito (HERSHKOVITZ, 1983) (COLLINS *et al*, 1996).

Os animais utilizados em pesquisa de infecção via inoculação de material infectado possuem ainda a tendência a adquirir imunidade, mesmo que parcial. Isto pode ser útil para a obtenção de soro rico em anticorpos (imunoglobulinas) necessários para ensaios imunológicos (PRATT-RICCIO *et al*, 2021).

Caminhando nesse sentido, foi possível analisar ao menos três possibilidades de uso para os modelos *Aotus*: utilização em ensaios pré-clínicos de candidata vacinal, utilização em inoculação de patógeno para a análise do processo infeccioso e obtenção de soro hiperimune (PRATT-RICCIO *et al*, 2021).

Esses animais podem ainda ser utilizados, a partir da aplicação de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em conjunto com o processo de experimentação com inoculação de patógeno, ou com a avaliação de imunogenicidade molécula vacinal. Isto pode ser feito para a avaliação dos processos de resposta inflamatória, humoral e celular na presença de antígenos e imunógenos. A PCR feita com primers específicos para genes relacionados a expressão gênica de moléculas do sistema imunológico, como a interleucina-12, ou o interferon-gama, pode ser utilizada visando compreender a produção dessas moléculas em estágios diversos do processo infeccioso. Essas informações podem servir para o entendimento do processo imunológico paralelo à geração de quadro patológico, contribuindo para a compreensão integral da infecção e seus fenômenos derivados (PRATT-RICCIO *et al*, 2021).

O desenho dos *primers* utilizados em PCR na lógica de análise da infecção malárica em modelos primatas *Aotus* e *Saimiri* poderia, em tese, ser feito com base na estrutura genômica humana, porém as diferenças filogenéticas, mesmo que poucas, entre humanos e primatas não humanos, interfere em sua eficiência. Nesse caso, o desenho dessas moléculas, pensando na estrutura genética própria e específica dos PNH a serem utilizados em determinada pesquisa, é necessário. Cada animal apresenta suas particularidades, sendo importante seu entendimento para a boa realização das práticas desejadas, prezando pela maior qualidade possível das respostas obtidas (PRATT-RICCIO *et al*, 2021).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos números ainda alarmantes de infecção e morte por malária, o desenvolvimento de vacinas desponta como estratégia chave no combate à doença, para além do tratamento com antimaláricos e combate vetorial com inseticidas de efeito residual. A grande questão debatida por pesquisadores que buscam candidatas vacinais para tal patologia é a dificuldade em desenvolver uma formulação ideal, ou seja, com capacidade de induzir resposta celular e humoral robustas que consigam propiciar uma imunidade esterilizante nos pacientes imunizados.

A dificuldade do desenvolvimento dessa tecnologia repousa em diversos fatores intrínsecos do patógeno – como a grande diversidade antigênica e molecular do parasito, capaz de evadir a resposta imunológica, – específicos da escolha do modelo animal – a partir das características de experimentação peculiares de cada modelo – e particulares de cada paciente – levando em consideração características endógenas e exógenas –, como status imunitários e nível de exposição aos antígenos parasitários, a partir da região de moradia.

Adicionalmente, os parasitos do gênero *Plasmodium* possuem uma enorme diversidade molecular, de forma que cada cepa do parasito induz um perfil imunológico que dificilmente protegerá contra outras cepas ou outras espécies. Além disso, a dificuldade na aquisição de qualquer grau de imunidade, fazendo com que apenas pacientes intensamente expostos à infecção por um grande período, é um ponto que não pode ser deixado de lado no estudo da imunologia da malária. Com isso, pode-se dizer que uma boa molécula vacinal, com pretensão de induzir resposta imune para mais de uma espécie do parasito, deveria conter antígenos múltiplos, ou seja, imunógenos que correspondam a diferentes estruturas parasitárias de espécies diversas. Porém, a principal necessidade de uma candidata vacinal é a capacidade de proteger contra a infecção por *P. falciparum*, principal agente causador de mortes por malária no mundo.

Em paralelo, a escolha do modelo experimental a ser utilizado em ensaios experimentais depende de fatores como a presença ou não de pesada legislação e complexa norma de experimentação, a capacidade de custeio dos animais e de suas necessidades de vida (bom espaço de gaiola, boa alimentação e enriquecimento ambiental), a presença de profissionais experientes e habilitados para o manuseio destes animais, além das características de experimentação que envolvem a susceptibilidade à infecção do animal escolhido por determinada espécie de parasito.

Diversos animais podem ser escolhidos para utilização, porém os primatas são os animais capazes de desenvolver a infecção por plasmódios humanos com fidelidade ao observado em humanos, destacando-os como os modelos melhor adaptados para o estudo da relação parasito-hospedeiro em contexto de ensaios vacinais.

Os primatas de maior porte, como os Chimpanzés, podem ser utilizados e proverão bons resultados, respondendo bem aos ensaios vacinais e à infecção de prova. As questões de pesada legislação que envolvem seu uso, assim como de outros primatas superiores, são um empecilho para sua utilização em larga escala em ensaios de experimentação. Primatas do Velho Mundo, como o Rhesus, também são aplicáveis, embora também já enfrentem questões de pesada legislação.

Pode-se destacar, então, a importância dos modelos neotropicais, animais capazes de sustentar o desenvolvimento da infecção, além de serem ferramentas úteis na obtenção de dados referentes aos efeitos de candidatas vacinais com alta homologia com a espécie humana. Estes animais possuem ainda outras conveniências, como seu porte reduzido e custo menor de manuseio e manutenção, quando comparado com animais de grande porte como os primatas do velho mundo. Além disso, são modelos com menos entraves burocráticos, quando comparados aos Primatas do Velho Mundo mais utilizados em pesquisa. São também animais abundantes na fauna brasileira, o que facilita sua utilização em instituições nacionais.

