WESLEY LUZETTI FOTORAN

**ANÁLISE DO PAPEL DE GENES *bir* NO PROCESSO ADAPTATIVO AO
HOSPEDEIRO E DESENVOLVIMENTO DE PROTEOLIPOSSOMOS PARA
POTENCIAL USO VACINAL COM FOCO EM REINVASÃO SANGUÍNEA DE
PLASMODIUM**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2017

WESLEY LUZETTI FOTORAN

**ANÁLISE DO PAPEL DE GENES *bir* NO PROCESSO ADAPTATIVO AO
HOSPEDEIRO E DESENVOLVIMENTO DE PROTEOLIPOSSOMOS PARA
POTENCIAL USO VACINAL COM FOCO EM REINVASÃO SANGUÍNEA DE
PLASMODIUM**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador:
Prof. Dr. Gerhard Wunderlich
Versão Original.

São Paulo

2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Luzetti Fotoran, Wesley

Análise do papel de genes bir no processo adaptativo ao hospedeiro e desenvolvimento de proteolipossomos para potencial uso vacinal com Foco em reinvasão sanguínea de Plasmodium / Wesley Luzetti Fotoran; orientador Gerhard Wunderlich. -- São Paulo, 2017.

160 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Genes variantes. 2. Exossomos. 3. Integração parasita-hospedeiro. 4. PfRH5 GPI. 5. Vacina. I. Wunderlich, Gerhard, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
**Programa de Pós-Graduação da Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro**

Candidato: Wesley Luzetti Fotoran

Tese: Análise do papel de genes *bir* no processo adaptativo ao hospedeiro e desenvolvimento de proteolipossomos para potencial uso vacinal com Foco em reinvasão sanguínea de *Plasmodium*

Orientador: Gerhard Wunderlich

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública, realizada a / / , considerou-o

() Aprovado

() Reprovado

Examinador

Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Presidente

Assinatura.....

Nome.....

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **015** nas fls. **03** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Gerhard Wunderlich**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Antígenos variantes na imunidade contra Plasmodium no modelo murinho: estimando a influência de proteínas variantes na citoaderência e seu potencial como vacina usando novos meios de administração*" do qual participam o(s) aluno(s), **Wesley Luzetti Fotoran**, **Rachele Santangelo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **19.03.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 20 de março de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Sou péssimo em agradecer as pessoas, acredito mais na hora de pedir desculpas....

Peço desculpas ao Gerd , por não te me aproximado do que ele precisava como aluno. Quando uma vez me disseram que um cara na parasito sabia de biologia molecular, não imaginei que encontraria o melhor fisiologista celular que encontrei em vida. Fui criado entre as paredes do ICB e visitei muitos laboratórios, em todos os departamentos, e em nenhum lugar vi alguém tratar genes e fisiologia celular/molecular como ele. Fico feliz por tudo que tivemos juntos e por você me ensinar que humildade existe em ciência, com a capacidade incrível de não ser egocêntrico num mundo onde todos valorizam a si mesmo. Agradeço intensamente por todos os prazos corridos e seu esforço com eles. Espero que você seja feliz com seus clips que encontra nas ruas e que seu melhor sucesso seja sua vida, não seu trabalho

Agradeço as oportunidades que me foram dadas nesse período , desde o acolhimento no Laboratório do Darrel Irvine e seus alunos Talar, Mariane , Greg que me acolheram bem. Foi uma grande experiência ter estado entre vocês.

A Alessandra, obrigado por tudo que sempre dividimos e compartilharemos, te amo muito. A Rachele, agradeço por ter sido sempre meu cérebro acessório e por ter me feito rir tantas vezes. A Fernanda agradeço por todo o companheirismo e pela ajuda em tudo, ainda contarei muito com você.

Peço desculpas pra minha família minha mãe Margareth e meu Pais Luiz, nunca mereci metade do esforço por eles empenhado em mim. Agradeço todas as lágrimas de meus pais e todas as iras causadas pelo meu bem. Sem vocês eu não seria nada. Nunca poderei retribuir vocês por serem um molde onde acredito existir acertos sem iguais em minha vida.

A meus irmãos eu gostaria de dizer que os amo, vocês me ensinaram a viver e odeio o fato de não estarmos todos juntos. Obrigado por ser o último filho e tomar socos e cuspes de todos vocês até ficar maior e mais forte pra que isso não acontecesse.

A todos os amigos que nunca me faltaram e que entre Faerum e a terra sempre estiveram e que mantiveram minha sanidade e que por muitas vezes cuidaram de mim. Obrigado, e desculpem se em algum momento os fiz mal ou se os coloquei em risco. Vocês foram pessoas incríveis por tanto tempo que nada pode me dizer o quão especiais vocês foram.

