

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Avaliação da eficácia da vacina contra malária placentária em modelo experimental

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

Sónia Ferreira Cunha

Dissertação orientada por:
Élio Sucena e Luciana de Moraes

Agradecimentos

Palavras não serão suficientes para expressar a minha gratidão em relação ao apoio prestado pela minha orientadora, Doutora Luciana de Moraes, ao longo deste trabalho. Graças à sua disponibilidade, paciência e entusiasmo, aprendi muito no último ano.

Ao Doutor Carlos Penha-Gonçalves (Instituto Gulbenkian de Ciência), por me ter recebido no seu grupo de investigação; e a cada membro deste grupo, pela simpatia e boa convivência gerada. Um agradecimento especial a Patrícia Marques Sousa, pela paciência e disponibilidade para me ensinar quase todas as técnicas que usei neste trabalho.

Ao Doutor Benoît Gamain (Université Paris Diderot, Paris, França), por nos ter disponibilizado a proteína usada na vacinação.

Devo também agradecer aos meus pais e irmãos pela confiança que desde sempre depositaram em mim, e que tem sido o motor da minha motivação.

E, por último, mas não menos importante, agradeço à família RURS (Residência Universitária Ribeiro Santos) pelo companheirismo e por serem, mais do que amigos, uma segunda família.

Resumo

A malária é uma doença potencialmente fatal provocada por parasitas do género *Plasmodium*. Os eritrócitos infectados por *Plasmodium* exibem antigénios na superfície membranar que se ligam a receptores do endotélio vascular, permitindo a adesão destes eritrócitos infectados a órgãos específicos. Durante a gravidez, as mulheres revelam uma maior suscetibilidade à infecção pelo parasita da malária. Esta suscetibilidade acrescida resulta em consequências negativas tanto para a progenitora como para o(s) neonato(s). Os eritrócitos de mulheres grávidas infectados por *Plasmodium falciparum* (o mais agressivo dos parasitas do género *Plasmodium* que infectam humanos) apresentam antigénios na sua superfície que permitem a ligação à placenta, através de recetores aí existentes, como o sulfato de condroitina A (CSA). O CSA interage com VAR2CSA (antigénio presente na superfície de eritrócitos infectados em mulheres grávidas expostas a *Plasmodium falciparum*). A aquisição natural de anticorpos contra VAR2CSA está associada à ausência de sintomas de malária placentária. Os níveis de anticorpos contra VAR2CSA aumentam ao longo da gravidez e ao longo de sucessivas gravidezes, sendo que mulheres que estiveram grávidas pelo menos uma vez (multigrávidas) são menos vulneráveis à malária placentária do que as que estão grávidas pela primeira vez (primigrávidas). Desta forma, VAR2CSA é um potencial candidato para vacinação contra malária placentária. O principal objetivo deste trabalho foi testar a eficácia da imunização com a sequência extracelular completa de VAR2CSA (*recDBL1X-6ε*) em fêmeas grávidas de murganho BALB/c infectadas com *Plasmodium berghei* transgénico, que expressa VAR2CSA. Para isso, as fêmeas foram acompanhadas durante a gravidez e no pós parto e foram analisados os títulos de anticorpos IgG anti-DBL1-6 no seu soro. Os principais resultados deste trabalho mostram que 23% das fêmeas vacinadas com a proteína *recDBL1X-6ε* foram parcialmente protegidas contra malária placentária, e sugerem que a manutenção de títulos altos de anticorpos IgG1 anti-DBL1X-6ε entre os dias da infeção e do parto possa ser responsável por essa proteção parcial. Também foi observada predominância de IgG1 comparativamente com as subclasses IgG2a e IgG2b, especialmente no pós-parto em mães parcialmente

protegidas, o que sugere que pode ser vantajoso apresentar níveis de IgG1 mais altos do que de IgG2a e IgG2b.

Palavras-chave: *malária placentária, vacinação, recDBL1X-6ε, Pb-VAR, IgG1.*

Abstract

Malaria is a potentially deadly disease triggered by parasites from the genus *Plasmodium*. *Plasmodium* infected erythrocytes exhibit membrane surface antigens which link to vascular endothelium receptors, allowing the adhesion of these infected erythrocytes to specific organs. During pregnancy, women show higher susceptibility to malaria parasite infection, which has negative outcomes for both mother and newborn(s). Pregnant women's erythrocytes infected by *Plasmodium falciparum* (the most aggressive among parasites from genus *Plasmodium* infecting humans) exhibit surface antigens which allow the binding to the placenta through receptors, as chondroitin sulfate A (CSA). CSA interacts with VAR2CSA (an antigen existing on the surface of infected erythrocytes in pregnant women exposed to *Plasmodium falciparum*). Natural acquisition of antibodies against VAR2CSA is associated to the absence of placental malaria symptoms. Antibody levels against VAR2CSA increase throughout pregnancy and during subsequent pregnancies, and women who were pregnant at least once (multigravid) are less susceptible to placental malaria than the ones who are pregnant for the first time (primigravid). Therefore, VAR2CSA is a potential candidate for vaccination against placental malaria. The main goal of this work was to test the immunization efficacy with full-length extracellular VAR2CSA (*recDBL1X-6ε*) on BALB/c female pregnant mice infected with transgenic *Plasmodium berghei*, expressing VAR2CSA. For that purpose, female mice were followed up during pregnancy and in post-delivery, and IgG anti-DBL1-6 antibody titers were analyzed in their sera. The main results of this work show that 23% of female mice vaccinated with *recDBL1X-6ε* protein were partially protected against placental malaria, and suggest that the maintenance of high IgG1 anti-DBL1X-6ε antibody titers between infection and delivery days can be responsible for that partial protection. It was also observed predominance of IgG1 comparatively to IgG2a and IgG2b subclasses, especially in post-delivery of partially protected mothers, what suggests that can be an advantage having higher levels of IgG1 than IgG2a and IgG2b.

Keywords: *placental malaria, vaccination, recDBL1X-6ε, Pb-VAR, IgG1.*

Índice

Agradecimentos	2
Resumo.....	3
Abstract	5
1. Introdução.....	9
1.1. Malária na gravidez.....	9
1.2. Placenta: função, estrutura e papel na sequestração do parasita.....	11
1.3. VAR2CSA.....	12
1.4. Imunidade adaptativa envolvida na proteção	13
1.5. Modelo de vacinação e infecção.....	15
2. Materiais e Métodos	17
2.1. Animais.....	17
2.2. Acompanhamento da gravidez e avaliação do pós parto	17
2.3. Imunização	18
2.4. Parasitas e Infecção	18
2.5. Parasitemia.....	19
2.6. Desenho experimental	19
2.7. Avaliação dos títulos de anticorpos IgG anti-DBL1-6 por ELISA	20
2.8. Tratamento estatístico dos dados obtidos.....	21
3. Resultados	22
3.1. Definição de critérios para classificação da malária placentária em positiva ou negativa.....	22
3.2. Efeitos da vacinação com <i>recDBL1-6</i>	23
3.2.1. Incidência da proteção contra MP	23
3.2.1.1. Avaliação do peso e viabilidade dos neonatos.....	27
3.2.2. Parasitemia ao longo da gestação.....	28
3.2.3. Evolução do peso materno ao longo da gestação.....	30
3.3. Avaliação da resposta humoral em fêmeas vacinadas	32
3.3.1. Evolução dos níveis de produção de anticorpos específicos para <i>recDBL1-6</i> durante o processo de imunização	32
3.3.2. Durabilidade dos anticorpos no soro materno	34
3.3.3. Presença de anticorpos no soro materno antes da infecção e após o parto	35
4. Discussão.....	38

Bibliografia 44

1. Introdução

1.1. Malária na gravidez

A malária é uma doença grave e potencialmente fatal que é responsável, todos os anos, por aproximadamente um milhão de mortes em todo o mundo, a maioria das quais acontece na África subsariana e em crianças com menos de 5 anos de idade¹. Esta doença é causada por protozoários parasitas do género *Plasmodium*. *Plasmodium falciparum* é a espécie predominante nas áreas tropicais e é responsável pela maioria das infeções graves de malária, ao contrário de *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae* que raramente causam doença grave. Os principais grupos de risco são as crianças, os adultos não imunes e as mulheres grávidas².

O vetor de transmissão de *Plasmodium* é a fêmea do mosquito *Anopheles*. O ciclo de vida do parasita é complexo e desenvolve-se em dois hospedeiros diferentes: mosquito e mamífero. A fêmea do mosquito *Anopheles* alimenta-se de sangue, estando por isso sujeita a ingerir gametócitos de *Plasmodium* ao picar um indivíduo infetado. No mosquito, o parasita desenvolve-se por reprodução sexuada, havendo fusão do gametócito masculino com o feminino. Após formação do zigoto, este migra ativamente para as glândulas salivares do mosquito. A duração deste processo varia geralmente entre 7 a 14 dias, dependendo da temperatura ambiente. Quando uma fêmea do mosquito infetada pica um hospedeiro mamífero, são injetados, diretamente das suas glândulas salivares, esporozoítos na corrente sanguínea do indivíduo picado. Estes esporozoítos migram rapidamente para o fígado, onde infetam os hepatócitos, iniciando assim a fase hepática da infeção. Depois de um período de incubação que dura entre 8 a 12 dias, são gerados merozoítos irmãos a partir de replicação assexuada. A fase sanguínea da infeção começa quando os hepatócitos infetados se rompem e libertam entre centenas a milhares de merozoítos para o sangue em circulação. A partir deste momento, desenvolvem-se os sintomas clínicos da malária. Os merozoítos invadem os glóbulos vermelhos e aí passam por um processo de maturação que dura cerca de 48h, passando pelos estádios de anel, de trofozoítos e, por fim, de esquizontes, que se dividem diretamente em merozoítos irmãos. Quando os glóbulos vermelhos infetados

se rompem, os merozoítos são libertados para a circulação sanguínea e continuam ciclos de replicação assexuada. Há também alguns merozoítos que não passam pelo processo de maturação, mas transformam-se antes em gametócitos masculinos e femininos, que estão prontos para serem transmitidos novamente para um mosquito^{2,3}.

Ao longo da sua evolução, os parasitas do género *Plasmodium* desenvolveram várias estratégias para escapar ao sistema imunitário do hospedeiro e completar o seu ciclo de vida^{4,5}. Para evitar a remoção pelo baço⁶, os parasitas *Plasmodium* exportam moléculas para a membrana dos eritrócitos infetados (antigénios), que permitem a interação com recetores existentes no endotélio vascular⁷ e aderência à microvasculatura de órgãos específicos como os pulmões, o coração, o fígado, o intestino, a pele, o cérebro e a placenta². Algumas estratégias desenvolvidas pelo parasita para escapar ao sistema imunitário do hospedeiro são redundância antigénica, polimorfismos e variação antigénica clonal⁵. As mulheres grávidas sofrem alterações hormonais e redução da imunidade, uma vez que a placenta tem a capacidade de se proteger do sistema imunitário inato e adaptativo materno. Esta supressão da imunidade torna as grávidas mais vulneráveis à malária e, havendo infeção, a severidade da doença é maior^{8,9}. Desta forma, em regiões endémicas, a malária placentária (MP) afeta um grande número de mulheres durante a gravidez. Esta doença é caracterizada por efeitos adversos tanto para a mãe como para os neonatos, incluindo anemia e mortalidade materna, grande incidência de abortos e nados-mortos, neonatos com baixo peso e mortalidade infantil aumentada¹⁰⁻¹². A anemia materna é, em parte, devida à hemólise causada pelo parasita e à sequestração dos eritrócitos infetados na placenta. Para além de ser uma importante causa de morte materna, a anemia severa pode provocar atraso do crescimento intrauterino, morte fetal e baixo peso dos neonatos¹³. Pensa-se que o peso reduzido dos neonatos de mães infetadas com malária é causado, principalmente, por atraso do crescimento intrauterino e parto prematuro. Em regiões tropicais e subtropicais, onde a malária é endémica e os recursos são escassos, o nascimento de bebés com baixo peso é particularmente problemático, pois aumenta o risco de mortalidade infantil^{10,11}.

1.2. Placenta: função, estrutura e papel na sequestração do parasita

A placenta é um órgão complexo presente na maioria dos mamíferos, que permite a interação materno-fetal durante a gestação. Esta suporta o desenvolvimento e o crescimento fetais^{13,14}, pois é responsável pelas trocas de oxigênio, dióxido de carbono, água e todos os nutrientes de que os fetos necessitam. Desta forma, o correto desempenho das funções da placenta é essencial para o crescimento normal dos fetos¹⁵.

Apesar do seu papel como interface, na placenta é sempre mantida a separação entre os sistemas circulatórios materno e fetal, através dos trofoblastos (células placentárias de origem fetal) que revestem os vasos sanguíneos fetais¹⁶. As placentas humana e do murganho (animal modelo usado neste estudo) são ambas do tipo hemocorial¹⁷, ou seja, os trofoblastos estão diretamente em contato com a circulação materna¹⁸. No entanto, enquanto a placenta humana tem uma única camada a separar a circulação materna da circulação fetal (o sinciotrofoblasto), na placenta do murganho os trofoblastos dão origem a três camadas que estão entre as duas circulações. Apesar das diferenças estruturais, pensa-se que as placentas destas duas espécies têm características funcionais semelhantes e que o transporte de nutrientes ocorre através de mecanismos também semelhantes¹⁷.