Além disso, a preferência ou não pela cirurgia de esplenectomia, a depender da espécie de primata neotropical, pode ser peça chave para a obtenção de dados completos no que diz respeito a complexidade da produção de resposta imunológica (pensando na preservação ou não do tecido esplênico)

Tratando das características individuais de cada paciente, o status imunitário (imunidade parcial pré-existente) e a exposição à antígenos parasitários diversos em área endêmica, são aspectos capazes de alterar a eficácia da imunização.

Com isso, pode-se dizer que os esforços na tentativa de desenvolver novas candidatas vacinais para malária devem ser mantidos e priorizados pela comunidade científica mundial, de forma a visar o desenvolvimento de formulações com maior chances de sucesso. Esse trabalho é indispensável para que o objetivo de eliminação da malária até o ano de 2030, em solo brasileiro, seja alcançado.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-LATIF MS, DIETZ K, ISSIFOU S, KREMSNER PG, KLINKERT MQ. **Antibodies to *Plasmodium falciparum* rifin proteins are associated with rapid parasite clearance and asymptomatic infections.** *Infect Immun.* 2003;71(11):6229-6233. doi:10.1128/IAI.71.11.6229-6233.2003
- AHMED MA, COX-SINGH J. ***Plasmodium knowlesi* - an emerging pathogen.** *ISBT Sci Ser.* 2015;10(Suppl 1):134-140. doi:10.1111/voxs.12115
- ALMEIDA MEM, VASCONCELOS MGS, TARRAGÔ AM, MARIÚBA LAM. Circumsporozoite Surface Protein-based malaria vaccines: a review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2021;63:e11. Published 2021 Jan 29. doi:10.1590/S1678-9946202163011
- ALTEVOGT BM, PANKEVICH DE, POPE AM, KAHN JP. **Research agenda. Guiding limited use of chimpanzees in research.** *Science.* 2012;335(6064):41-42. doi:10.1126/science.1217521
- ALVARADO, C. A.; FERREIRA, M. S. Malária. In: Veronesi, R. (org.). **Doenças Infeciosas e Parasitárias.** 7. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
- AMENDOEIRA, M. R. R. *et al.* Protozoologia. In: Molinaro, E; Caputo, L; Amendoeira, R. (org.). **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais Em Laboratório de Saúde.** Rio de Janeiro: Epsjv, Ioc, 2012. Cap. 1, P. 21-190. Isbn 978-85- 98768-41-0.
- AMINO R, THIBERGE S, MARTIN B, *et al.* **Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal.** *Nat Med.* 2006;12(2):220-224. doi:10.1038/nm1350.
- ANDERS RF. **Multiple Cross-reactivities Amongst Antigens Of *Plasmodium Falciparum* Impair The Development Of Protective Immunity Against Malaria.** *Parasite Immunol.* 8: 529-539, 1986.
- ANDRADE, A. *et al.* (org.). **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos.** Rio de Janeiro: *Fiocruz*, 2010. 472 P.
- ANDRADE, A., PINTO, SC., OLIVEIRA, RS., orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora *FIOCRUZ*, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6.
- ANTINORI S, GALIMBERTI L, MILAZZO L, CORBELLINO M. ***Plasmodium knowlesi*: the emerging zoonotic malaria parasite.** *Acta Trop.* 2013;125(2):191-201. doi:10.1016/j.actatropica.2012.10.008.
- ARIEY F, WITKOWSKI B, AMARATUNGA C, *et al.* **A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* 41alária.** *Nature.* 2014;505(7481):50-55. Doi:10.1038/nature12876
- BARUCH DI, PASLOSKE BL, SINGH HB, *et al.* **Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes.** *Cell.* 1995;82(1):77-87. doi:10.1016/0092-8674(95)90054-3

BOUSEMA T, DRAKELEY C. **Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination.** *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(2):377-410. doi:10.1128/CMR.00051-1

BURKHARD P, LANAR DE. **Malaria vaccine based on self-assembling protein nanoparticles.** *Expert Rev Vaccines.* 2015;14:1525–27. doi:https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1096781.

BAEZA GARCIA, A., SIU, E., SUN, T. *et al.* **Neutralization of the *Plasmodium*-encoded MIF ortholog confers protective immunity against malaria infection.** *Nat Commun* 9, 2714 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05041-7>

BRASIL P, ZALIS MG, DE PINA-COSTA A, *et al.* **Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation.** *Lancet Glob Health.* 2017;5(10):e1038-e1046. doi:10.1016/S2214-109X(17)30333-9

BULL PC, MARSH K. **The role of antibodies to *Plasmodium falciparum*-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria.** *Trends Microbiol.* 2002;10(2):55-58. doi:10.1016/s0966-842x(01)02278-8

BURNS AL, DANS MG, BALBIN JM, *et al.* **Targeting malaria parasite invasion of red blood cells as an antimalarial strategy.** *FEMS Microbiol Rev.* 2019;43(3):223-238. doi:10.1093/femsre/fuz005

BUTTERWORTH AS, SKINNER-ADAMS TS, GARDINER DL, TRENHOLME KR. ***Plasmodium falciparum* gametocytes: with a view to a kill.** *Parasitology.* 2013;140(14):1718-1734. doi:10.1017/S0031182013001236

CABRAL FJ, WUNDERLICH G. **Transcriptional memory and switching in the *Plasmodium falciparum* rif gene family.** *Mol Biochem Parasitol.* 2009;168(2):186-190. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.08.002

CARLSSON HE, SCHAPIRO SJ, FARAH I, HAU J. **Use of primates in research: a global overview.** *Am J Primatol.* 2004;63(4):225-237. doi:10.1002/ajp.20054

CARTER R, GRAVES PM, QUAKYI IA, GOOD MF. **Restricted or absent immune responses in human populations to *Plasmodium falciparum* gamete antigens that are targets of malaria transmission-blocking antibodies.** *J Exp Med.* 1989;169(1):135-147. doi:10.1084/jem.169.1.135

CARVALHO LJ, DANIEL-RIBEIRO CT, GOTO H. **Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects.** *Scand J Immunol.* 2002;56(4):327-343. doi:10.1046/j.1365-3083.2002.01160.x

CARVALHO, L. J. M.; PRATT-RICCIO, L. R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Vacinas Contra a Malária. In: Coura, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.**: Guanabara Koogan, 2013. Cap. 76d.