Agradeço aos amigos que criei na USP, tornaram minha vida universitária fantástica, desde quintas e brejas até funérias incríveis, passando por institutos de exatas, humanas e biológicas. Sem esquecer que algumas chaves de carros, caso perdidas, nunca mais serão encontradas a não ser por mim. A Biazinha obrigado por toda a parceria e amizade te gosto demais.

A meus parceiros de curso, desculpem meus erros e obrigado por tantas vezes termos dividido momentos ruins, (Icaro 2010) jamais será esquecido e obrigado pelo esforço na citometria. Amores vem e vão e tem seu espaço no tempo que existem, nunca esquecerei nenhum deles nem suas importâncias, desculpem por vocês me amarem e eu não servir a seus sorrisos, obrigado por me darem essa oportunidade.

A todos que todo dia tornam meu dia mais agradável, da cerveja no fim de tarde a marmita, G.elegans e verminhos, nada seria o mesmo sem vocês.

Agradeço a todos que um dia soriram a mim e peço desculpas a todos que um dia afetei.

Torço pela sorte de todos vocês, principalmente para todos os alunos que um dia tive, torço pelo seu melhor e prometo estar perto, sempre que possível.

Evitei nomes pois sempre cometeria injustiças, mas creio ter enquadrado todos que considero nesse contexto. Obrigado.

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

FOTORAN, W.L. **Análise do papel de genes *bir* no processo adaptativo ao hospedeiro e desenvolvimento de proteolipossomos para potencial uso vacinal com Foco em reinvasão sanguínea de *Plasmodium*.** 2017. 161 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A relação evolutiva entre mamíferos e *Plasmodium* compreende infecções com reflexos adaptativos de ambos os lados. A evasão imune pelo parasita e a aquisição imune do hospedeiro contra antígenos importantes são extremos de um longo processo. Genes e antígenos variantes do parasita funcionam nesse processo desempenhando papel evasivo, de citoaderência e manutenção do processo infeccioso. Hospedeiros podem adquirir imunidade efetiva por vacinas contra antígenos variantes e antígenos de caráter reinvasivo. Testamos aqui três desenhos experimentais visando: 1- Definir se antígenos variantes BIR estão associados a citoadesão em infecção murina e se sua localização é em eritrócitos infectados. 2- O papel de um transgene controlado por um promotor de genes variantes no processo adaptativo infeccioso, frente a hospedeiros que diferem em apenas um único gene. 3- Criação de um modelo vacinal aplicável a qualquer antígeno relevante em infecções pelo gênero *Plasmodium*. Como resultados obtivemos que: 1- Antígenos BIR não parecem estar relacionados na cito adesão em modelo murino. Identificamos um outro grupo de antígenos com domínio LCCL que talvez desempenhe um papel de ligante. 2- promotores *bir* podem sofrer modulação em uma única infecção que difiere em somente um gene em hospedeiros. Os efeitos desencadeados foram maior parasitemia, anergia e tolerância imune sem afetar a morbidade da infecção de maneira nociva ao hospedeiro. Esse efeito parece ser mediado por subpopulações parasitárias usando exossomos entre parasita e hospedeiro. 3- Produzimos um sistema funcional de produção de proteínas recombinantes fusionadas a GPI que permite integração em lipossomos para usos vacinais. A prova de princípio foi o uso de antígenos PfRH5-GPI recombinantes em teste vacinal que conseguiram gerar anticorpos com alta atividade inibitória em cultivos de *P. falciparum*. Tomados em conjunto mostramos que o hospedeiro é capaz influenciar a expressão de transgenes controlados por promotores *bir* e que proteolipossomos contendo antígenos relevantes, como PfRH5, possuem potencial protetor quando vacinados contra malária.

Palavras-chave: Genes variantes. Exossomos. Integração parasita-hospedeiro. PfRH5 GPI. Vacina.

ABSTRACT

FOTORAN,W.L. **Analysis of the role of genes *bir* in the host-pathogen relation and development of proteoliposomes for the use in vaccines against blood stage forms of *Plasmodium*.** 2017 161 p. Ph.D. Thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The relation between mammals and *Plasmodium* comprise infections with adaptive reflections for both sides. The immune evasion by parasites and immune acquisition by the host against important antigens are end points of a long process. Variant genes and proteins of the parasite can exert a role in this process by enabling immune evasion and cytoadherence resulting in the maintenance of the infective process. We tested three experimental approaches focusing on the following points: 1- Show if variant *BIR* antigens are associated with cytoadherence during murine infections 2- The role of a transgene under the control of a variant gene promoter in adaptation to infection in hosts which express or not the transgene 3- Creation of a vaccine model applicable to any relevant antigen in infections with *Plasmodium*. As results we showed that: 1- *BIR* antigens are likely not related to cytoadhesion in the murine model. Cytoadherence in this model is probably related to exported parasite proteins with LCCL domains 2- *bir* promoters can be modulated during infection in hosts which differ in one unique gene. The effects observed in this case was an increase in parasitemia, anergy and immune tolerance without affecting the morbidity of infection in the host. These effects are apparently mediated by parasite subpopulations producing exosomes that signal from the parasite to the host. 3- We generated a system for recombinant protein production where antigens are fused to GPI and then integrated onto liposomes for vaccine usage. The proof of principle was the use of recombinant PfRH5-GPI as vaccine which elicited antibodies with strong blocking activity in *P. falciparum* cultures. Together we have shown that the host environment is capable of modulating the activity of variant *bir* gene promoters and that proteoliposomes loaded with relevant malarial antigens such as PfRH5, are potentially protective when used as malaria vaccine.