A placenta é também um nicho favorável à evasão e à replicação do parasita da malária¹³. Neste órgão, são expressas moléculas recetoras, como o sulfato de condroitina A (CSA) e ácido hialurónico (HA)², que foram identificados como responsáveis pela sequestração do parasita *Plasmodium falciparum*^{2,13}. A maioria dos parasitas sequestrados está já no estágio de trofozoíto ou esquizonte². A sequestração dos EIs na placenta causa um défice na interação materno-fetal, tendo como resultado os efeitos adversos associados à MP^{8,14,19}, já descritos anteriormente. Apesar dos mecanismos subjacentes à patologia não serem totalmente conhecidos, sabe-se que a acumulação de eritrócitos infetados (EIs) pelo parasita da malária, no espaço intervilloso da placenta, desencadeia o recrutamento e infiltração de células inflamatórias, com consequente produção de citocinas pró-inflamatórias que podem perturbar a homeostasia local e afetar a função placentária^{13,20,21}, levando ao desenvolvimento de malária placentária². A infeção da placenta tem também como efeito a redução do fluxo

de sangue^{2,14}, que está, por sua vez, correlacionada com os danos observados no desenvolvimento fetal¹⁴.

1.3. VAR2CSA

Os eritrócitos que são infectados pelo parasita da malária exibem antígenos de superfície variáveis, que permitem a citoadesão através de receptores que estão presentes na placenta. VAR2CSA é uma proteína transmembranar de tamanho grande (~350kDa) e polimórfica; pertence à família de proteínas membranares dos eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum*, PfEMP1 (“*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1”), codificada pelos genes *var*²². Esta proteína é composta por seis domínios extracelulares com ligação do tipo Duffy (DBL: “Duffy-binding-like”) e regiões interdomínios (DBL1X-6ε: DBL1-6)^{14,23}. VAR2CSA interage com o CSA, o receptor principal de adesão dos EIs² que é amplamente expresso no espaço interviloso da placenta²⁴, maioritariamente, mas também pelos trofoblastos²⁵. Vários esforços têm sido feitos para identificar, nesta proteína, a região extracelular responsável pela ligação ao CSA^{23,26–31} e, apesar das várias evidências encontradas de que os domínios da região N-terminal têm um papel importante na ligação ao CSA^{26,28–30}, existem outros estudos que não estão totalmente de acordo^{23,27,31}, continuando assim este problema por resolver.



Figura 1. Esquema dos limites da sequência e organização dos domínios de VAR2CSA. Estão representados a sequência N-terminal (NTS), a sequência acídica C-terminal (ATS), as regiões interdomínios (INT1, INT2, INT4 e INT4) e os domínios com ligação do tipo Duffy (DBL1X, DBL2X, DBL3X, DBL4ε, DBL5ε e DBL6ε). A azul está representada a região transmembranar. Adaptado de Srivastava *et al.* (²³).

Em regiões endêmicas, onde os adultos já adquiriram proteção contra a malária, as mulheres grávidas continuam a ser um grupo de alto risco quando há infecção por *Plasmodium falciparum*, particularmente durante a primeira gravidez^{27,32}. Esta suscetibilidade inesperada deve-se à singularidade dos antígenos expressos pelos parasitas que se ligam ao CSA na placenta³², e para os quais o sistema imunitário dos indivíduos não está preparado. VAR2CSA é uma proteína transcricionalmente sobreexpressa nos parasitas que se ligam ao CSA³³. Estudos em humanos^{20,34} mostram que altos níveis de anticorpos naturalmente adquiridos contra VAR2CSA estão associados à ausência de malária placentária no parto. Pensa-se que as mulheres adquirem imunidade para a malária placentária ao longo de cada gravidez. As mulheres que engravidam pela primeira vez (primigrávidas) têm ausência ou níveis muito baixos de anticorpos contra VAR2CSA, enquanto mulheres que passaram pelo menos por uma gravidez (multigrávidas) têm níveis mais altos de anticorpos, o que as torna menos suscetíveis à MP^{8,34,35}. Inversamente, a densidade de parasitas é maior nas primeiras gravidezes, sugerindo que a imunidade adquirida pelas mulheres grávidas reduz a sua parasitemia periférica e placentária¹⁰. Assim, a suscetibilidade para MP tem sido associada à ausência de anticorpos que possam bloquear a ligação dos Els ao CSA existente na placenta e que também promovam a sua eliminação por fagocitose²³. Em conjunto, estes dados sugerem que as mulheres que tiverem estado previamente em contato com VAR2CSA podem ter melhorias no desenvolvimento da gravidez e pós-parto, possivelmente devido à inibição e/ou eliminação dos Els da placenta.

1.4. Imunidade adaptativa envolvida na proteção

Na fase sanguínea e assexuada da infecção, as proteínas de *Plasmodium falciparum*, como VAR2CSA, são exportadas para a superfície dos eritrócitos³⁶. A localização na superfície dos Els torna estes antígenos acessíveis ao sistema imunitário do hospedeiro. Estudos anteriores^{20,34} sugerem que a proteção contra MP está diretamente relacionada com a aquisição de anticorpos específicos capazes de impedir a ligação dos Els ao CSA na placenta.

As células B são responsáveis pela produção e manutenção de imunidade humoral para *Plasmodium falciparum*⁵. Quando um organismo é invadido por antígenos estranhos, as imunoglobulinas (Ig) de superfície nas células B reconhecem o antígeno na sua forma nativa e internalizam a proteína, a qual é degradada e associada ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e apresentada neste contexto aos linfócitos T auxiliares CD4⁺. A ligação do antígeno ao linfócito B induz a sua migração para a zona T do baço. A interação do MHC classe II com o receptor da célula T (TCR), assim como a interação de outras moléculas co-estimuladoras presentes tanto na célula T quanto no linfócito B, ativam células B imaturas e desencadeiam a sua divisão e diferenciação em plasmócitos³⁷. Estes primeiros plasmócitos são de curta duração (duram apenas algumas semanas e acabam por morrer por apoptose) e secretam os primeiros anticorpos com baixa afinidade para os antígenos que ativaram este processo⁵. Algumas das células B e T migram para os folículos linfóides e aí formam centros germinais, onde as células B sofrem mudança de classe e hipermutação somática. As células B que resultam desta maturação diferenciam-se em duas populações distintas: uma população de células B de memória que expressa anticorpos mas não os secreta, e uma população de plasmócitos de longa duração que secreta anticorpos durante meses ou anos, mesmo na ausência dos antígenos. Os anticorpos de ambas as populações que passaram pelo processo de maturação têm alta afinidade para os antígenos previamente apresentados. Assim, numa primeira exposição a antígenos é gerada uma resposta humoral primária que é transitória, pois a maioria dos anticorpos é produzida por plasmócitos de curta duração e, conseqüentemente, tem baixa afinidade para os antígenos. A reexposição aos mesmos antígenos dá origem a uma resposta humoral secundária, que é mais rápida e forte do que a resposta anterior, pois é assegurada por células B de memória efetoras, que rapidamente se diferenciam em plasmócitos secretores de antígenos, e por plasmócitos de longa duração^{5,38,39}.

Hviid *et al.*⁵ propuseram um modelo em que exposições sucessivas a *Plasmodium falciparum* desencadeiam um aumento gradual da população de plasmócitos de longa duração, ao mesmo tempo que a população de plasmócitos de curta duração diminui, aumentando assim os níveis de anticorpos em circulação (figura 2). Tanto o que se sabe acerca de respostas mediadas por células B como o modelo apresentado, estão de

acordo com os níveis de anticorpos registados^{32,40} e com a incidência de proteção contra MP^{20,34} em estudos com mulheres primigrávidas e multigrávidas.

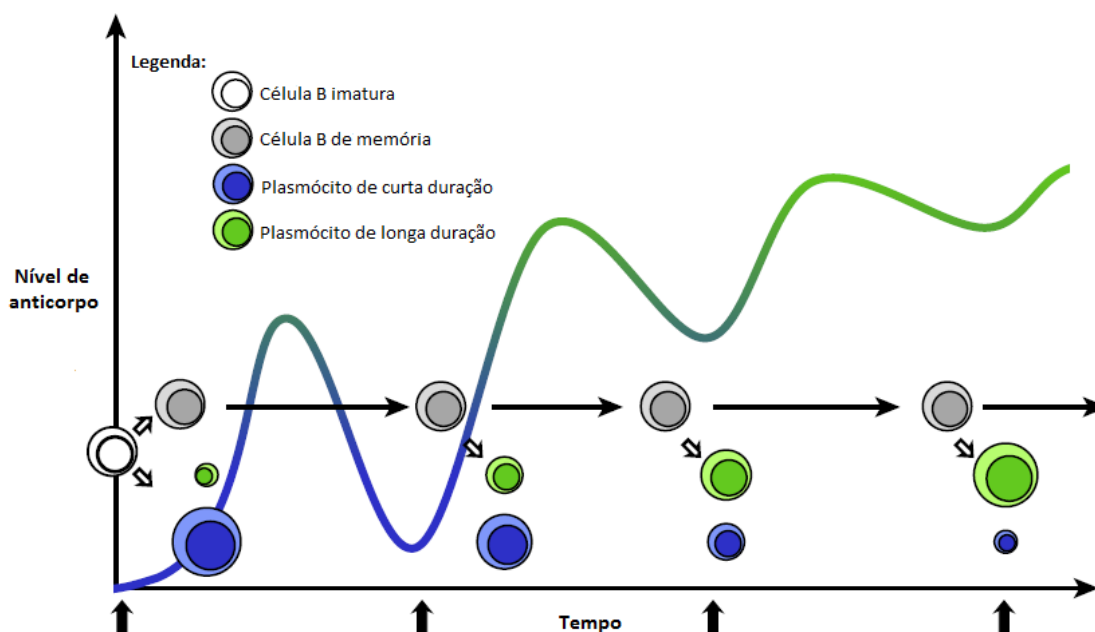


Figura 2: Modelo proposto para a composição de plasmócitos ao longo do tempo e da exposição (setas) a *Plasmodium falciparum*. Adaptado de Hviid *et al.* (5).

1.5. Modelo de vacinação e infecção

Em conjunto, todas as evidências apresentadas até agora sugerem VAR2CSA como um candidato muito atrativo para uma vacina contra MP. Recentemente, foi demonstrado que a expressão de VAR2CSA como proteína recombinante foi bem sucedida²³, uma vez que mimetiza muito bem a estrutura nativa da cadeia completa de VAR2CSA e liga-se com alta afinidade e especificidade ao CSA^{19,20}. *Plasmodium berghei* foi estabelecido como parasita modelo da malária, devido à sua vasta adaptação a espécies de mosquitos e roedores⁴¹. Os murganhos apresentam várias vantagens como animal modelo, incluindo a facilidade de acomodação e manutenção, o curto período de gestação, a progenia numerosa e o conhecimento, em geral, da sua genética e fisiologia¹⁷. Além disso, estes animais têm sido bastante usados para estudos de vacinação materna⁴² e, como foi já referido, a sua placenta tem muitas funções e

caraterísticas em comum com a placenta humana¹⁷. Foi também demonstrado que as caraterísticas clínicas da malária durante a gravidez podem ser recapituladas numa linhagem de murganhos BALB/c infetados a meio da gestação com *Plasmodium berghei*¹⁴, sendo assim um bom modelo para o estudo da MP. Foi recentemente estabelecido um novo modelo para MP, que consiste em infetar a mesma linhagem de murganhos com um parasita *P. berghei* transgénico que expressa VAR2CSA (Pb-VAR). Este modelo apresenta um fenótipo mais severo do que o anterior¹⁴ (infeção com *P. berghei* WT sem o gene *var2csa*) (de Moraes *et al.*, submetido) e é uma grande vantagem para a investigação em MP, pois pode ser usado em protocolos de vacinação.

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da vacinação com a proteína recombinante que contém a porção extracelular completa de VAR2CSA (*recDBL1X-6ε: recDBL1-6*) na proteção contra MP, usando o modelo de murganho Pb-VAR para malária na gravidez. Para isso, este trabalho focou-se nas seguintes questões:

- 1) Se existe melhoria das caraterísticas associadas à MP (viabilidade e peso neonatais e mortalidade materna) em murganhos vacinados com *recDBL1-6* quando comparados com os controlos vacinados com a proteína 4-hidroxi-3-nitrofenil (NP) acetil-ovalbumina (OVA: NP-OVA) e com os controlos não vacinados e infetados (NVI), e não vacinados e não infetados (NVNI). Foi escolhida a conjugação NP-OVA como controlo da vacinação por ser um antigénio não relacionado à proteína *recDBL1-6*, além de ser imunogénica⁴³. Assim, os animais do grupo controlo foram submetidos a condições semelhantes de manipulação e stress.
- 2) Se a proteção contra MP induzida por vacinação com *recDBL1-6* está associada a anticorpos específicos IgG anti-DBL1-6 e subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) existentes no soro.