CENTRO DE CONTROLE DE DOENÇAS E PREVENÇÃO (Estados Unidos da América) (org.). **Malaria.** 2020. Disponível Em: <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/>.

CHEN Q, FERNANDEZ V, SUNDSTRÖM A, *et al.* **Developmental selection of var gene expression in *Plasmodium falciparum*.** *Nature.* 1998;394(6691):392-395. doi:10.1038/28660

CHEN Q, HEDDINI A, BARRAGAN A, FERNANDEZ V, PEARCE SF, WAHLGREN M. **The semiconserved head structure of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors.** *J Exp Med.* 2000;192(1):1-10. doi:10.1084/jem.192.1.1

CHIN W., CONTACOS P. G., COATNEY G. R., KIMBALL H. R. (1965). **A Naturally Acquired Quotidian-Type Malaria in Man Transferable to Monkeys.** *Science* 149, 865. doi: 10.1126/science.149.3686.865

CHUA ACY, ONG JJY, MALLERET B, *et al.* **Robust continuous in vitro culture of the *Plasmodium cynomolgi* erythrocytic stages.** *Nat Commun.* 2019;10(1):3635. Published 2019 Aug 12. doi:10.1038/s41467-019-11332-4

CLYDE DF, MOST H, MCCARTHY VC, VANDERBERG JP. **Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria.** *Am J Med Sci.* 1973;266(3):169-177. doi:10.1097/00000441-197309000-00002

COLLINS WE, GALLAND GG, SULLIVAN JS, MORRIS CL, RICHARDSON BB. **The Santa Lucia strain of *Plasmodium falciparum* as a model for vaccine studies. II. Development of *Aotus vociferans* as a model for testing transmission-blocking vaccines.** *Am J Trop Med Hyg.* 1996;54(4):380-385. doi:10.4269/ajtmh.1996.54.380

COLLINS WE, JEFFERY GM. **Extended clearance time after treatment of infections with *Plasmodium malariae* may not be indicative of resistance to chloroquine.** *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67(4):406-410. doi:10.4269/ajtmh.2002.67.406

COLLINS WE, JEFFERY GM. ***Plasmodium malariae*: parasite and disease.** *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(4):579-592. doi:10.1128/CMR.00027-07

COLLINS WE, WALDUCK A, SULLIVAN JS, *et al.* **Efficacy of vaccines containing rhoptry-associated proteins RAP1 and RAP2 of *Plasmodium falciparum* in Saimiri boliviensis monkeys.** *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(4):466-479. doi:10.4269/ajtmh.2000.62.466

COLLINS WE. **South American monkeys in the development and testing of malarial vaccines--a review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992;87 Suppl 3:401-406. doi:10.1590/s0074-02761992000700068

COLLINS, W.E. (2002). **Nonhuman Primate Models.** In: Doolan, D.L. (eds) **Malaria Methods and Protocols. Methods in Molecular Medicine™**, vol 72. *Humana Press.* <https://doi.org/10.1385/1-59259-271-6:85>

CONTAMIN H, BEHR C, MERCEREAU-PUJALON O, MICHEL J. ***Plasmodium falciparum* in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): infection of non-splenectomised animals as a model for exploring clinical manifestations of malaria.** *Microbes Infect.* 2000;2(8):945-954. doi:10.1016/s1286-4579(00)00401-9

CORDINA CJ, CULLETON R, JONES BL, *et al.* ***Plasmodium knowlesi*: clinical presentation and laboratory diagnosis of the first human case in a Scottish traveler.** *J Travel Med.* 2014;21(5):357-360. doi:10.1111/jtm.12131

COX FE. **History of the discovery of the malaria parasites and their vectors.** *Parasit Vectors.* 2010;3(1):5. doi:10.1186/1756-3305-3-5

CRABB BS, COWMAN AF. ***Plasmodium falciparum* virulence determinants unveiled.** *Genome Biol.* 2002;3(11):REVIEWS1031. doi:10.1186/gb-2002-3-11-reviews1031

CROMPTON PD, MOEBIUS J, PORTUGAL S, *et al.* **Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease.** *Annu Rev Immunol.* 2014;32:157-187. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120220

CROMPTON PD, PIERCE SK, MILLER LH. **Advances and challenges in malaria vaccine development.** *J Clin Invest.* 2010;120(12):4168-4178. doi:10.1172/JCI44423

CULLETON R, COBAN C, ZEYREK FY, *et al.* **The origins of African *Plasmodium vivax*; insights from mitochondrial genome sequencing.** *PLoS One.* 2011;6(12):e29137. doi:10.1371/journal.pone.0029137

CUNNINGTON AJ, WALTHER M, RILEY EM. **Piecing together the puzzle of severe malaria.** *Sci Transl Med.* 2013;5(211):211ps18. doi:10.1126/scitranslmed.3007432