Keywords: Variant genes. Exosomes. Host-parasite integration. PfRH5 GPI. Vaccine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa de morte e infecção por <i>Plasmodium</i>	21
Figura 2 - Mapa de coexistência das espécies de Plasmódios mais impactantes....	22
Figura 3 - Gráfico que mostra a geografia dos casos clínicos de malária no mundo em 2007	22
Figura 4 - Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	23
Figura 5 - Alterações epigenéticas em processos adaptativos de <i>Plasmodium</i>	26
Figura 6 - Características da citoaderência de <i>P. falciparum</i>	28
Figura 7 - Origem e componentes de exossomos	31
Figura 8 - Versatilidade de usos para formulações lipossômicas.	36
Figura 9 - Primeiro desenho experimental para validação de genes <i>bir</i> em eritrócitos infectados.....	41
Figura 10 - Segundo desenho experimental para investigação de genes <i>bir</i> em infecções com possível modulação desses genes na relação parasita-hospedeiro..	42
Figura 11 - Terceiro modelo para produção de um sistema para obtenção de antígenos recombinantes fusionados a ancoras GPI para utilização em lipossomas para usos vacinais.....	43
Figura 12 - Encapsulamento de GFP em eritrócitos infectados.....	55
Figura 13 - Encapsulamento de GFP em eritrócitos infectados por microscopia de fluorescência.	55
Figura 14 - Reconhecimento de eritrócito infectado por soros de animais controles.	56
Figura 15 - Reconhecimento de eritrócito infectado por soros de animais controles hiperimunes.....	57
Figura 16 - Esquema de marcação para células para citometria de células CD4 ⁺ ...	61
Figura 17 - Ghost infectado purificado e resposta humoral contra GFP.	64
Figura 18 - Reconhecimento de antígenos de membrana em eritrócitos infectados por antisoros gerados a partir de ghosts de hemácias infectadas.....	67
Figura 19 - Reconhecimento de antígenos de membrana de eritrócitos infectados e em extratos celulares de trofozoítos e esquizontes.....	68
Figura 20 - Controle parasitário de animais tratados com eritrócitos infectados reconstituídos e infectados com <i>P. berghei</i> NK65.....	70

Figura 21 - Sobrevida de animais tratados com membrana infectada reconstituída e infectados com <i>P. berghei</i> NK65.....	70
Figura 22 - Dessequestramento de hemácias infectadas com esquizontes em animais imunizados com <i>ghosts</i> de hemácias infectadas (<i>P. berghei</i> NK65)	72
Figura 23 - Imunoprecipitação de antígenos diferencialmente reconhecidos por soro de animais imunizados com membranas reconstituídas.	74
Figura 24 - Análise das seqüência de genes <i>bir</i> após exclusão manual de genes sem identidade com a família PIR ou pseudogenes	77
Figura 26 - Análise final de genes <i>bir</i> em famílias de origem evolutiva.	79
Figura 27 - Clonagem para introdução de uma região 5' UTR <i>bir</i> controlando o gene da GFP em cromossomo artificial de <i>P. berghei</i>	81
Figura 29 - Expressão de gene p <i>Bir</i> :GFP em cromossomo artificial logo após seleção em <i>P. berghei</i>	84
Figura 30 - Curvas de parasitemia e letalidade desenvolvida por animais C57BL/6 e animais C57BL/6 GFP ⁺ desenvolvidas por animais infectados com <i>P. berghei</i> ANKA C-PAC 5'UTR p <i>Bir</i> :GFP	86
Figura 31 - Hematócrito e perda de peso no curso da infecção.	88
Figura 32 - Expressão de GFP diferencial por parasitas <i>P. berghei</i> ANKA/C-PAC 5'UTRp <i>Bir</i> :GFP por fluorescência frente a infecção de diferentes fundos genéticos de hospedeiros C57BL/6 e C57BL/6 GFP ⁺	90
Figura 33 - Expressão de GFP diferencial por parasitas <i>P.berghei</i> ANKA/C-PAC 5'UTRp <i>Bir</i> :GFP por Western Blot durante infecção de diferentes fundos genéticos de hospedeiros C57BL/6 e C57BL/6 GFP ⁺	91
Figura 34 - Expressão de GFP diferencial por parasitas <i>P. berghei</i> ANKA/C-PAC 5'UTRp <i>Bir</i> :GFP por Western Blot após infecção de hospedeiros C57BL/6 e C57BL/6 GFP ⁺	93
Figura 35 - Segregação dos de cromossomo artificial nas linhagens geradas.....	95
Figura 36 - Imunoprecipitação de cromatina de parasitas para monitorar modificações de H3K9 na região5' UTR p <i>BIR</i>	96
Figura 37 - Subclonagem de 5'UTR <i>bir</i> para transfecção e teste em <i>P. falciparum</i> .	98
Figura 38 - Expressão transiente da região 5'UTR <i>bir</i> em <i>P. falciparum</i> e silenciamento após seleção estável	99
Figura 39 - Aumento de baço diferencial de animais C57BL/6 e C57BL/6 GFP ⁺ infectados por <i>P. berghei</i> ANKA/C-PAC 5'UTRp <i>Bir</i> :GFP	100