Uma vacina capaz de inibir a ligação de Els ao CSA, conferindo assim proteção contra MP, seria altamente benéfica para mulheres grávidas e neonatos nas regiões onde a malária é um sério problema de saúde pública.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Os murganhos utilizados nas experiências vieram do biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência. Foram utilizadas fêmeas *Mus musculus*, estirpe BALB/c, com idades entre 15 e 38 semanas, e machos da estirpe C57Bl/6, somente para acasalamento. Os animais foram mantidos em condições livres de patógenos específicos (SPF) e todos os procedimentos seguiram os regulamentos de cuidados com animais de laboratório e foram aprovados pelas autoridades nacionais.

2.2. Acompanhamento da gravidez e avaliação do pós parto

Murganhos fêmeas BALB/c foram colocadas em caixas com machos C57Bl/6 (1 fêmea:2 machos) e observadas durante três dias consecutivos para verificar a presença de tampão vaginal. Sempre que foi detetado um tampão vaginal, as fêmeas foram pesadas e imediatamente separadas dos machos e esse foi considerado o dia de gestação 1 (G1). No suposto 12º dia de gestação (G12), as fêmeas foram novamente pesadas para garantir a existência ou ausência de gravidez: aumento de peso superior a 4-5 g em relação a G1 foi considerado existência de gravidez. As fêmeas que não estavam grávidas foram novamente colocadas com machos, nas mesmas condições previamente descritas. Este processo foi repetido ao longo das 13 semanas seguintes, até que todas as fêmeas tivessem engravidado. O peso dos recém-nascidos (RN) e a viabilidade fetal (número de nados-mortos), bem como a mortalidade materna, foram avaliados. O peso de todas as fêmeas grávidas foi registado a partir de G13. No final da gestação, foi calculado o ganho de peso materno por cada recém-nascido : $\frac{\text{Peso}(\text{dia anterior ao parto}) - \text{Peso}(G1)}{n^{\circ} \text{ RN}}$; o ganho de peso materno no intervalo de tempo da infecção: $\frac{\text{Peso}(\text{dia anterior ao parto}) - \text{Peso}(G13)}{n^{\circ} \text{ RN}}$; e também o ganho de peso materno por

recém-nascido no intervalo de tempo entre G17 e o dia anterior ao parto:

$$\frac{\text{Peso}(\text{dia anterior ao parto}) - \text{Peso}(G17)}{n^{\circ} RN}$$

2.3. Imunização

Os animais foram imunizados com 8,85 µg da proteína *recDBL1-6*, proveniente do laboratório do Doutor Benoît Gamain (Université Paris Diderot, Paris, França), precipitada em Al(OH)₃ (hidróxido de alumínio); ou com 8,85 µg da proteína 4-hidroxi-3-nitrofenil (NP) acetil-ovalbumina (OVA) (Biosearch Technologies): NP-OVA (grupo controle), preparada nas mesmas condições. A solução de imunização foi preparada adicionando-se à proteína (*recDBL1-6* ou NP-OVA) o mesmo volume de solução de sulfato de potássio alumínio a 9% (9g em 100ml de água) estéril (Sigma-Aldrich) e precipitado com hidróxido de sódio (NaOH) a 10N (2,1 µL para cada 37,5 µL de proteína)⁴⁴. O volume final foi ajustado com PBS 1x estéril, para que todas as fêmeas recebessem igual tratamento. Este procedimento foi repetido mais 2 vezes com um intervalo de 3 semanas entre cada injeção, nas mesmas condições. Todas as injeções foram subcutâneas (na nuca), com 100 µL de solução.

2.4. Parasitas e Infecção

Plasmodium berghei ANKA (Pb) (1037cl1; ANKA-GFP-Lucschiz (Luc); mutant RMgm-32; www.pberghei.eu) que expressa var2CSA (Pb-VAR) (de Moraes *et al.*, submetido) foi utilizado neste estudo. Eritrócitos infetados (EI) com Pb-VAR foram expandidos em BALB/c não grávidas (1x10⁶ células por via intraperitoneal) até a parasitemia atingir 2-5%. No dia de infecção das grávidas (G13), às fêmeas dadoras não grávidas foi retirado sangue suficiente para infetar as fêmeas grávidas com 10⁵ EIs. Estas últimas fêmeas receberam uma injeção intravenosa de 100 µL de PBS com 10⁵ EIs pela veia da cauda ou pelo plexo ocular. A partir do 3º dia após a infecção (G16), foi retirada

diariamente a cada fêmea uma gota de sangue, para avaliar a parasitemia no sangue periférico.

2.5. Parasitemia

A parasitemia foi avaliada por citometria de fluxo detectando-se o sinal de fluorescência do marcador de DNA DRAQ5 (Biostatus, UK) conforme anteriormente descrito⁴⁵. De forma resumida, a ponta da cauda da fêmea foi cortada e uma gota de sangue foi recolhida para 400 µl de FACS Buffer (PBS 1x, 2% FBS, azida de sódio 0.02%). A cada amostra de sangue foi adicionado 0,08 µl de DRAQ5. A parasitemia foi medida em % de células marcadas (os eritrócitos não infectados não são marcados, uma vez que não têm DNA ao qual o DRAQ5 se possa ligar).

2.6. Desenho experimental

Murganhos fêmeas BALB/c foram divididas em dois grupos: 15 fêmeas de teste e 15 fêmeas controlo. Os animais foram imunizados 3 vezes com intervalo de 21 dias entre cada dose (figura 3). Antes da primeira imunização (T0), e imediatamente antes das injeções seguintes (T2 e T3) o sangue foi recolhido para avaliação dos títulos de anticorpos IgG anti-DBL1-6 no soro. O isolamento do soro foi feito em 2 centrifugações a 1600 g durante 10 minutos e foi conservado a -20°C até utilização. Vinte e seis dias após a terceira imunização as fêmeas foram postas a acasalar. Depois de observado o tampão vaginal, as fêmeas foram separadas dos machos e pesadas, sendo esse considerado o primeiro dia de gestação. Em G13, as fêmeas foram pesadas, foi-lhes tirado sangue para isolamento e armazenamento do soro como previamente descrito e foram infetadas intravenosamente com 10^5 EIs com Pb-VAR. O peso das fêmeas foi registado diariamente a partir de G15 até ao fim da gestação, bem como os seus níveis de parasitemia no sangue periférico. Após o parto (PP: G20/21), foi retirado sangue da mãe para isolamento e armazenamento do soro. A viabilidade e o peso dos fetos foram

registados. Em alguns casos, as fêmeas morreram antes de dar à luz (não tendo sido possível isolar o seu soro nem avaliar o estado dos fetos) e, noutros casos ainda, as fêmeas não deram à luz no período esperado e, de forma a minimizar o seu sofrimento, foram eutanaziadas (tendo sido isolado o seu soro e avaliado o estado dos fetos). O desenho experimental está representado na figura 3. Os resultados da gravidez das fêmeas testadas (*recDBL1-6* em $Al(OH)_3$) foram comparados com os resultados observados nas fêmeas controlo (OVA em $Al(OH)_3$, não infectadas e não vacinadas).

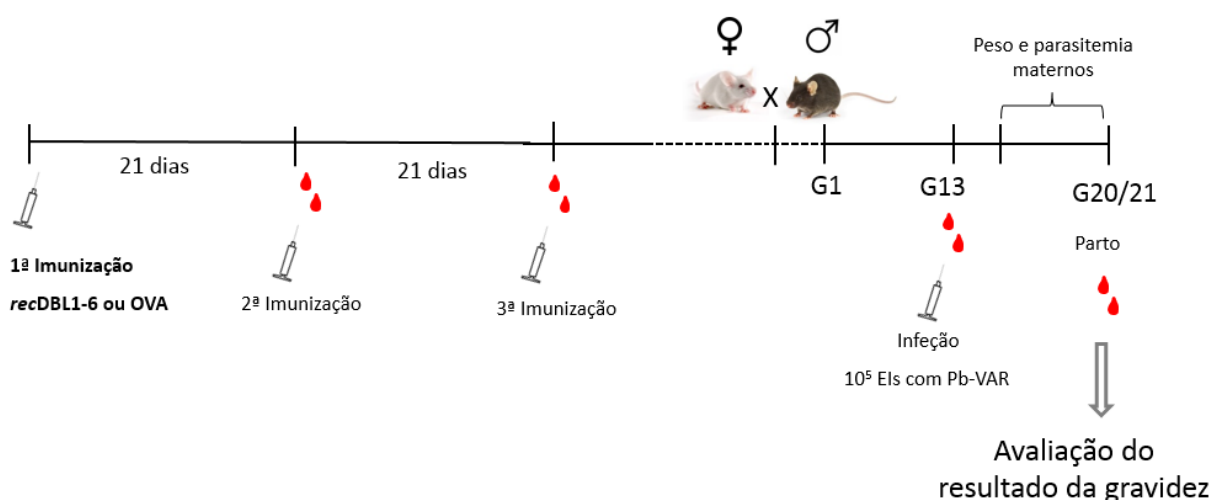


Figura 3. Esquema representativo do processo de imunização e de acompanhamento da gravidez.

2.7. Avaliação dos títulos de anticorpos IgG anti-DBL1-6 por ELISA

No sentido de detetar a presença de anticorpos IgG e as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 específicas para DBL1-6 nos soros recolhidos em diferentes fases do processo de imunização e da gravidez, foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA). De forma resumida, microplacas de alta ligação com 96 ou 384 poços foram revestidas com, respetivamente, 0,1 e 1 $\mu\text{g/ml}$ de *recDBL1-6* e deixadas de um dia para o outro. No dia seguinte, os poços foram bloqueados com PBS/BSA 1%, lavados e folhas adicionado 100 μl ou 20 μl (conforme a microplaca fosse de 96 ou 384 poços,

respetivamente) do soro seriadamente diluído. Depois de incubações e lavagens, foram adicionados, respetivamente, 100µl ou 25µl dos anticorpos IgG anti-murganho ou subclasses IgG anti-murganho (diluídos 1:5000; Jackson ImmunoResearch) marcados com peroxidase de rábano (*horseradish peroxidase* – HRP). Após uma hora de incubação, os poços foram lavados e foi-lhes adicionado, respetivamente, 100µl ou 25µl do cromógeno tetrametilbenzidina (TMB, BD Biosciences). As placas foram lidas usando o comprimento de onda de 450 nm. Os títulos de anticorpo anti-DBL1-6 foram estabelecidos à diluição correspondente a densidades óticas (OD) de 20% da OD do nível de saturação⁴⁶. Nos casos em que não foi possível identificar a OD do nível de saturação, foi construída uma curva com todos os valores de OD medidos, e os títulos foram estabelecidos à diluição correspondente a ODs posicionadas na parte descendente da curva, antes do nível de estagnação.

2.8. Tratamento estatístico dos dados obtidos

Os dados foram estatisticamente tratados no GraphPad Prism (versão 5.01). Para avaliar associações entre variáveis qualitativas foi usado o teste do Qui-quadrado (X^2). O teste *t* não pareado foi usado para comparar duas populações com distribuição normal, enquanto o teste *Mann Whitney* foi usado para comparar duas populações sem distribuição normal. Para comparar três ou mais populações, foi usado o teste *One-way ANOVA* com pós-teste *Tukey*, para comparações múltiplas quando as populações apresentavam uma distribuição normal; caso contrário, foi usado o teste *Friedman*, quando os dados em questão eram observações correspondentes entre si, e o teste *Kruskal-Wallis*, quando os dados eram independentes entre si (em ambos os casos, para comparações entre grupos 2 a 2 foi utilizado o pós-teste *Dunns*). Em todas as análises, foram consideradas significativas as comparações entre os dados com valor de probabilidade $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Definição de critérios para classificação da malária placentária em positiva ou negativa

Definiram-se inicialmente critérios para avaliação do desenvolvimento da malária placentária (MP). Para isso, foi necessário definir parâmetros de viabilidade (baixa ou alta) e peso (baixo ou elevado) dos neonatos com base nos valores dos neonatos de mães não vacinadas e não infetadas (NVNI). As fêmeas que foram infetadas apresentaram um decréscimo significativo da viabilidade fetal relativamente às fêmeas que não sofreram qualquer infecção (figura 4A, $p < 0.0001$). O valor mínimo de percentagem de nados-mortos registado entre as fêmeas NVNI foi 30% e, por isso, foi estabelecido que valores de nados-mortos inferiores a 30% seriam casos de viabilidade fetal alta e valores de nados-mortos iguais ou superiores a 30% seriam casos de baixa viabilidade fetal. Relativamente ao peso neonatal, os neonatos das fêmeas NVI eram significativamente menos pesados do que os das fêmeas NVNI (figura 4B, $p < 0.0001$). Para estabelecer o valor limite entre peso neonatal baixo e elevado foi tido em conta o menor valor de peso dos neonatos das mães NVNI. Assim, o valor mínimo para se considerar peso neonatal normal foi definido em 1,2g. Abaixo deste valor foi considerado peso neonatal baixo.