CUNHA JA, CARVALHO LJM, BIANCO-JUNIOR C, *et al.* **Increased *Plasmodium falciparum* Parasitemia in Non-splenectomized Saimiri sciureus Monkeys Treated with Clodronate Liposomes.** *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:408. 2017 Sep 21. doi:10.3389/fcimb.2017.00408

DATOO MS, NATAMA MH, SOMÉ A, *et al.* **Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial.** *Lancet.* 2021;397(10287):1809-1818. doi:10.1016/S0140-6736(21)00943-0

DAUBERSIES P, THOMAS AW, MILLET P, *et al.* **Protection against *Plasmodium falciparum* malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3.** *Nat Med.* 2000;6(11):1258-1263. doi:10.1038/81366

DE JONG GM, SLAGER JJ, VERBON A, VAN HELLEMOND JJ, VAN GENDEREN PJ. **Systematic review of the role of angiotensin-1 and angiotensin-2 in *Plasmodium* species infections: biomarkers or therapeutic targets?.** *Malar J.* 2016;15(1):581. Published 2016 Dec 1. doi:10.1186/s12936-016-1624-8

DESAKORN V, DONDORP AM, SILAMUT K, *et al.* **Stage-dependent production and release of histidine-rich protein 2 by *Plasmodium falciparum*.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005;99(7):517-524. doi:10.1016/j.trstmh.2004.11.014

DOBAÑO C, UBILLOS I, JAIROCE C, *et al.* **RTS,S/AS01E immunization increases antibody responses to vaccine-unrelated *Plasmodium falciparum* antigens associated with protection against clinical malaria in African children: a case-control study.** *BMC Med.* 2019;17(1):157. Published 2019 Aug 14. doi:10.1186/s12916-019-1378-6

DONDORP AM, DESAKORN V, PONGTAVORNPINYO W, *et al.* **Estimation of the total**

**parasite biomass in acute falciparum malaria from plasma PfHRP2.** *PLoS Med.* 2005;2(8):e204. doi:10.1371/journal.pmed.0020204

DONDORP AM, YEUNG S, WHITE L, *et al.* **Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment.** *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(4):272-280. doi:10.1038/nrmicro233

EHRICH JH, EKE FU. **Malaria-induced renal damage: facts and myths.** *Pediatr Nephrol.* 2007;22(5):626-637. doi:10.1007/s00467-006-0332-y

FERNANDES, J. *et al.* **Vacinas.** Rio de Janeiro: *Editora Fiocruz*, 2021. 164 P. Isbn 978-65-5708-035-1.

FERREIRA MU, DA SILVA NUNES M, WUNDERLICH G. **Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites.** *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11(6):987-995. doi:10.1128/CDLI.11.6.987-995.2004

FERREIRA MU, ZILVERSMIT M, WUNDERLIC G. **Origins and evolution of antigenic diversity in malaria parasites.** *Curr Mol Med.* 2007;7(6):588-602. doi:10.2174/156652407781695756

FOWKES FJ, BOEUF P, BEESON JG. **Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission.** *Parasitology.* 2016;143(2):139-153. doi:10.1017/S0031182015001249

FREUND J, SOMMER HE, WALTER AW. **IMMUNIZATION AGAINST MALARIA: VACCINATION OF DUCKS WITH KILLED PARASITES INCORPORATED WITH ADJUVANTS.** *Science.* 1945;102(2643):200-202. doi:10.1126/science.102.2643.200

FREVERT U. **Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages.** *Trends Parasitol.* 2004;20(9):417-424. doi:10.1016/j.pt.2004.07.007

GARCIA LS. **Malaria.** *Clin Lab Med.* 2010;30(1):93-129. doi:10.1016/j.cll.2009.10.001

GARNHAM PC. **The myth of quartan malaria (Haemamoeba laverani var. quartana Labbé, 1894).** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75(4):616-617. doi:10.1016/0035-9203(81)90229-7

GOEL S, PALMKVIST M, MOLL K, *et al.* **RIFINs are adhesins implicated in severe Plasmodium falciparum malaria.** *Nat Med.* 2015;21(4):314-317. doi:10.1038/nm.3812

GRANDE R, ANTINORI S, MERONI L, MENEGON M, SEVERINI C. **A case of Plasmodium malariae recurrence: recrudescence or reinfection?.** *Malar J.* 2019;18(1):169. Published 2019 May 14. doi:10.1186/s12936-019-2806-y

GREENBERG AE, NSA W, RYDER RW, *et al.* **Plasmodium Falciparum malaria and perinatally acquired human immunodeficiency virus type 1 infection in Kinshasa, Zaire. A prospective, longitudinal cohort study of 587 children.** *N Engl J Med.* 1991;325(2):105-109. doi:10.1056/NEJM199107113250206

GROVES, C. P. **Primate Taxonomy.** Washington: *Smithsonian Institution Press*, 2001

GRUSZCZYK J, KANJEE U, CHAN LJ, *et al.* **Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for Plasmodium vivax.** *Science.* 2018;359(6371):48-55. doi:10.1126/science.aan1078

HALBERSTAEDTER, LUDWIG, S. VON PROWAZEK. "Untersuchungen über die Malariaparasiten der Affen." *Arb K Gesundh-Amte* (Berl) 26 (1907): 37-43.