Figura 40 - Medição de marcadores de ativação nas células T CD4 ⁺ CD49 e CD51	101
Figura 41 – Medição de marcadores de anergia e migração em células TCD4 ⁺ PD-1, CD62L e LAG-3.....	102
Figura 42 - Medição de células regulatórias geradas pela infecção com <i>P. berghei</i> ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP.....	103
Figura 43 - Padrão de estímulo pró-inflamatório por exossomos com efeito anti-inflamatório em fundo genético específico	108
Figura 44 - Padrão de estímulo pró-inflamatório por exossomos com efeito anti-inflamatório em fundo genético específico	109
Figura 45 - Western Blot de exossomos de NF54 Rif:GFP e de <i>P. berghei</i> ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP com α-GFP para testar o conteúdo ou ausência de GFP em seu interior.....	111
Figura 46 - Comparação de respostas adaptativas do hospedeiro pós-imune, tolerante e neutro a presença de antígeno citoplasmático.	113
Figura 47 - Resposta humoral após 15 dias de infecções contra GFP constitutivamente expresso.	114
Figura 48 - Fluorescência de células GFP GPI recombinantes (GFPGPIr).....	117
Figura 49 - Fluorescência de células CHO recombinantes controle.....	118
Figura 50 - Imunofluorescência de células PfRH5 GPI recombinantes (PfRH5GPIr).	118
Figura 51 - Retenção de antígenos hidrofílicos por coincubação em vesículas lipossômicas.....	120
Figura 52 - Retenção de antígenos hidrofílicos por coincubação em vesículas lipossômicas.....	121
Figura 53 - Retenção de antígenos hidrofílicos por coincubação em vesículas lipossômicas.....	122
Figura 54 - Western blot contra strep tag revelando ProtA GPIr e PfRH5 GPIr.....	123
Figura 55 - Incorporação de PfRH5 GPIr em formulações vacinais e afinidade de ProtA GPIr por vesículas lipídicas	124
Figura 56 - Reconhecimento de proteína nativa de <i>Plasmodium falciparum</i> e títulos gerados pelas imunizações.	126
Figura 57 - Efetividade de anticorpos α-PfRH5 GPIr contra <i>P. falciparum in vitro</i> ..	127

ISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Antígenos diferencialmente reconhecidos por imunoprecipitação em espectrometria de massas.	75
---	----

ABREVIATURAS E SIGLAS

BIR	Berghei interspersed repeats
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD62L	Cluster of Differentiation 62 Ligant
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
CHO	Células de Chinese Hamster Ovary
C-PAC	Centromere <i>Plasmodium</i> Artifical Chromosome
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorted
FCS	Soro fetal bovino (<i>fetal calf serum</i>)
FOXP3	Forkhead box P3
g	Aceleração da gravidade (9,81 m/s ²)
gDNA	DNA genômico
GFP	Green Fluorescence Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
Ig	Imunoglobulina
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LCCL	Limulus clotting factor C
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Pares de Base
PBS	Phosphate-Buffered saline
PCR	Reação em cadeia de polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
PfRH5	<i>Plasmodium falciparum</i> rhoptry protein homolog 5
PIR	<i>Plasmodium</i> interspersed repeats
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (meio de cultivo)
RT-PCR	Transcrição reversa seguida por reação em cadeia de
TAE	Tampão Tris-acetato