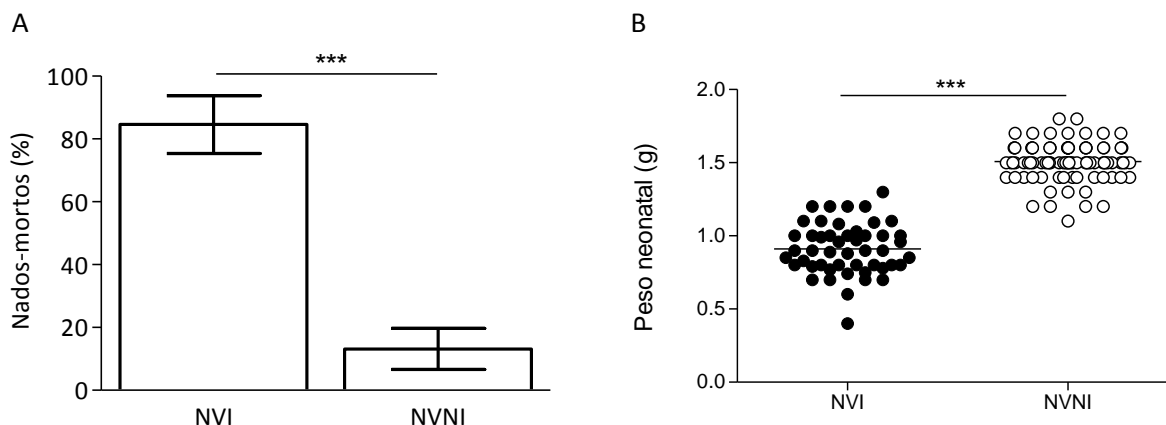


Figura 4. (A) Percentagem de nados-mortos de mães não vacinadas e infetadas (NVI) e não vacinadas e não infetadas (NVNI) (ambas não vacinadas) ($p < 0.0001$); (B) peso dos neonatos (g) de mães NVI e NVNI ($p < 0.0001$).

3.2. Efeitos da vacinação com *recDBL1-6*

Com o objetivo de se avaliar os efeitos da imunização com *recDBL1-6* na progressão da gestação, parasitemia e proteção contra MP, todas as fêmeas grávidas foram acompanhadas desde a infecção (G13) até ao parto.

3.2.1. Incidência da proteção contra MP

A proteção contra MP foi avaliada através da mortalidade materna, peso e viabilidade dos neonatos de acordo com os parâmetros anteriormente descritos. Morte materna ocorreu em todos os grupos experimentais não vacinados (NVNI, NVI) e vacinados (*recDBL1-6* ou OVA), mas com maior frequência no grupo NVI: a incidência de mortalidade materna foi aproximadamente 20% nos grupos NVNI, NP-OVA e *recDBL1-6* e aproximadamente 44% (o dobro) no grupo NVI (figura 5). Quanto às fêmeas que sobreviveram até ao final da gestação, foram divididas em quatro categorias com base no peso e incidência de morte dos neonatos: peso $\geq 1,2g$ e incidência de mortalidade <

30% (-/-), peso < 1,2g e mortalidade \geq 30% (+/+), peso \geq 1,2g e mortalidade \geq 30% (-/+)
e, finalmente, peso < 1,2g e mortalidade < 30% (+/-). A distribuição destas quatro
categorias pelos diferentes grupos experimentais foi muito variada (figura 6). O grupo
NVI foi o que teve partos com piores resultados (todos com peso < 1,2g e mortalidade \geq
30%), contrastando com o grupo NVNI que teve os melhores resultados de partos
(grande incidência de peso \geq 1,2g e de mortalidade < 30%). Quanto aos grupos NP-OVA
e *recDBL1-6*, uma percentagem menor de partos (cerca de 70%) foi caracterizada por
peso e viabilidade neonatal baixos (peso < 1,2g e mortalidade \geq 30%); e exclusivamente
no grupo *recDBL1-6*, em 23% dos partos os neonatos tiveram peso normal e viabilidade
alta (\geq 1,2g e incidência de mortalidade < 30%). Há uma associação entre o peso e a
viabilidade fetal no grupo *recDBL1-6* (tabela 1; $p = 0,0047$). Dentro deste grupo, as
fêmeas que apresentaram simultaneamente peso normal e viabilidade fetal alta foram
identificadas como DBL1-6 parcialmente protegidas (PPr) da malária placentária, e as
restantes fêmeas foram identificadas como DBL1-6 não protegidas (NP) (com sintomas
de malária placentária). No grupo NP-OVA não há qualquer distinção pois todas as
fêmeas apresentaram sintomas de malária placentária (NP). No total, segundo os
parâmetros previamente estabelecidos, 23% das fêmeas imunizadas com *recDBL1-6*
apresentaram melhorias dos sintomas de malária placentária (Figura 7); o que sugere
que a imunização com a proteína *recDBL1-6* teve um efeito parcialmente protetor em
23% das fêmeas previamente imunizadas.

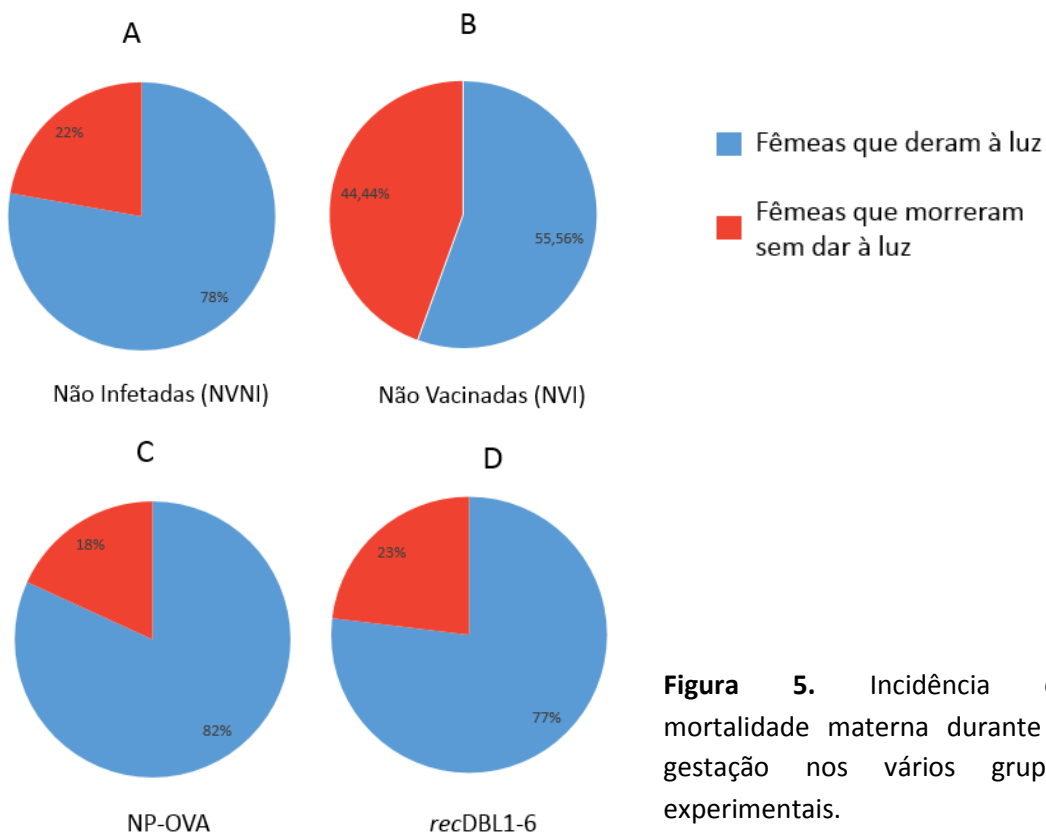


Figura 5. Incidência da mortalidade materna durante a gestação nos vários grupos experimentais.

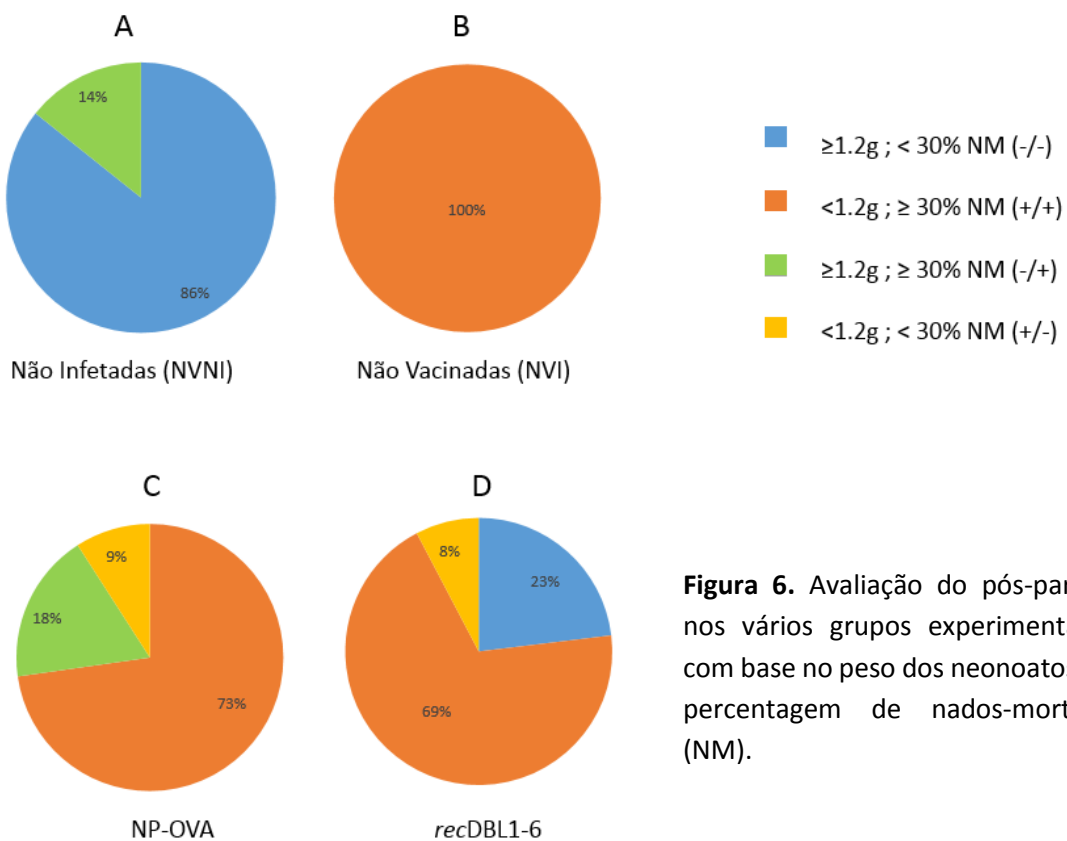


Figura 6. Avaliação do pós-parto nos vários grupos experimentais com base no peso dos neonatos e percentagem de nados-mortos (NM).

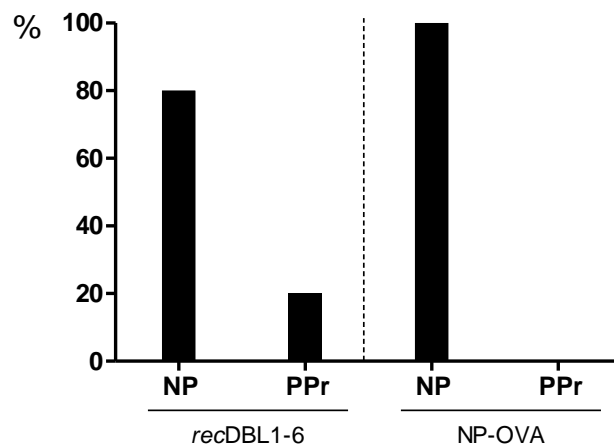


Figura 7. Incidência de malária placentária (NP) e proteção (PPr) nas mães vacinadas com *recDBL1-6* e NP-OVA.

Tabela 1. Associação entre o peso médio e viabilidade dos neonatos de mães vacinadas com *recDBL1-6* de acordo com parâmetros previamente estabelecidos para avaliação do pós-parto.

		Viabilidade neonatal baixa	
		- (< 30% NM)	+ (≥ 30% NM)
Peso neonatal baixo	- (≥ 1,2g)	3	0
	+ (< 1,2g)	1	8

3.2.1.1. Avaliação do peso e viabilidade dos neonatos

Após o parto, o número de nados-mortos e o peso dos neonatos foram registados. No que diz respeito à viabilidade neonatal (figura 8A), os grupos NVNI e DBL1-6 PPr foram os que apresentaram menor percentagem de nados-mortos por mãe (este foi um dos critérios usados para definir PPr), não havendo diferença entre os dois grupos. Os restantes grupos experimentais (NVI, NP-OVA e DBL1-6 NP) tiveram alta incidência de nados-mortos, não sendo diferentes entre si, mas significativamente diferentes de NVNI e DBL1-6 PPr.

Quanto ao peso, a média do total de neonatos de cada grupo foi diferente da de todos os outros grupos experimentais, com exceção dos grupos NVI e DBL1-6 NP que não apresentaram diferença entre si (figura 8B). Em média, entre os pesos dos neonatos registados, os mais elevados foram os do grupo NVNI, seguidos pelo grupo DBL1-6 PPr e NP-OVA e, com a média mais baixa, NVI e DBL1-6 NP.