HANG J-W, TUKIJAN F, LEE E-Q-H, ABDEEN SR, ANIWEH Y, MALLERET B. **Zoonotic Malaria: Non-Laverania Plasmodium Biology and Invasion Mechanisms.** *Pathogens*. 2021; 10(7):889. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070889>

HARTMEYER GN, STENSVOLD CR, FABRICIUS T, *et al.* **Plasmodium cynomolgi as Cause of Malaria in Tourist to Southeast Asia**, 2018. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(10):1936-1939. doi:10.3201/eid2510.190448

HEDELIUS R, FLETCHER JJ, GLASS WF 2ND, SUSANTI AI, MAGUIRE JD. **Nephrotic syndrome and unrecognized Plasmodium malariae infection in a US Navy sailor 14 years after departing Nigeria.** *J Travel Med*. 2011;18(4):288-291. doi:10.1111/j.1708-8305.2011.00526.x

HENDRIKSEN IC, MWANGA-AMUMPAIRE J, VON SEIDLEIN L, *et al.* **Diagnosing severe falciparum malaria in parasitaemic African children: a prospective evaluation of plasma PfHRP2 measurement.** *PLoS Med*. 2012;9(8):e1001297. doi:10.1371/journal.pmed.1001297

HERNANDEZ-RIVAS R, PÉREZ-TOLEDO K, HERRERA SOLORIO AM, DELGADILLO DM, VARGAS M. **Telomeric heterochromatin in Plasmodium falciparum.** *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:290501. doi:10.1155/2010/290501

HERRERA S, PERLAZA BL, BONELO A, ARÉVALO-HERRERA M. **Aotus monkeys: their great value for anti-malaria vaccines and drug testing.** *Int J Parasitol*. 2002;32(13):1625-1635. doi:10.1016/s0020-7519(02)00191-1

HERSHKOVITZ P. **Two new species of night monkeys, genus Aotus (Cebidae, platyrrhini): A preliminary report on Aotus taxonomy.** *Am J Primatol*. 1983;4(3):209-243. doi:10.1002/ajp.1350040302

HISAEDA H, SAUL A, REECE JJ, *et al.* **Merozoite surface protein 3 and protection against malaria in Aotus nancymai monkeys.** *J Infect Dis*. 2002;185(5):657-664. doi:10.1086/339187

HORUK R, CHITNIS CE, DARBONNE WC, *et al.* **A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor.** *Science*. 1993;261(5125):1182-1184. doi:10.1126/science.7689250

JENSEN JB, BOLAND MT, AKOOD M. **Induction of crisis forms in cultured Plasmodium falciparum with human immune serum from Sudan.** *Science*. 1982;216(4551):1230-1233. doi:10.1126/science.7043736

JONGWUTIWES S, PUTAPORNTIP C, IWASAKI T, SATA T, KANBARA H. **Naturally acquired Plasmodium knowlesi malaria in human, Thailand.** *Emerg Infect Dis*. 2004;10(12):2211-2213. doi:10.3201/eid1012.040293]

JUNQUEIRA C, BARBOSA CRR, COSTA PAC, *et al.* **Cytotoxic CD8+ T cells recognize and kill *Plasmodium vivax*-infected reticulocytes.** *Nat Med.* 2018;24(9):1330-1336. doi:10.1038/s41591-018-0117-4

KALKAL, M., KALKAL, A., DHANDA, S.K. *et al.* **A comprehensive study of epitopes and immune reactivity among *Plasmodium* species.** *BMC Microbiol* 22, 74 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02480-7>

KILLEEN GF. **Characterizing, controlling and eliminating residual malaria transmission.** *Malar J.* 2014;13:330. doi:10.1186/1475-2875-13-330

KUMAR S, MILLER LH. **Cellular mechanisms in immunity to blood stage infection.** *Immunol Lett.* 1990;25(1-3):109-114. doi:10.1016/0165-2478(90)90100-5

KYES S, PINCHES R, NEWBOLD C. **A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*.** *Mol Biochem Parasitol.* 2000;105(2):311-315. doi:10.1016/s0166-6851(99)00193-0

KYES SA, ROWE JA, KRIEK N, NEWBOLD CI. **Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with *Plasmodium falciparum*.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(16):9333-9338. doi:10.1073/pnas.96.16.9333

LANGHORNE J, NDUNGU FM, SPONAAS AM, MARSH K. **Immunity to malaria: more questions than answers.** *Nat Immunol.* 2008;9(7):725-732. doi:10.1038/ni.f.205

LEE KS, COX-SINGH J, SINGH B. **Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections.** *Malar J.* 2009;8:73. doi:10.1186/1475-2875-8-73

LEECH JH, BARNWELL JW, MILLER LH, HOWARD RJ. **Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.** *J Exp Med.* 1984;159(6):1567-1575. doi:10.1084/jem.159.6.1567

LENSEN AH, VAN GEMERT GJ, BOLMER MG, *et al.* **Transmission blocking antibody of the *Plasmodium falciparum* zygote/ookinete surface protein Pfs25 also influences sporozoite development.** *Parasite Immunol.* 1992;14(5):471-479. doi:10.1111/j.1365-3024.1992.tb00021.x

LIMA-JUNIOR J. C, PRATT-RICCIO LR. **Major Histocompatibility Complex and Malaria: Focus on *Plasmodium vivax* Infection.** *Front Immunol.* 2016;7:13. 2016 Jan 27. doi:10.3389/fimmu.2016.00013

LOBEL HO, CAMPBELL CC. **Trends in imported malaria, United States.** *MMWR CDC Surveill Summ.* 1983;32(3):15SS-8SS.