TBE	Tampão Tris-borato
TM	Transmembrana
Treg	Regulatory T cell
UTR	<i>UnTranslation Region</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Aspectos Gerais	20
1.2 Distribuição Atual da Malária no Mundo	21
1.3 Ciclo de vida dos parasitas.....	22
1.4 Famílias multigênicas, sua regulação e seus reflexos metabólico-imunológicos na adaptação parasitária	25
1.5 Comunicação intercelular no gênero <i>Plasmodium</i> por meio de vesículas	31
1.6 Novas tecnologias de controle contra malária	35
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	38
2.1 Integração de possíveis papéis de genes variantes em modelos murinos com modelos vacinais nanotecnológicos	39
2.2 Desenho Experimental para resolução dos modelos propostos.....	41
2.3 Objetivo	44
2.3.1 <i>Objetivos específicos</i>	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Considerações éticas	46
3.2 Parasitas murinos e doses infectivas usadas.....	46
3.3 Cultivo de <i>P. falciparum</i>	46
3.4 Transfecção em <i>P. falciparum</i>	47
3.5 Manipulação de DNA e clonagens	47
3.6 Transfecção de células eucariotas e <i>P. berghei</i>	48
3.7 Purificação de proteínas GPI-ancoradas de células eucariotas	49
3.8 Produção e carregamento de lipossomos com proteínas fusionadas à GPI	49
3.9 Quantificação de proteínas incorporadas em proteolipossomos e relação de luminosidade por partícula	50
3.10 Análise da expressão de GFP em parasitas transgênicos por citometria	50
3.11 Extração de gDNA de <i>P. berghei</i>	51
3.12 Imunoprecipitação de cromatina (ChIP) e geração de primers para estudos por PCR quantitativo	51
3.13 Determinação de número de cópias de transgenes por PCR quantitativo	52
3.14 Western Blot, Imunoblot e coloração por prata	53
3.15 Membranas infectadas para imunização de <i>P. Berghei</i>	53
3.16 Citometria de fluxo para hemácias reconstituídas e ligação de anticorpos anti-hemácias parasitadas	54
3.17 Imunofluorescência	57
3.18 ELISA	58
3.19 Sequenciamento	58
3.20 Purificação de membrana do eritrócito infectado por <i>P. berghei</i> , imunoprecipitação de antígenos e espectrometria de massas	59
3.21 Citometria de células imunes em animais C57Bl/6 e C57Bl/6-GFP infectados com <i>P.berghei</i> pBir:GFP	60
3.22 Ensaio de inibição de reinvasão.....	61
3.23 Obtenção de exossomos de <i>P. berghei</i> e <i>P. falciparum</i>	62
4 RESULTADOS.....	63
4.1 Resultados do primeiro desenho experimental	64
4.1.1 <i>Membranas de eritrócitos infectados com P. berghei e reconstituídas com GFP possuem antígenos de membrana e geram resposta humoral específica contra antígenos parasitários de membrana</i>	64

4.1.2 Eritrócitos infectados são reconhecidos por anticorpos de animais imunizados com ghosts reconstituídos.....	66
4.1.3 Animais imunizados reconhecem membranas infectadas com um padrão de proteínas diferente do presente em trofozoítos e esquizontes intracelulares.....	68
4.1.4 Animais imunizados com membranas infectadas controlam parcialmente a parasitemia com parcial efeito na sobrevivência dos imunizados.....	69
4.1.7 Antígenos reconhecidos por imunização com ghosts infectados e imunoprecipitados não apresentam correlação com antígenos relacionados a famílias multigênicas <i>bir</i>	73
4.2 Aproximação para elucidar o papel de genes <i>bir</i> na interação entre parasita e hospedeiro.....	76
4.2.1 Evolução de genes <i>bir</i> em <i>Plasmodium berghei</i> demonstram 4 pequenos grupos conservados e um enorme grupo com extensa variação em sequências	76
4.2.2 Clonagem e Amplificação de região 5' UTR de <i>P. berghei</i> e inserção em cromossomo artificial gerando o gene <i>pbir:GFP</i>	80
4.2.3 Região 5' UTR do gene <i>pbanka_030020</i> de <i>P. berghei</i> apresenta atividade em <i>P. berghei</i> ANKA evidenciado pelo gene repórter GFP.....	81
4.2.4 A seleção de parasitas por pirimetamina com C-PAC <i>pBir:GFP</i> gera parasitas sem o fenótipo de malária cerebral em <i>P. berghei</i> ANKA infectando animais C57BL/6 com expressão de GFP.....	83
4.2.5 Parasitas <i>P. berghei</i> ANKA/C-PAC <i>pbir:GFP</i> apresentam maior parasitemia em animais que expressam GFP sem modificar a mortalidade da infecção causada.....	85
4.2.6 O crescimento diferencial observado em animais C57BL/6-GFP não é acompanhado de agravamento em sinais fisiopatológicos como anemia ou perda de peso	87
4.2.7 Parasitas <i>P. berghei</i> ANKA/C-PAC 5'UTR <i>pbir:GFP</i> apresentam expressão diferencial de GFP em função do fundo genético do hospedeiro	88
4.2.8 Parasitas <i>P. berghei</i> ANKA/C-PAC 5'UTR <i>pBir:GFP</i> apresentam subpopulações distintas durante a infecção em animais C57BL/6 e animais C57BL/6 GFP ⁺	92
4.2.9 A segregação de cromossomos artificiais 5'UTR <i>pBir:GFP</i> não sofreu alteração nas populações estudadas.....	94
4.2.10 A expressão aumentada em parasitas <i>P. berghei</i> ANKA/C-PAC 5'UTR <i>pBir:GFP</i> tende a se correlacionar modificações locais de cromatina.....	95
4.2.11 A região 5' UTR <i>pbir</i> permite transcrição transiente em <i>P. falciparum</i> e posteriormente é silenciado.....	97
4.2.12 A resposta desenvolvida em hospedeiro pela manutenção de subpopulações expressando GFP gera extensos marcadores de exaustão imune e aumento na produção de células T regulatórias	100
4.2.13 Parasitas <i>P. berghei</i> ANKA/C-PAC 5'UTR <i>pBir:GFP</i> usam exossomos para influenciar respostas imunes no hospedeiro	105
4.2.14 Parasitas <i>P. berghei</i> ANKA/C-PAC 5'UTR <i>pBir:GFP</i> possuem GFP em exossomos por ação de promotores <i>bir</i> assim como <i>P. falciparum</i> transgênico com promotores <i>rif</i> controlando expressão de GFP também possuem GFP em exossomos	110
4.2.15 A imunidade prévia a proteína endógenas sem sistema de secreção ou exposição em eritrócitos infectados em nada afeta o curso infectivo levando a supressão imune da respostas prévia após 15 dias.....	112
4.2.16 Pontos evidenciados pelo segundo desenho experimental.....	115
4.3 Resultados do terceiro modelo experimental	116