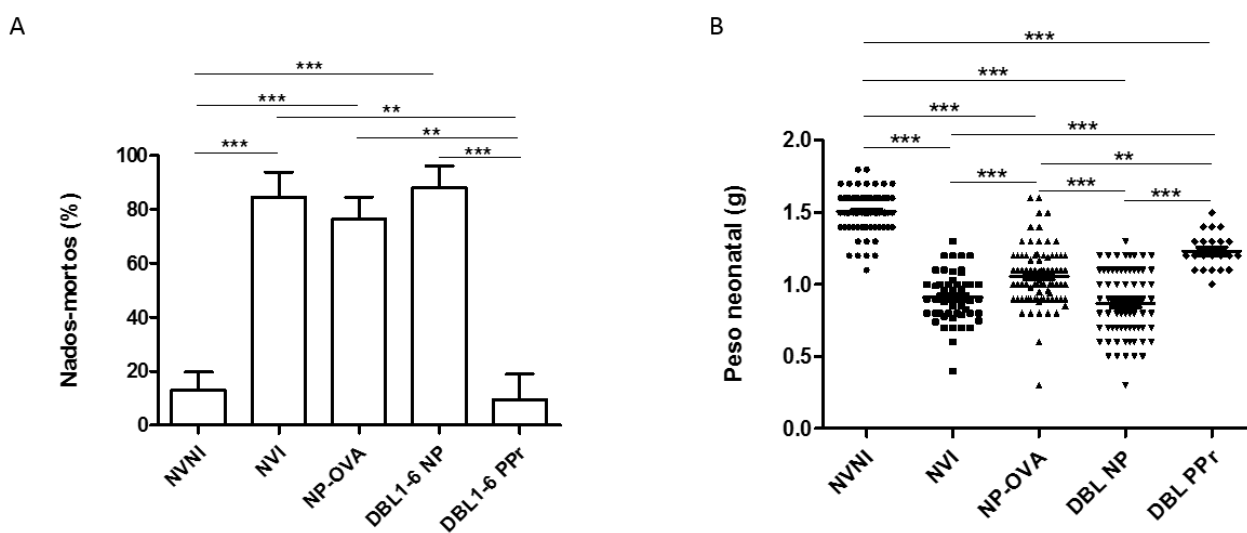


Figura 8. Viabilidade (A) e peso neonatal (B) observados nos diferentes grupos experimentais (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

3.2.2. Parasitemia ao longo da gestação

A parasitemia de todas as fêmeas grávidas e infetadas com Pb-VAR foi registrada a partir do 3º dia após a infecção (G16) até ao dia anterior ao parto. Na figura 9A está representada, em média, a progressão da parasitemia ao longo do tempo de gestação, para cada um dos grupos experimentais infetados. Apesar de não haver diferenças significativas, parece haver uma tendência para maior aumento da parasitemia nos grupos NVI e NP-OVA, especialmente a partir de G18.

Para cada uma das grávidas foi calculada a área sob a curva (ASC) de parasitemia, para melhor caracterizar a exposição ao parasita durante a gestação. A análise foi feita de duas formas diferentes: usando dados de parasitemia apenas até G19, independentemente do dia do parto, de modo a uniformizar as condições de avaliação (figura 9B); e usando todos os valores de parasitemia registrados até ao final da gestação de cada grávida, de modo a melhor retratar a exposição ao parasita a que cada grávida esteve efetivamente sujeita (figura 9C). Quando comparados entre si, os diferentes grupos experimentais não apresentaram diferenças na parasitemia, independentemente do tempo de exposição.

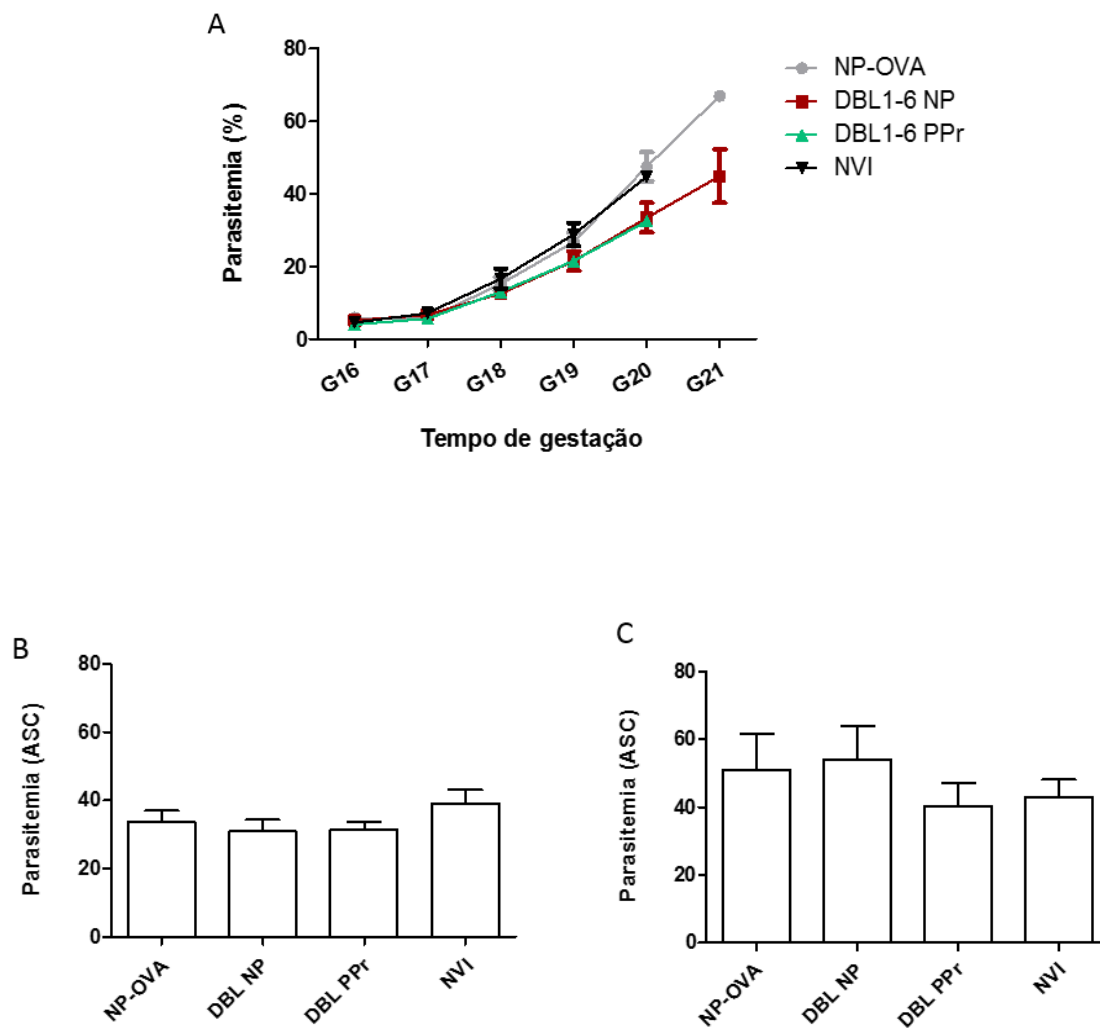


Figura 9. Progressão da parasitemia no sangue periférico materno ao longo do tempo de exposição ao Pb-VAR para os grupos experimentais infetados (A), área sob a curva (ASC) até G19 (B) e área sob a curva até ao final da gestação (C).

3.2.3. Evolução do peso materno ao longo da gestação

O peso materno foi registado diariamente a partir de G15, sendo o dia anterior ao parto o último registo de peso. Para cada grávida, foi calculado o ganho de peso por dia e normalizado para o número total de neonatos. As diferenças de ganho de peso materno entre os grupos experimentais (figura 10A) foram observadas apenas nos intervalos G15 a G16 e G18 a G19. Em ambos os períodos, o ganho de peso do grupo NVNI foi significativamente maior do que o dos grupos NVI, OVA e DBL1-6 NP. Entre os grupos NVNI e DBL1-6 PPr não houve diferença ao nível do ganho de peso materno, no entanto as grávidas DBL1-6 PPr não tiveram um ganho de peso significativamente maior do que os restantes grupos infetados.

O ganho de peso materno foi também calculado em períodos de tempo mais alargados e normalizado para o número de neonatos. O aumento de peso de cada grávida entre G13 e o dia anterior ao parto (tempo de exposição ao parasita) foi calculado e as médias comparadas entre os diferentes grupos experimentais (figura 10B). O ganho de peso materno foi também calculado para um período temporal que pareceu ser crítico (entre G17 e o dia anterior ao parto), uma vez que várias grávidas começaram a perder peso dentro desse período (figura 10C). Em ambos os períodos temporais houve diferenças no aumento de peso entre NVNI e os outros grupos experimentais, com exceção do grupo DBL1-6 PPr, que se manteve sempre mais próximo do ganho de peso do grupo NVNI. Inclusivamente, no período crítico (entre G17 e o dia anterior ao parto) o grupo DBL1-6 PPr registou, em média, um ligeiro aumento de peso, ao contrário dos outros grupos infetados em que houve perda de peso materno (estas diferenças, apesar de não serem significativas, sugerem uma tendência).

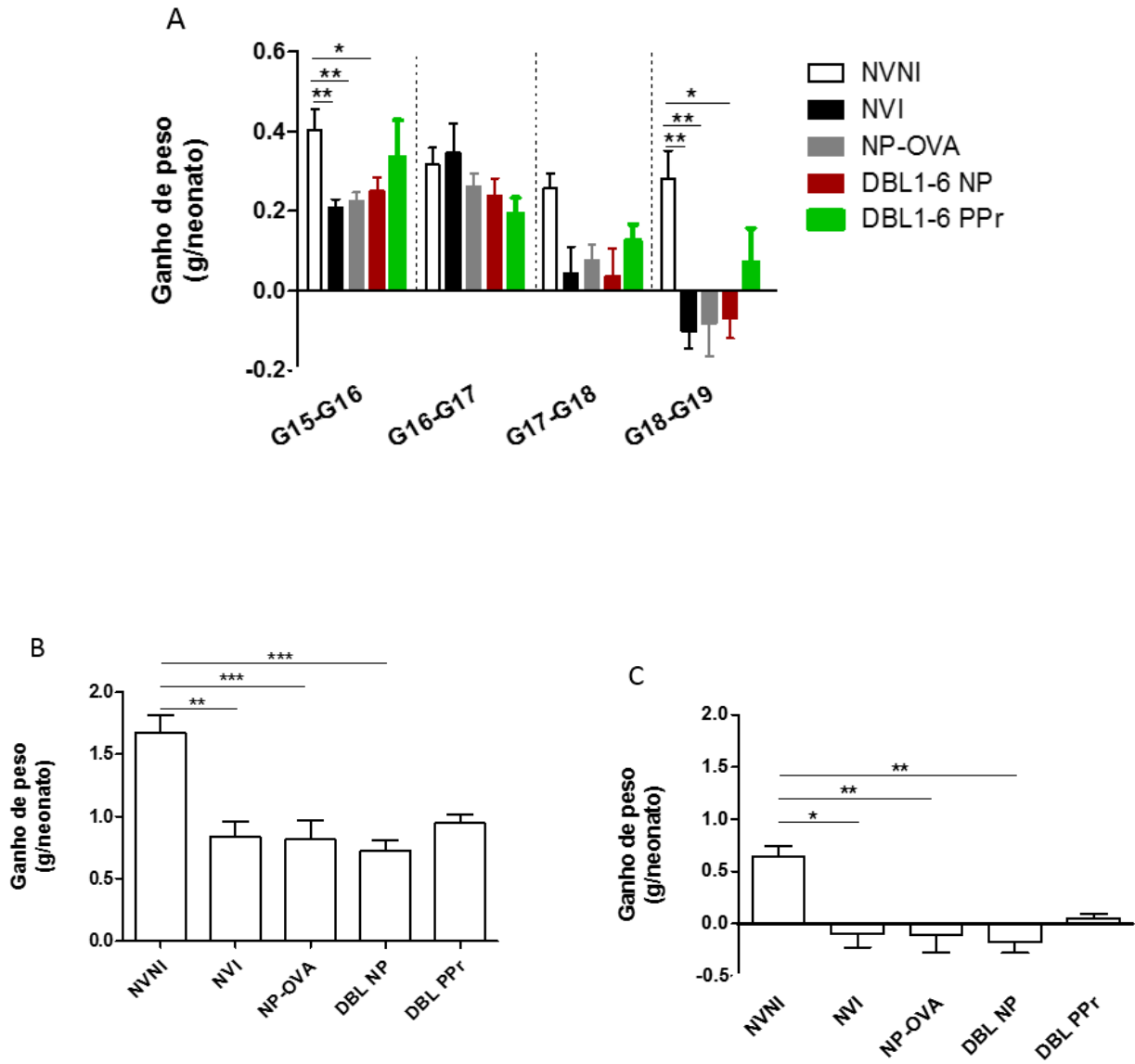
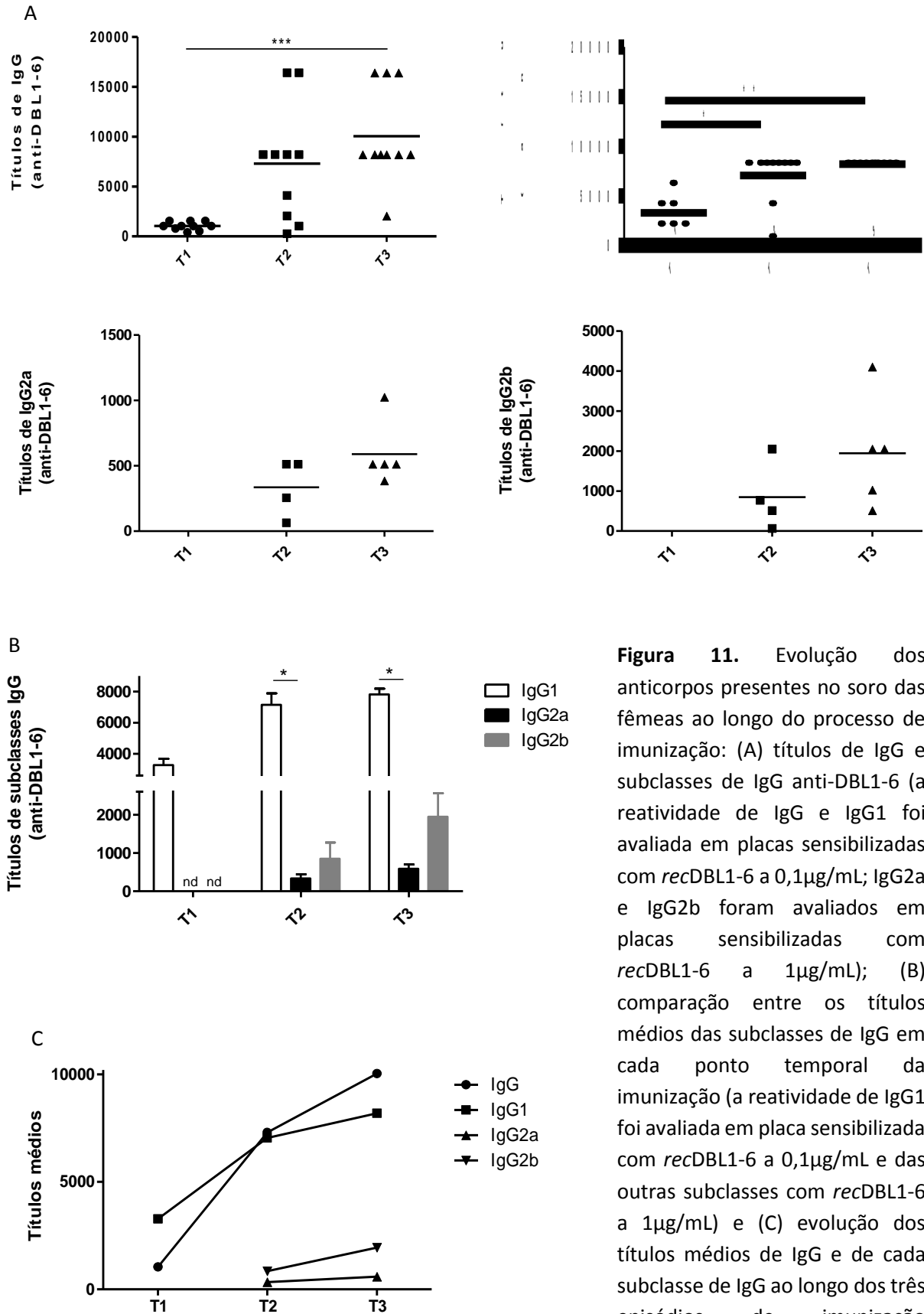