LUIZA-BATISTA C, THIBERGE S, SERRA-HASSOUN M, *et al.* **Humanized mice for investigating sustained *Plasmodium vivax* blood-stage infections and transmission.** *Nat Commun.* 2022;13(1):4123. Published 2022 Jul 15. doi:10.1038/s41467-022-31864-6

MARTINELLI A, CULLETON R. **Non-human primate malaria parasites: out of the forest and into the laboratory.** *Parasitology.* 2018;145(1):41-54. doi:10.1017/S0031182016001335

LAURENS M. B. (2021) **Novel malaria vaccines, Human Vaccines & Immunotherapeutics**, 17:11, 4549-4552, DOI: 10.1080/21645515.2021.1947762

MAHASE E. **A vaccine against malaria: five minutes with . . . Richard Bucala** *BMJ* 2021; 372 :n651 doi:10.1136/bmj.n651

MCGREGOR IA. **Malarial immunity: current trends and prospects.** *Ann Trop Med Parasitol.* 1987;81(5):647-656. doi:10.1080/00034983.1987.11812166

MEIBALAN E, MARTI M. **Biology of Malaria Transmission.** *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(3):a025452. doi:10.1101/cshperspect.a025452

MÉNARD R, TAVARES J, COCKBURN I, MARKUS M, ZAVALA F, AMINO R. **Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity.** *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(10):701-712. doi:10.1038/nrmicro3111

MILNER DA JR. **Malaria Pathogenesis.** *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(1):a025569. Published 2018 Jan 2. doi:10.1101/cshperspect.a025569

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Vacina contra Covid-19: dos testes iniciais ao registro.** [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/vacina-contracovid-19-dos-testes-iniciais-ao-registro>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Comissão Nacional de Ética Em Pesquisa. 2021. Nota Pública: **Conep/cns Avalia Que Tratamento Com Cloroquina Nebulizada Desrespeita Normas de Ética Clínica no Brasil**, [s. L.], 16 Abr. 2021. Disponível Em: <Http://conselho.saude.gov.br/ultimas-noticias-cns/1705-nota-publica-conep-cns-avalia-que-tratamento-com-cloroquina-nebulizada-desrespeita-normas-de-etica-clinica-no-brasil>

MOLINARO, E. M. *et al.* Animais de Laboratório. In: Molinaro, E.; Caputo, L.; Amendoeira, R. (org.). **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais Em Laboratório de Saúde.** Rio de Janeiro: *Epsjv, Ioc*, 2009. V. 1, Cap. 4, P. 155-222.

MOORTHY V, BINKA F. **R21/Matrix-M: a second malaria vaccine?.** *Lancet.* 2021;397(10287):1782-1783. doi:10.1016/S0140-6736(21)01065-5

MOROSAN S, HEZ-DEROUBAIX S, LUNEL F, *et al.* **Liver-stage development of Plasmodium falciparum, in a humanized mouse model.** *J Infect Dis.* 2006;193(7):996-1004. doi:10.1086/500840

NADA RAJA T, HU TH, ZAINUDIN R, LEE KS, PERKINS SL, SINGH B. **Malaria parasites of long-tailed macaques in Sarawak, Malaysian Borneo: a novel species and demographic and evolutionary histories.** *BMC Evol Biol.* 2018;18(1):49. Doi:10.1186/s12862-018-1170-9

NAIK DG. **Plasmodium knowlesi-mediated zoonotic malaria: A challenge for elimination.** *Trop Parasitol.* 2020;10(1):3-6. doi:10.4103/tp.TP\_17\_18

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana.** 13. Ed. São Paulo: *Editora Atheneu*, 2016. 559 P. ISBN 978-85-388-0715-5.

N'GUESSAN R, CORBEL V, AKOGBÉTO M, ROWLAND M. **Reduced efficacy of**

**insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin.** *Emerg Infect Dis.* 2007;13(2):199-206. doi:10.3201/eid1302.060631

NUSSENZWEIG RS, VANDERBERG J, MOST H, ORTON C. **Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*.** *Nature.* 1967;216(5111):160-162. doi:10.1038/216160a0

OGUIKE MC, BETSON M, BURKE M, *et al.* ***Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities.** *Int J Parasitol.* 2011;41(6):677-683. doi:10.1016/j.ijpara.2011.01.004

OKAFOR CN, FINNIGAN NA. ***Plasmodium Ovale* Malaria.** In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): *StatPearls Publishing*; August 22, 2022.

O'MEARA WP, MANGENI JN, STEKETEE R, GREENWOOD B. **Changes in the burden of malaria in sub-Saharan Africa.** *Lancet Infect Dis.* 2010;10(8):545-555. doi:10.1016/S1473-3099(10)70096-7

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **The Rts,s Malaria Vaccine.** [gráfico Online]. 2021. Disponível Em: <https://www.who.int/multi-media/details/the-rts-s-malaria-vaccinev2>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (Américas). Organização Pan-Americana de Saúde. **Brasil lança plano nacional para eliminação da malária no país, com apoio da OPAS.** [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/12-5-2022-brasil-lanca-plano-nacional-para-eliminacao-da-malaria-no-pais-com-apoio-da-opas>.

ORIERO EC, AMENGA-ETEGO L, ISHENGOMA DS, AMAMBUA-NGWA A. ***Plasmodium malariae*, current knowledge and future research opportunities on a neglected malaria parasite species.** *Crit Rev Microbiol.* 2021;47(1):44-56. doi:10.1080/1040841X.2020.1838440

PAIN A, FERGUSON DJ, KAI O, *et al.* **Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(4):1805-1810. doi:10.1073/pnas.98.4.1805

PESSOA SB, MARTINS A V. **Parasitologia Médica**, 9ª Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1974.

PIED S, NUSSLER A, PONTENT M, *et al.* **C-reactive protein protects against preerythrocytic stages of malaria.** *Infect Immun.* 1989;57(1):278-282. doi:10.1128/iai.57.1.278-282.1989

PISSINATI, A.; GOLDSCHMIDT, B.; SOUZA, I. V. Taxonomia. In: Andrade, Antenor *et al*, (org.). **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica.** Rio de Janeiro: *Fiocruz*, 2010. Cap. 2, P. 41-55.