4.3.1 Geração de um sistema de produção de antígenos recombinantes para purificação e obtenção de antígenos específicos fusionados a GPI para uso em modelos baseados em lipossomos	116
4.3.2 Antígenos com domínio GPI apresentam maior afinidade por partículas lipossômicas.....	119
4.3.3 Diferentes proteínas recombinantes são possíveis de serem obtidas e purificadas em fusão com GPI	123
4.3.4 Distintas proteínas recombinantes fusionadas a GPI podem ser associadas a lipossomos para uso em vacina	124
4.3.5 Anticorpos gerados contra PfRH5GPI recombinante associado a lipossomos tem a capacidade de reconhecer as proteínas nativas de NF54 e demonstram alto títulos de anticorpos após imunizações.....	124
4.3.6 A resposta humoral criada a partir de proteolipossomos carregados com proteínas PfRH5GPI recombinantes produz anticorpos anti-reinvasão com efeito dose resposta.....	126
4.3.7 Resumo dos resultados no terceiro desenho experimental.....	127
5 DISCUSSÃO	129
6 CONCLUSÕES	139
REFERÊNCIAS.....	141
ANEXO 1.....	155
Lista se genes usados.....	156
APÊNDICES	158
Artigos Publicados no período.....	159

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

A malária, doença infecciosa causada por protozoários intracelulares pertencentes ao filo Apicomplexa, da ordem Coccidiida, subordem Haemosporidiidea, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium* ainda apresenta-se como um grande problema político-social e de saúde pública em quase todos os países pobres e em desenvolvimento em regiões tropicais. Em termos globais, a malária continua sendo a parasitose mais letal, sendo que a parte da população mais acometida consiste em crianças de menos que cinco anos e mulheres grávidas na África no subcontinente subsaariano.(LONGLEY et al., 2015)

Dentre as espécies conhecidas sabe-se que membros do gênero *Plasmodium* infectam peixes, reptéis, aves e mamíferos o que incluiu primatas superiores. Existem cinco espécies que infectam humanos, sendo elas: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. As mais importantes e frequentes infecções são causadas por *P. falciparum* e *P. vivax* sendo esses dois parasitas bem diferentes em termos de origem e proximidade evolutiva.

P. falciparum, é uma espécie encontrada na Américas, África e Ásia, tem sua origem evolutiva em espaço africano e atinge grandes regiões do globo, apresentando os mais altos índices de mortalidade relativos a doença.

P. vivax, é encontrada principalmente na Ásia, América Latina e algumas partes da África. Essa espécie em geral causa infecção mais branda apesar deste ponto ter sido discutido recentemente (RAHIMI et al., 2014) e possui formas dormentes em hepatócitos denominadas hipnozoíto. Essas formas causam quadros de recaída da doença que podem ficar alojadas em células hepáticas por meses ou anos, reiniciando ciclos sanguíneos com impacto importante na dispersão desse parasita no globo, mesmo em áreas com invernos mais rigorosos.

De atual destaque nesse contexto é *P. knowlesi*, originalmente um patógeno natural de macacos (*Pongo spec.*), atualmente surge como uma nova espécie a infectar humanos com números crescentes de infecção.

A transmissão de malária é iniciada em seres humanos por mosquitos (fêmeas) infectados do gênero *Anopheles* (DRUGS et al., 2004). Esse gênero inclui aproximadamente 400 espécies, onde 60 são capazes de transmitir o parasita.