Figura 10. Evolução do peso materno ao longo da gravidez: ganho de peso materno diário de G15 até G19 normalizado para o número de neonatos (A); ganho de peso materno no intervalo de tempo [G13 – G_{antes do parto}] (B) e [G17 – G_{antes do parto}] (C) (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

3.3. Avaliação da resposta humoral em fêmeas vacinadas

3.3.1. Evolução dos níveis de produção de anticorpos específicos para *recDBL1-6* durante o processo de imunização

A vacinação das fêmeas consistiu em 3 imunizações, com um intervalo de três semanas entre cada dose de proteína (NP-OVA ou *recDBL1-6*). Três semanas após cada uma das doses, o soro das fêmeas foi isolado para avaliar os títulos de anticorpos IgG e subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, todos específicos para *recDBL1-6* (figura 11). Os títulos de IgG aumentaram significativamente no período entre T1 (21 dias após a 1ª dose de imunização) e T3 (período entre 2ª e 3ª doses), embora em T2 (período entre 1ª e 2ª doses) também se observe aumento apesar de não ser significativo (figura 11A). Os títulos observados para a subclasse IgG1 foram muito semelhantes aos do IgG total anti-DBL1-6. A detecção de IgG1 aumentou significativamente de T1 para T2 e T3, e de T2 para T3 a média dos títulos manteve-se. Quanto às subclasses IgG2a e IgG2b, não foram detetados anticorpos em T1, mas apenas em T2 e T3, sem diferenças significativas. No entanto, os títulos de IgG2a registados em T2 e T3 foram significativamente mais baixos do que os de IgG1 (figura 11B). Já os títulos de IgG2b registados em T2 e T3 não apresentaram diferenças em relação a IgG1, mas foram tendencialmente mais baixos. Relativamente à subclasse IgG3, não foi detetada em nenhum dos pontos temporais. Como era esperado, nas fêmeas controlo (NI e OVA) não foi detetado IgG anti-DBL1-6, nem qualquer uma das subclasses testadas. Em suma, a maioria dos anticorpos IgG anti-DBL1-6 parecem pertencer à subclasse IgG1 (figura 11C).



3.3.3. Presença de anticorpos no soro materno antes da infecção e após o parto

Imediatamente antes da infecção com Pb-VAR (G13) e logo após o parto (PP) foi isolado soro das mães para avaliar os títulos das subclasses IgG anti-DBL1-6 (figura 13). As mães DBL1-6 NP apresentaram diminuição dos títulos de IgG1 anti-DBL1-6 no período entre infecção e parto ($p=0,0144$), o que não se verificou nas mães PPr (figura 13A). Conseqüentemente, os títulos de IgG1 em PP foram significativamente diferentes entre as mães NP e as mães PPr ($p=0,0344$). Também as fêmeas vacinadas com NP-OVA apresentaram diminuição dos títulos de IgG1 anti-NP-OVA de G13 para o PP ($p=0,0435$) (figura 13B). Este resultado sugere que a manutenção dos títulos altos de IgG1 nas mães DBL1-6 PPr durante a gravidez foi benéfica. Quanto às subclasses IgG2a e IgG2b anti-DBL1-6, não foram observadas alterações significativas de títulos no referido período, nem diferenças entre as mães NP e PPr (figuras 13C e 11D). A subclasse IgG3 não foi detetada na maioria das fêmeas e naquelas em que foi detetada os títulos eram praticamente vestigiais.

Em G13 (figura 14A) e PP (figura 14B), IgG1 mostrou ser a subclasse predominante em ambos os grupos (NP e PPr). As fêmeas NP apresentaram títulos de IgG1 significativamente mais altos do que IgG2a e IgG2b, tanto em G13 como em PP. Quanto às mães PPr, a diferença foi significativa apenas em PP; no entanto, também em G13, os títulos de IgG1 são claramente mais altos do que IgG2a e IgG2b, sendo a ausência de significância devida ao pequeno número da amostra ($n=3$).

Foram também feitos os raios entre as quatro subclasses (duas a duas). Os raios entre as subclasses IgG2a e IgG2b foram baixos, pois os títulos destas subclasses foram muito semelhantes entre si, tanto em G13 (figura 14C) como em PP (figura 14D). Além disso, não se verificaram diferenças entre as mães NP e PPr. Os raios entre IgG1 e cada uma das outras subclasses apresentaram valores mais altos pois, como tinha já sido observado, IgG1 predominava em relação às outras subclasses. Em G13 não se registaram diferenças significativas entre as mães NP e PPr, mas em PP os raios IgG1/IgG2a e IgG1/IgG2b foram significativamente maiores para as mães PPr. Este resultado parece indicar que não só a manutenção de títulos altos de IgG1 anti-DBL1-6

é benéfica, como um maior rácio entre IgG1 e IgG2a e IgG2b é uma boa influência para a mãe e os seus fetos.

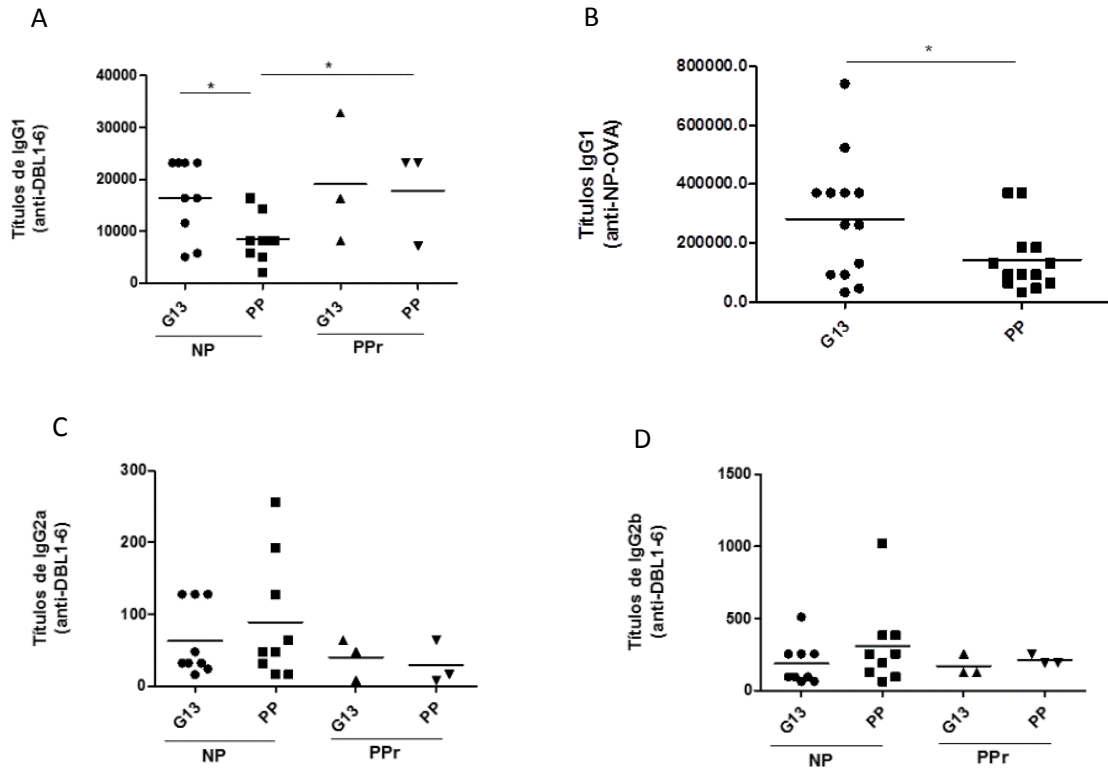


Figura 13. Títulos das subclasses de IgG anti-DBL1-6 no dia da infeção (G13) e após o parto (PP) para as mães parcialmente protegidas (PPr) e não protegidas (NP) (A, C e D) e títulos de IgG1 anti-NP-OVA em G13 e PP (B) (* $p < 0,05$). A reatividade de todas as subclasses foi avaliada em placas sensibilizadas com *recDBL1-6* a $1\mu\text{g}/\text{mL}$.