PISSINATTI, A.; ANDRADE, M. C. R. Histórico. In: Andrade, A. *et al*, (org.). **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas Não Humanos na Pesquisa Biomédica.** Rio de Janeiro: *Fiocruz*, 2010. Cap. 1, P. 21-39. Isbn 978-85-7541-191-9.

POUVELLE B, SPIEGEL R, HSIAO L, *et al.* **Direct access to serum macromolecules by intraerythrocytic malaria parasites.** *Nature.* 1991;353(6339):73-75. doi:10.1038/353073a0

**PRATT-RICCIO, LILIAN ROSE *et al.* Uso de modelos de primatas neotropicais para pesquisa em malária: um histórico dos 25 anos de colaboração entre o Laboratório de Pesquisa em Malária (IOC, Fiocruz) e o Centro Nacional de Primatas (IEC, SVS). *Rev***

*Pan-Amaz Saude*, Ananindeua , v. 12, n. esp, e202100462, jun. 2021 . Epub 07-Jul-2021. <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223202100462>.

RAJA TN, HU TH, KADIR KA, *et al.* **Naturally Acquired Human *Plasmodium cynomolgi* and *P. knowlesi* Infections, Malaysian Borneo.** *Emerg Infect Dis.* 2020;26(8):1801-1809. doi:10.3201/eid2608.200343

RANDALL G, SEIDEL JS. **Malaria.** *Pediatr Clin North Am.* 1985;32(4):893-916. doi:10.1016/s0031-3955(16)34861-1

RANSON H, LISSENDEN N. **Insecticide Resistance in African Anopheles Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control.** *Trends Parasitol.* 2016;32(3):187-196. doi:10.1016/j.pt.2015.11.010

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica.** 3. Ed. [s. L.]: Guanabara Koogan, 2010. 427 P.

RIBEIRO-ANDRADE, M. C. Principais Doenças de Primatas Não-humanos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (org.). **Animais de Laboratório: Criação e Experimentação.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. Cap. 20, P. 155-160.

RIVERA, E. A. B. Ética na Experimentação Animal. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (org.). **Animais de Laboratório: Criação e Experimentação.** 20. Ed. [s. L.]: Fundação Oswaldo Cruz, 2002. Cap. 3, P. 25-28.

ROBINSON BA, WELCH TL, SMITH JD. **Widespread functional specialization of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome.** *Mol Microbiol.* 2003;47(5):1265-1278. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03378.x

RODRIGUES M, NUSSENZWEIG RS, ZAVALA F. **The relative contribution of antibodies, CD4+ and CD8+ T cells to sporozoite-induced protection against malaria.** *Immunology.* 1993;80(1):1-5.

RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP. **Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial.** *Lancet.* 2015;386(9988):31-45. doi:10.1016/S0140-6736(15)60721-8

RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP. **Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites.** *PLoS Med.* 2014;11(7):e1001685.. doi:10.1371/journal.pmed.1001685

RUBACH MP, MUKEMBA J, FLORENCE S, *et al.* **Plasma *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein-2 concentrations are associated with malaria severity and mortality in Tanzanian children.** *PLoS One.* 2012;7(5):e35985. doi:10.1371/journal.pone.0035985

SAM-YELLOWE TY, FLORENS L, JOHNSON JR, *et al.* **A *Plasmodium* gene family encoding Maurer's cleft membrane proteins: structural properties and expression profiling.** *Genome Res.* 2004;14(6):1052-1059. doi:10.1101/gr.2126104

SANTOS, B. F. Modelo Animal. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (org.). **Animais de Laboratório: Criação e Experimentação.** 20. Ed. Rio de Janeiro: *Fiocruz*, 2002. Cap. 2, P. 23-24. Isbn 85-7541-015-6.

SCHERF A, HERNANDEZ-RIVAS R, BUFFET P, *et al.* **Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*.** *EMBO J.* 1998;17(18):5418-5426. doi:10.1093/emboj/17.18.5418

SCHERF A, LOPEZ-RUBIO JJ, RIVIERE L. **Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*.** *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:445-470. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093134

SCHUELER, P. **Ética na Pesquisa de Medicamentos.** Notícias e Artigos, Bio-manguinhos/fiocruz, Rio de Janeiro, 13 Maio 2020. Disponível Em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/1805-etica-na-pesquisa-de-medicamentos>.

SCHNEIDER CG, TAYLOR JA, SIBILO MQ, MIURA K, MALLORY KL, MANN C, KARCH C, BECK Z, MATYAS GR, LONG CA, *et al.* **Orientation of antigen display on self-assembling protein nanoparticles influences immunogenicity.** *Vaccines (Basel).* 2021;9. doi:https://doi.org/10.3390/vaccines9020103.

SEDEGAH M, SIM BK, MASON C, *et al.* **Naturally acquired CD8+ cytotoxic T lymphocytes against the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein.** *J Immunol.* 1992;149(3):966-971.

SINGH B, KIM SUNG L, MATUSOP A, *et al.* **A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings.** *Lancet.* 2004;363(9414):1017-1024. doi:10.1016/S0140-6736(04)15836-4

SINNIS P, NUSSENZWEIG V. **Preventing Sporozoite Invasion Of Hepatocytes.** Ln: Hofman SI (ed.). *Malaria Vaccine Development: a Multi-immune Response Approach.* Washington, D.c.: *Asm Press*, 1996.