O vetor *An. darlingi* é a espécie predominante no Brasil em contrapartida de *An. gambiae* na África. A capacidade do parasita de adaptação a múltiplas espécies de anofelinos é fator importante pois eles diferem em características importantes como antropofilia e competência vetorial.

1.2 Distribuição Atual da Malária no Mundo

Segundo o “*World Malaria Report 2016*”, da OMS, foram reportados no ano de 2015, 212 milhões de casos de malária, sendo 114 milhões deles na África (“WHO | World Malaria Report 2016,” 2016). O número global de mortes atribuídas à doença foi de 429.000, um valor potencialmente subestimado. No mundo, a letalidade se restringe fortemente a *P. falciparum* com aproximadamente 99% dos casos que levam a óbito sendo causados por esse parasita. No continente africano, a doença é responsável por 35% de todos os casos de mortes infantís, sendo que a cada 45 segundos morre uma criança de malária na África. Globalmente desde 2001 até 2016, 6.8 milhões de mortes ocorreram por malária sendo 94% em território sub-saariano. A melhora na expectativa de vida dos afetados por programas que visem o controle da doença somam economicamente melhorias em valores de 2040 bilhões de dolares (entre 2000 à 2015), com cerca de 1810 bilhões somente em regiões subafricanas compreendendo 44% do produto interno bruto dos países afetados (“WHO | World Malaria Report 2016,” 2016).

Nas Américas, a malária ocorre em 21 países, com 20% da população total vivendo em áreas de risco. Quase 90% dos casos de malária nas Américas ocorre nos 9 países amazônicos (OMS, Organização Mundial de Saúde 2010).

Figura 1 - Mapa de morte e infecção por *Plasmodium*

Distribuição de casos e mortes de malária pelo globo por milhões de habitantes.

Fonte: (“WHO | World Malaria Report 2016,” 2016)

Figura 2 - Mapa de coexistência das espécies de Plasmódios mais impactantes

Prevalência de casos por *P.falciparum* e *P.vivax* no globo.
Fonte: ("WHO | World Malaria Report 2016," 2016)

Figura 3 - Gráfico que mostra a geografia dos casos clínicos de malária no mundo em 2007

Gráfico pizza mostra as regiões da OMS com maior quantidade de casos clínicos de malária causados por *P. falciparum* (ordem decrescente). SEARO=South-East Asia Regional Office. O mapa mostra a composição dos 87 países endêmicos para *P. falciparum*.
Fonte: (Hay et al., 2010)

1.3 Ciclo de vida dos parasitas

O ciclo de vida desse parasita é complexo, com reprodução assexuada (esquizogônica) no homem e sexuada e assexuada no inseto vetor.

Após a picada do mosquito fêmea infectado, do gênero *Anopheles*, os esporozoítos móveis são inoculados na derme e atingem ativamente por um movimento chamado *gliding* (revisado em (HEINTZELMAN, 2015)) a corrente sanguínea do indivíduo. Estes esporozoítos são levados rapidamente para o fígado e lá invadem os hepatócitos, iniciando a fase hepática do ciclo do parasita. Após uma série de etapas de divisões assexuadas (esquizogônica) e diferenciação, os esquizontes hepáticos liberam os merozoítas na corrente sanguínea. A duração

desta fase é espécie dependente; seis dias no caso de *P. falciparum* e oito dias no caso de *P. vivax*.

Os merozoítas liberados saem recobertos em bolsas feitas por células hepáticas que na corrente sanguínea espalham-se, iniciando o ciclo intra-eritrocítico (STURM et al., 2006).

Ao invadir células vermelhas parasitas se alojam dentro de uma membrana modificada, oriunda da hemácia denominada vacúolo parasitoforo. Dentro dessa estrutura se desenvolvem em formas parasitárias classificadas como anel, trofozoito, esquizonte que após lise libera merozoitos na corrente sanguínea.

Figura 4 - Ciclo de vida de *Plasmodium*

Ciclo ilustrado da infecção por *Plasmodium* sp.
Fonte: Wikipédia.

Estes merozoítas invadem novos eritrócitos propagando o ciclo do parasita, que dura em média 48h e causa os sintomas característicos da doença. *P. knowlesi* e espécies murinas possuem um ciclo de apenas 24h enquanto *P. malariae* possui um ciclo de 72h.

Provavelmente por estimulação de fatores decorrentes da infecção no hospedeiro e uma mudança transcricional no lado do parasita mediado pelo fator de

transcrição PfAP-G2 (KAFSACK et al., 2014), novas formas parasitárias podem se desenvolver para gametocitos que quando ingeridos por mosquito susceptível darão início ao ciclo sexuado do parasita.