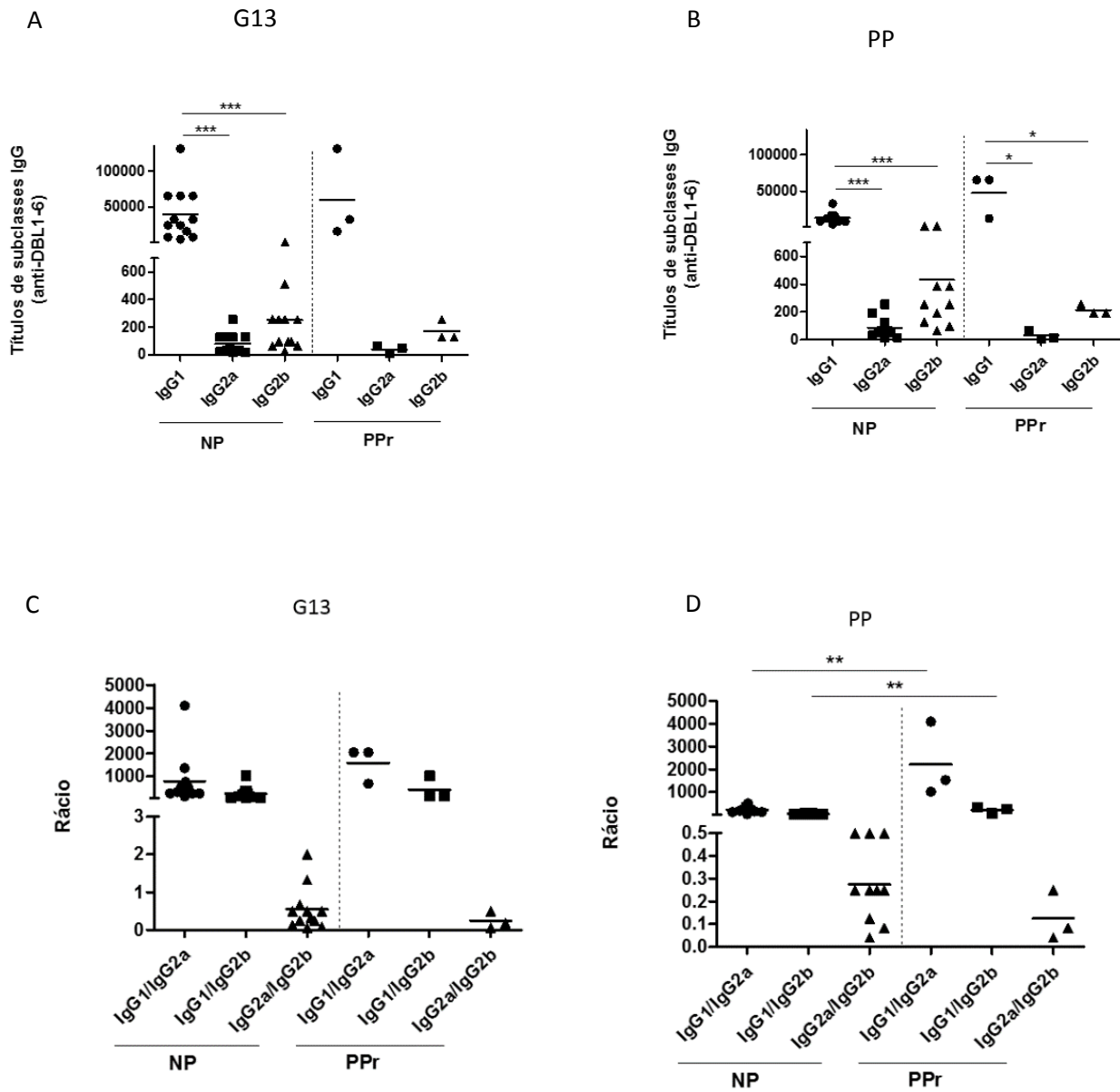


Figura 14. Comparação entre os títulos das subclasses de IgG anti-DBL1-6 no dia da infecção (G13) (A) e após o parto (PP) (B) para as mães protegidas (PPr) e não protegidas (NP) e rácios entre as subclasses em G13 (C) e PP (D) para cada grupo (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

4. Discussão

Neste estudo mostrou-se que a vacinação com a proteína recombinante DBL1-6 conferiu proteção parcial contra malária placentária a 23% das fêmeas (figura 6). Os critérios de avaliação da incidência da malária placentária ou proteção parcial contra a doença basearam-se no peso e viabilidade dos neonatos. Observou-se que os neonatos de mães parcialmente protegidas (DBL1-6 PPPr) tiveram viabilidade semelhante à observada em neonatos de mães não infetadas e não vacinadas, ao mesmo tempo que apresentaram melhoria significativa em relação a todos os outros grupos infetados (figura 8A). Quanto ao peso, apesar dos neonatos de mães protegidas terem apresentado melhorias em relação aos outros grupos infetados, os seus pesos continuaram a ser significativamente mais baixos do que os dos neonatos de mães não infetadas e não vacinadas (figura 8B). Em termos de mortalidade materna antes do parto, as fêmeas imunizadas com *recDBL1-6* assim como com OVA tiveram percentagens muito semelhantes à das fêmeas não infetadas e não vacinadas, e aumento de sobrevivência em relação às infetadas e não vacinadas (figura 5), o que sugere um papel do adjuvante neste processo. Não houve diferenças no nível da parasitemia entre os vários grupos experimentais, o que sugere que a proteção não está relacionada com a quantidade de parasita em circulação no sangue, mas provavelmente com a diminuição da acumulação de EIs na placenta mediada por anticorpos capazes de impedir a ligação entre os eritrócitos infetados (EIs) e o CSA na placenta. Estudos mostram que a parasitemia e a acumulação de parasitas na placenta podem ser independentes uma da outra, podendo ser detetados parasitas na placenta sem que sejam detetados no sangue periférico¹³. Além disso, a exposição do VAR2CSA na superfície dos EIs com Pb-VAR ocorre aproximadamente em apenas 10% da população (de Moraes *et al.*, submetido), logo só a pequena população de EIs que expressa a proteína poderia ser alvo dos anticorpos gerados pela vacinação. A parasitemia durante a gravidez das mães protegidas é indicativo de malária, logo a vacina usada neste estudo poderá ter protegido contra malária placentária, mas não contra malária durante a gravidez. Entre G13 e o pós-parto (PP), o aumento de peso das mães protegidas foi semelhante ao das mães não vacinadas e não infetadas. Observou-se que IgG1 foi a subclasse

predominante durante o período de imunização (T1, T2 e T3; figuras 9B e 9C), em que foram analisados os títulos de anticorpos IgG e subclasses de IgG específicos para a proteína *recDBL1-6*. Também em G13 (imediatamente antes da infecção) e após o parto, IgG1 foi predominante em relação às subclasses IgG2a e IgG2b. No entanto, enquanto os títulos de IgG2a e IgG2b se mantiveram constantes entre G13 e PP em mães protegidas e não protegidas, os títulos de IgG1 em mães não protegidas sofreram uma diminuição significativa no pós-parto, tendo-se mantido constantes nas mães parcialmente protegidas.

O protocolo de vacinação constou de imunizações com $Al(OH)_3$. A escolha deste adjuvante deve-se à sua aplicação em protocolos de vacinação na população humana. Os adjuvantes de alumínio, como é o caso do $Al(OH)_3$, caracterizam-se por desencadear fortes respostas imunitárias mediadas por anticorpos⁴⁷, além de serem seguros, estáveis e de fácil preparação. $Al(OH)_3$ é um adjuvante que gera respostas do tipo Th2⁴⁸, que induzem preferencialmente mudança de subclasse para IgG1. No entanto, dentro das subclasses de IgG, IgG2a e IgG2b são geralmente as mais potentes para ativar respostas efectoras, logo seria interessante, em termos comparativos, alterar o regime de vacinação, usando como adjuvante CPG-ODN, que gera uma resposta do tipo Th1, induzindo mudança de subclasse para IgG2a, IgG2b e IgG3⁴⁹; ou a combinação de $Al(OH)_3$ com CPG-ODN, gerando assim um repertório mais amplo de subclasses de IgG anti-DBL1-6 e com maior avides⁵⁰. As subclasses de IgG apresentam diferentes afinidades para recetores Fc de ativação e recetores Fc de inibição, o que se traduz na sua capacidade diferencial de mediar respostas efectoras^{49,51}. É por isso importante ter em conta as diferentes subclasses de IgG no desenho de uma vacina.

Os títulos de anticorpos IgG e subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b específicos para DBL1-6 aumentaram ao longo do processo de imunização no período entre T1 e T3. Durante a primeira exposição ao antigénio, as células B podem diferenciar-se em plasmócitos de curta duração, que têm baixa afinidade para o antigénio em questão pois expressam anticorpos não mutados e, conseqüentemente, protegem o organismo hospedeiro contra variantes do patógeno invasor³⁹. A resposta primária gera maioritariamente plasmócitos de curta duração e, por isso, é uma resposta transitória⁵. No entanto, algumas células B entram no centro germinal, diferenciam-se em células B

de memória e estas, por sua vez, podem diferenciar-se em plasmócitos de longa duração, que secretam anticorpos com alta afinidade para o antigénio em questão. Quando o organismo é reexposto a esse antigénio, dá-se uma resposta secundária, que é mais rápida e eficaz do que a resposta primária, como resultado da ação das células B de memória e dos plasmócitos de longa duração, ambos específicos para o antigénio. Sucessivas exposições a um antigénio levam a um aumento da população de plasmócitos de longa duração com especificidade para o mesmo. Estes plasmócitos de longa duração sobrevivem na matriz óssea e continuam a secretar anticorpos IgG específicos durante longos períodos (meses, ou mesmo anos), mesmo sem a presença do antigénio^{5,38}. Assim sendo, a cinética dos títulos de anticorpos registados ao longo do processo de imunização está de acordo com a resposta das células B acima descrita. Em T1, as fêmeas tinham sido expostas pela primeira vez à proteína *recDBL1-6*. Após a reexposição, em T2, os títulos de IgG e subclasses de IgG anti-DBL1-6 aumentaram consideravelmente. Entre T2 e T3 foi também observado aumento, ainda que tenha sido menor do que no período anterior (figuras 9A e 9C). É possível que os aumentos sucessivos dos níveis de anticorpos específicos em circulação após cada imunização sejam devidos ao aumento de plasmócitos de longa duração que os secretem continuamente. Estudos anteriores mostram que os anticorpos desempenham um papel importante na proteção contra malária^{5,40}. Foi proposto que a exposição sucessiva ao parasita produzisse plasmócitos de longa duração ou células B de memória que fossem rapidamente reativadas e se diferenciassem em plasmócitos que secretam anticorpos⁵.

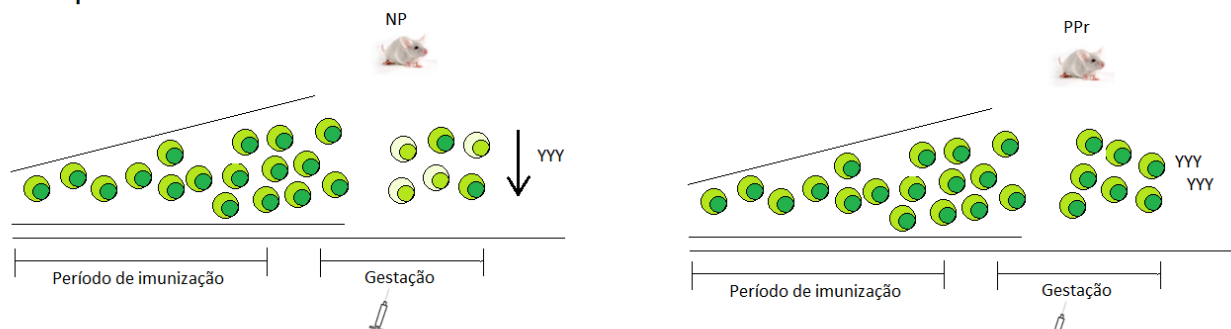
Ao comparar os títulos de IgG1 em G13 e após o parto (PP) observou-se redução significativa dos níveis deste anticorpo no grupo NP, enquanto que no grupo PPr os níveis mantiveram-se e estavam aumentados em relação às mães NP (figura 13A). Estas observações sugerem que a manutenção dos níveis de IgG1 durante a gravidez terá um papel na proteção contra malária placentária. Estudos mostram que, em mães infetadas com o parasita da malária, os títulos de IgG aumentam ao longo da gestação e diminuem imediatamente após o parto^{40,32}. Esta diminuição dos títulos de IgG1 após o parto também foi observada nas fêmeas imunizadas com OVA (figura 13B), o que sugere que poderá estar relacionada com a infeção. Para melhor compreender o efeito da infeção na dinâmica da resposta humoral, seria necessário acompanhar animais que tivessem

sido submetidos ao mesmo regime de vacinação sem terem sido infectados durante a gravidez; no entanto, devido à restrição de materiais, nomeadamente da quantidade de proteína *recDBL1-6*, não foi possível fazer esta abordagem. As subclasses IgG2a e IgG2b mantiveram títulos semelhantes entre G13 e PP e também não apresentaram diferenças entre fêmeas NP e PPr (figuras 11C e 11D). No entanto, os rácios IgG1/IgG2a e IgG1/IgG2b foram significativamente maiores em PP nas mães protegidas (figura 14D), o que parece sugerir que foi mais vantajoso para as fêmeas terem títulos de IgG1 muito mais altos do que IgG2a e IgG2b. A manutenção dos títulos de IgG1 nas mães protegidas é um acontecimento para o qual não foi encontrada explicação, uma vez que todas as fêmeas receberam o mesmo tratamento. No entanto, provavelmente isto não estará relacionado com níveis altos de IgG1 no momento da infeção, já que os títulos entre NP e PPr em G13 são semelhantes. Portanto, é possível que altos níveis de IgG1 no momento da infeção sejam importantes, mas essa condição só por si não parece ser suficiente para garantir a proteção. Assim, duas hipóteses distintas podem ser levantadas:

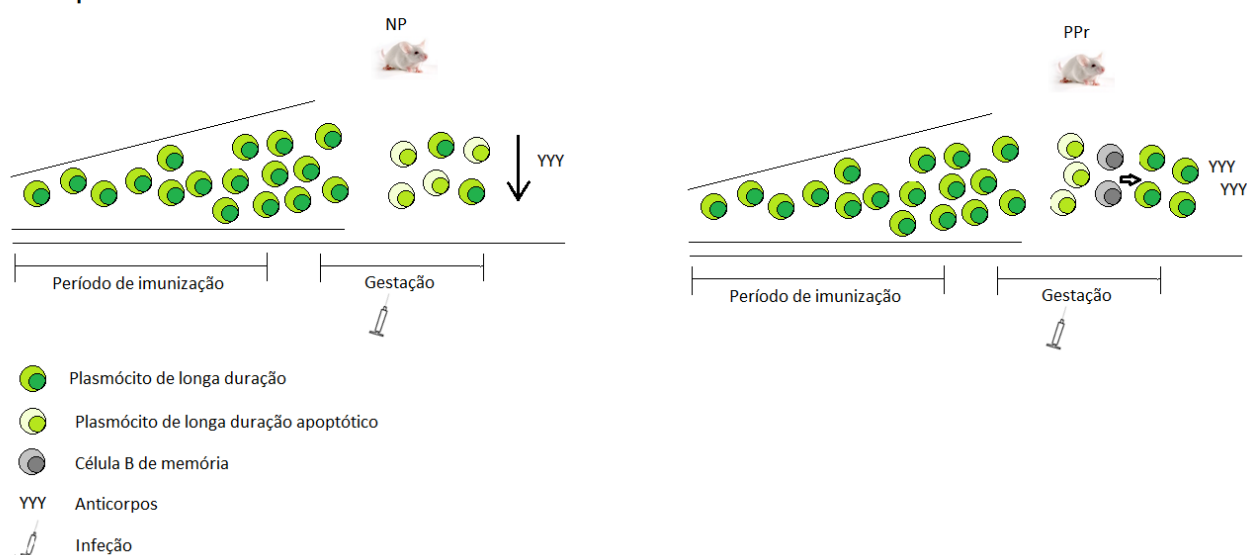
1^a hipótese: a manutenção dos títulos de anticorpos IgG1 no pós-parto no grupo com proteção parcial pode ser maioritariamente devida a plasmócitos de longa duração gerados durante as imunizações e, portanto, já existentes no organismo no momento da infeção. No caso das mães NP, os plasmócitos de longa duração poderiam ter sido eliminados por morte celular programada (apoptose), o que explicaria a queda dos níveis de anticorpos (figura 15). Essa divergência entre as populações teria que ser suficiente para gerar as diferenças observadas na dinâmica de anticorpos entre mães PPr e mães NP.