SIQUEIRA AM, MESONES-LAPOUBLE O, MARCHESINI P, *et al.* ***Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges.** *Am J Trop Med Hyg.* 2016;95(6 Suppl):87-96. doi:10.4269/ajtmh.16-0204

SMITH JD, CHITNIS CE, CRAIG AG, *et al.* **Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes.** *Cell.* 1995;82(1):101-110. doi:10.1016/0092-8674(95)90056-x

SMITH JD, CRAIG AG, KRIEK N, *et al.* **Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(4):1766-1771. doi:10.1073/pnas.040545897

SNOW RW, GUERRA CA, NOOR AM, MYINT HY, HAY SI. **The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria.** *Nature.* 2005;434(7030):214-217.

doi:10.1038/nature03342

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO (Brasil). Disponível em: [https://www.sbcal.org.br/conteudo/view?ID\\_CONTEUDO=41](https://www.sbcal.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=41).

STEWART VA, MCGRATH SM, WALSH DS, *et al.* **Pre-clinical evaluation of new adjuvant formulations to improve the immunogenicity of the malaria vaccine RTS,S/AS02A.** *Vaccine*. 2006;24(42-43):6483-6492. doi:10.1016/j.vaccine.2006.06.033  
STRICKLAND, G. T. **Hunter's Tropical Medicine**, 6th Ed. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1984.

SUTHERLAND C. J., TANOMSING N., NOLDER D., OGUIKE M., JENNISON C., PUKRITTAYAKAMEE S., *et al.* (2010). **Two Nonrecombining Sympatric Forms of the Human Malaria Parasite *Plasmodium* *Ovale* Occur Globally.** *J. Infect. Dis.* 201, 1544–1550. doi: 10.1086/652240

TA TH, HISAM S, LANZA M, JIRAM AI, ISMAIL N, RUBIO JM. **First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*.** *Malar J.* 2014;13:68. doi:10.1186/1475-2875-13-68

TEIXEIRA, M.G. *et al.* **Mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias em Salvador - Bahia: evolução e diferenciais intra-urbanos segundo condições de vida.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2002, v. 35, n. 5, pp. 491-497. Epub 27 Nov 2002. ISSN 1678-9849. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000500012>.

TEMPLETON TJ. **The varieties of gene amplification, diversification and hypervariability in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*.** *Mol Biochem Parasitol.* 2009;166(2):109-116. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.04.003

THEEL ES, PRITT BS. **Parasites.** *Microbiol Spectr.* 2016;4(4):10.1128/microbiolspec.DMIH2-0013-2015. doi:10.1128/microbiolspec.DMIH2-0013-2015

TOMAR LR, GIRI S, BAUDDH NK, JHAMB R. **Complicated malaria: a rare presentation of *Plasmodium ovale*.** *Trop Doct.* 2015;45(2):140-142. doi:10.1177/0049475515571989

TOSTA CE, WEDDERBURN N. **Immune phagocytosis of *Plasmodium yoelii*-infected erythrocytes by macrophages and eosinophils.** *Clin Exp Immunol.* 1980;42(1):114-120.

TOSTA, C. E.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I. **Imunologia das Relações do Plasmódio Com o Hospedeiro Humano.** In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.** [s. L.]: Guanabara Koogan, 2013. Cap. 73.

UDOMSANGPETCH R, WÅHLIN B, CARLSON J, *et al.* ***Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes.** *J Exp Med.* 1989;169(5):1835-1840. doi:10.1084/jem.169.5.1835

VARO R, CHACOUR C, BASSAT Q. **Update on malaria.** *Med Clin (Barc).* 2020;155(9):395-402. doi:10.1016/j.medcli.2020.05.010

WALKER E, BRODIE C. ***Plasmodium falciparum* malaria in Nigerians who live in Britain.** *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982;284(6320):956-957. doi:10.1136/bmj.284.6320.956

WANG CW, MAGISTRADO PA, NIELSEN MA, THEANDER TG, LAVSTSEN T. **Preferential transcription of conserved rif genes in two phenotypically distinct *Plasmodium falciparum* parasite lines.** *Int J Parasitol*. 2009;39(6):655-664. doi:10.1016/j.ijpara.2008.11.014

WEBER JL. **Interspersed repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*.** *Mol Biochem Parasitol*. 1988;29(2-3):117-124. doi:10.1016/0166-6851(88)90066-7

WHITE NJ, IMWONG M. **Relapse.** *Adv Parasitol*. 2012;80:113-150. doi:10.1016/B978-0-12-397900-1.00002-5

WHITE NJ, PUKRITTAYAKAMEE S, HIEN TT, FAIZ MA, MOKUOLU OA, DONDORP AM. **Malaria.** *Lancet*. 2014;383(9918):723-735. doi:10.1016/S0140-6736(13)60024-0

WHITE NJ. **Anaemia and malaria.** *Malar J*. 2018;17(1):371. 2018. doi:10.1186/s12936-018-2509-9

WHITE NJ. **Malaria.** Manson's Tropical Diseases, Wb Saunders Company, London, P. 1087-1170, 1996.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION: **World Malaria Report 2019;** 2019. 232.P. ISBN: 978-92-4-156572-1

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION: **World Malaria Report 2021;** 2021. 322 P. ISBN: 978-92-4-004049-6

WINTER G, KAWAI S, HAEGGSTRÖM M, *et al.* **SURFIN is a polymorphic antigen expressed on *Plasmodium falciparum* merozoites and infected erythrocytes.** *J Exp Med*. 2005;201(11):1853-1863. doi:10.1084/jem.20041392

WORLD HEALTH ORGANIZATION **Q&a On The Malaria Vaccine Implementation Programme (mvip).** 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/malaria-vaccine-implementation-programme>

YAP NJ, HOSSAIN H, NADA-RAJA T, *et al.* **Natural Human Infections with *Plasmodium cynomolgi*, *P. inui*, and 4 other Simian Malaria Parasites, Malaysia.** *Emerg Infect Dis*. 2021;27(8):2187-2191. doi:10.3201/eid2708.204502