2^a hipótese: a manutenção dos títulos altos de IgG1 entre G13 e pós-parto em mães PPr pode ser maioritariamente devida a células B de memória, geradas durante as imunizações e que, quando expostas à infeção, são rapidamente ativadas e diferenciam-se em plasmócitos que secretam anticorpos com grande afinidade para o antígeno. No caso das mães NP, é possível que as células de memória não respondessem à infeção de forma tão eficaz quanto as mães PPr (figura 15).

1ª Hipótese



2ª Hipótese



Plasmócito de longa duração

Plasmócito de longa duração apoptótico

Célula B de memória

YYY Anticorpos

Infecção

Figura 15. Hipóteses propostas para a diferença na dinâmica da resposta humoral observada entre mães NP e PPr no pós-parto.

A observação de que animais não protegidos também exibiram títulos altos de IgG1 anti-DBL1-6 indica que será necessário um estudo mais detalhado acerca das propriedades de anticorpos específicos. De fato, a desvantagem da utilização de uma molécula grande e complexa para vacinação, como é o caso de *recDBL1-6*, é a possibilidade de geração de anticorpos com especificidades para diferentes domínios da molécula. No entanto, ainda não se sabe se domínios individuais de *recDBL1-6* se ligam ao CSA na placenta, ou se essas partes da molécula interagem entre si criando sítios de

ligação ao mesmo¹⁹. Torna-se assim importante definir a região de ligação ao CSA para desenvolver uma vacina mais eficaz, que produza anticorpos cujo alvo seja especificamente essa região. Vários estudos recentes têm-se focado nesta questão, e têm sido encontradas evidências de que o sítio de ligação ao CSA poderá estar restrito à região N-terminal de VAR2CSA (DBL1X-3X)^{26,28-30}, devido à maior imunogenicidade. Porém, foi recentemente demonstrado que o soro de mulheres multigrávidas tinha maior reatividade contra os domínios da região C-terminal (DBL4ε-6ε)²⁷, o que sugere que esta região tem também um papel importante na proteção.

Os resultados deste trabalho sugerem que a proteção parcial contra MP induzida pela vacinação com a porção extracelular do VAR2CSA está relacionada com a manutenção de títulos da subclasse IgG1 específica para *recDBL1-6* e também com a sua predominância em relação às subclasses IgG2a e IgG2b. No entanto, é necessário desenvolver uma vacina mais eficaz, que tenha uma maior incidência de proteção.

Bibliografia

1. WHO | World Malaria Report 2014. Em: WHO [Internet]. [citado 14 Setembro 2015]. Disponível: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/
2. Beeson, J. G. & Brown, G. V. Pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria : the roles of parasite adhesion and antigenic variation. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 258–271 (2002).
3. Douglas, R. G., Amino, R., Sinnis, P. & Frischknecht, F. Active migration and passive transport of malaria parasites. *Trends Parasitol.* **31**, 357–362 (2015).
4. Zheng, H., Tan, Z. & Xu, W. Immune evasion strategies of pre-erythrocytic malaria parasites. *Mediators Inflamm.* **2014**, 1–6 (2014).
5. Hviid, L., Barfod, L. & Fowkes, F. J. I. Trying to remember: immunological B cell memory to malaria. *Trends Parasitol.* **31**, 89–94 (2015).
6. Jancik J.M., Schauer R., A. K. H. and von D. M. Cell and Tissue Sequestration of Neuraminidase-Treated Erythrocytes. *Cell Tissue Res.* **226**, 209–226 (1978).
7. Krücken, J. *et al.* Massive destruction of malaria-parasitized red blood cells despite spleen closure. *Infect. Immun.* **73**, 6390–8 (2005).
8. Mens, P. F., Bojtor, E. C. & Schallig, H. D. F. H. Molecular interactions in the placenta during malaria infection. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **152**, 126–32 (2010).
9. Menendez, C. Malaria During Pregnancy : A Priority Area of Malaria Research and Control. *Parasitol. Today* **11**, 178–183 (1995).
10. Brabin, B. J., Romagosa, C., Abdelgalil, S. & Mene, C. The Sick Placenta — The Role of Malaria. *Placenta* **25**, 359–378 (2004).
11. Desai, M. *et al.* Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* **7**, 93–104 (2007).
12. Hartman, T. K., Rogerson, S. J. & Fischer, P. R. The impact of maternal malaria on newborns. *Ann. Trop. Paediatr.* **30**, 271–82 (2010).
13. Uneke, C. J. Impact of Placental Plasmodium falciparum Malaria on Pregnancy and Perinatal Outcome in Sub-Saharan Africa I : Introduction to Placental Malaria. *YALE J. Biol. Med.* **80**, 39–50 (2007).
14. Neres, R., Marinho, C. R. F., Gonçalves, L. a, Catarino, M. B. & Penha-Gonçalves, C. Pregnancy outcome and placenta pathology in Plasmodium berghei ANKA infected mice reproduce the pathogenesis of severe malaria in pregnant women. *PLoS One* **3**, e1608 (2008).

15. Desforgues, M. & Sibley, C. Placental nutrient supply and fetal growth. *Int J Dev Biol* **54**, 377–390 (2010).
16. Enders, A. C. & Blankenship, T. N. Comparative placental structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **38**, 3–15 (1999).
17. Dilworth, M. R. & Sibley, C. P. Review: Transport across the placenta of mice and women. *Placenta* **34**, S34–9 (2013).
18. M. Tong and L.W. Chamley. Placental Extracellular Vesicles and Feto-Maternal Communication. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**, 1–18 (2015).
19. Avril, M. *et al.* Antibodies to a full-length VAR2CSA immunogen are broadly strain-transcendent but do not cross-inhibit different placental-type parasite isolates. *PLoS One* **6**, e16622 (2011).
20. Duffy, P. E. & Fried, M. Antibodies That Inhibit Plasmodium falciparum Adhesion to Chondroitin Sulfate A Are Associated with Increased Birth Weight and the Gestational Age of Newborns. *Infect. Immun.* **71**, 6620–6623 (2003).
21. Umbers, A. J., Aitken, E. H. & Rogerson, S. J. Malaria in pregnancy: small babies, big problem. *Trends Parasitol.* **27**, 168–175 (2011).
22. Baruch, D., Pasloske, B., Singh, H. & Bi, X. Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* **82**, 77–87 (1995).
23. Srivastava, A. *et al.* Full-length extracellular region of the var2CSA variant of PfEMP1 is required for specific, high-affinity binding to CSA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4884–9 (2010).
24. Maestre, A. & Carmona-Fonseca, J. Immune responses during gestational malaria: a review of the current knowledge and future trend of research. *J. Infect. Dev. Ctries.* **8**, 391–402 (2014).
25. Muthusamy, A. *et al.* Plasmodium falciparum-infected erythrocytes adhere both in the intervillous space and on the villous surface of human placenta by binding to the low-sulfated chondroitin sulfate proteoglycan receptor. *Am. J. Pathol.* **164**, 2013–25 (2004).
26. Ndam, N. T. *et al.* Protective Antibodies against Placental Malaria and Poor Outcomes during Pregnancy, Benin. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 813–23 (2015).
27. Travassos, M. a *et al.* Differential recognition of terminal extracellular Plasmodium falciparum VAR2CSA domains by sera from multigravid, malaria-exposed Malian women. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **92**, 1190–4 (2015).
28. Dechavanne, S. *et al.* Parity-dependent recognition of DBL1X-3X suggests an important role of the VAR2CSA high-affinity CSA-binding region in the development of the humoral response against placental malaria. *Infect. Immun.* **83**, 2466–74 (2015).

29. Srivastava, A. *et al.* Var2CSA minimal CSA binding region is located within the N-terminal region. *PLoS One* **6**, e20270 (2011).
30. Nunes-Silva, S. *et al.* Llama immunization with full-length VAR2CSA generates cross-reactive and inhibitory single-domain antibodies against the DBL1X domain. *Sci. Rep.* **4**, 7373 (2014).
31. Lambert, L. H. *et al.* Antigen reversal identifies targets of opsonizing IgGs against pregnancy-associated malaria. *Infect. Immun.* **82**, 4842–53 (2014).
32. Staalsoe, T. *et al.* Acquisition and Decay of Antibodies to Pregnancy-Associated Variant Antigens on the Surface of Plasmodium falciparum – Infected Erythrocytes That Protect against Placental Parasitemia. **184**, 618–626 (2001).
33. Gamain, B. & Trimnell, A. Identification of multiple chondroitin sulfate A (CSA)–binding domains in the var2CSA gene transcribed in CSA-binding parasites. *J. Infect. Dis.* **191**, 2–5 (2005).
34. Tutterrow, Y. Lo *et al.* High avidity antibodies to full-length VAR2CSA correlate with absence of placental malaria. *PLoS One* **7**, e40049 (2012).
35. Fried, M., Nosten, F., Brockman, A., Brabin, B. & Duffy, P. Maternal antibodies block malaria. *Nature* **395**, 851–852 (1998).
36. Costa, F. T. M. & Avril, M. Cytoadhesion of Plasmodium falciparum -infected erythrocytes and the infected placenta : a two-way pathway. *Braz J Med Biol Res* **39**, 1525–1536 (2006).
37. MacLennan, I. C. M. *et al.* Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* **194**, 8–18 (2003).
38. Radbruch, A. *et al.* Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 741–50 (2006).
39. Bergmann, B. *et al.* Memory B cells in mouse models. *Scand. J. Immunol.* **78**, 149–56 (2013).
40. Ampomah, P., Stevenson, L., Ofori, M. F., Barfod, L. & Hviid, L. Kinetics of B cell responses to Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 in Ghanaian women naturally exposed to malaria parasites. *J. Immunol.* **192**, 5236–44 (2014).
41. Matz, J. M. & Kooij, T. W. a. Towards genome-wide experimental genetics in the in vivo malaria model parasite Plasmodium berghei. *Pathog. Glob. Health* **109**, 46–60 (2015).
42. Faucette, A. N., Unger, B. L., Gonik, B. & Chen, K. Maternal vaccination: moving the science forward. *Hum. Reprod. Update* **21**, 119–35 (2015).
43. Jain, A. *et al.* Tresyl-based conjugation of protein antigen to lipid nanoparticles increases antigen immunogenicity. *Int. J. Pharm.* **401**, 87–92 (2010).

44. Mohr, E. *et al.* Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature. *J. Immunol.* **182**, 2113–23 (2009).
45. Rodrigues-Duarte, L. *et al.* Distinct placental malaria pathology caused by different *Plasmodium berghei* lines that fail to induce cerebral malaria in the C57BL/6 mouse. *Malar. J.* **11**, 231 (2012).
46. Moraes, L. V. De & Martins, G. The anti-IRBP IgG1 and IgG2a response does not correlate with susceptibility to experimental autoimmune uveitis. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **39**, 773–783 (2006).
47. Oleszycka, E. & Lavelle, E. C. Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. *Curr. Opin. Immunol.* **28**, 1–5 (2014).
48. Ghimire, T. R. The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm. *Springerplus* **4**, 181 (2015).
49. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science (80-.).* **310**, 1510–1512 (2005).
50. Siegrist, C., Pihlgren, M., Tougne, C. & Efler, S. Co-administration of CpG oligonucleotides enhances the late affinity maturation process of human anti-hepatitis B vaccine response. *Vaccine* **23**, 615–622 (2004).
51. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 34–47 (2008).