Nesse ciclo são formados gametas (8 microgametas flagelados ou um macrogameta) que dão origem ao ciclo esporogônico. Ao final desse ciclo esporozoítos que tenham migrado para glândulas salivares estão aptos a iniciar novo ciclo infectivo em novo repastos sanguíneo. Mais detalhes do ciclo podem ser obtidos no *review* excelente de Cowman e Crabb (COWMAN; CRABB, 2006)

Cabe ressaltar que o entendimento detalhado de cada etapa do ciclo permite a chance de uma intervenção que possa impedir que os ciclos parasitários se propaguem, assim gerando oportunidades para o controle da doença.

Na fase sanguínea é onde a mais intensa resposta imune ocorre, sendo por isso a fase onde os sintomas característicos da doença são gerados com ciclos febris que variam de 48-72h. Por tratar-se de uma fase reprodutível em laboratório (tanto em sangue humano como em modelos animais) é da fase sanguínea que se tem maior inferência em estudos que elucidem processos adaptativos ligados ao gênero *Plasmodium sp.*

Sabe-se que imunologicamente os anticorpos são as principais moléculas envolvidas na aquisição de imunidade contra antígenos sanguíneos da malária (CHAN et al., 2014), assim como linfócitos do tipo CD4 efetores e de memória (PEREZ-MAZLIAH; LANGHORNE, 2014). Vacinas contra a fase sanguínea visam a geração de anticorpos e linfócitos nos hospedeiros, na tentativa de interromper o ciclo sanguíneo. Antígenos associados a invasão de hemácias neste ponto são os mais promissores alvos (MIURA, 2016).

Uma vez que esteja livre na corrente sanguínea, parasitas do gênero *Plasmodium sp.*, em especial *P. falciparum* (o mais bem estudado do gênero), levam poucos segundos para iniciar o processo de infecção. O processo inicia-se geralmente com a associação de proteínas de superfície determinadas MSP, a mais bem estudada delas é denominada MSP1 (merozoite surface protein 1). Essa proteína interage com um transportador largamente encontrado na superfície de eritrócitos denominado Banda 3 (WINOGRAD et al., 2004). Ao conectar-se ao eritrócito a ser invadido, o parasita reorienta sua estrutura celular (através de rearranjos ativos de seu próprio citoesqueleto) permitindo o encontro de estruturas

secretadas pelas rôptrias e micronemas (organelas celulares exclusivas do filo) com proteínas no eritrócito (revisado em (COWMAN; CRABB, 2006).

Aparentemente, nesse ponto a proteína da rôptria denominada PfRH5 é exposta e liga-se a seu receptor em eritrócitos, denominado basigina (BUSTAMANTE et al., 2013). Esse processo é vital para o processo de invasão e é assessorado por um complexo de duas outras proteínas também presentes no micronema conhecidas como CYRPA e RIPR (REDDY et al., 2015). Outra interação importante é a ligação entre RON2 (que é inserido na membrana da hemácia) e AMA1 (BARGIERI et al., 2013). O processo continua com movimentos do citoesqueleto parasitário, nos quais o antígeno CLAMP parece ter um papel decisivo (SIDIK et al., 2016), permitindo a inserção do parasita no eritrócito sob formação de vacúolo parasitóforo. Concomitantemente ou antes disso, a proteína MSP1 é processada liberando fragmentos dela mesma na corrente sanguínea e deixando apenas uma porção C-terminal denominada MSP1₁₉ (COWMAN; CRABB, 2006) na superfície do merozoíto. Uma vez instalado no interior do eritrócito o parasita desenvolve um sistema tubular no citosol da hemácia infectada. Essas vesículas, denominadas *Maurer's clefts*, permitem o estabelecimento de seu metabolismo celular até que conclua seu ciclo esquizogônico. Neste passo, que parece ser compartilhado em todos os Plasmódios estudados, incluindo espécies murinas, muitas proteínas são translocadas para o citossol da hemácia infectada ou mesmo para a membrana da hemácia infectada. O sinal específico que leva a secreção de proteínas do parasita através da membrana citoplasmática dele e do vacúolo parasitóforo é chamado PEXEL/VTs (HILLER et al., 2004; MARTI et al., 2004). Entretanto, existem antígenos que não possuem PEXEL mas que também são exportados para a hemácia infectada (HEIBER et al., 2013).

1.4 Famílias multigênicas, sua regulação e seus reflexos metabólico-imunológicos na adaptação parasitária

Frente a diferentes ambientes celulares os parasitas do gênero *Plasmodium* sp. devem ser capaz de lidar com mudanças bruscas para a manutenção do ciclo. Para efetivamente alterar suas características, a mudança nos padrões de expressão gênica devem ser efetuadas a todo momento em resposta ao ambiente que cerca cada estágio parasitário. A transcrição de genes do parasita é controlada por suas região promotoras, e muitas vezes modificações na cromatina local

permitem um controle epigenético de vários genes incluindo as famílias multigênicas, presentes em quase todo o gênero *Plasmodium* sp. (AY et al., 2015). Desse modo, uma adaptação relativamente rápida mostra-se possível, permitindo ao parasita se adequar a vários ambientes e tipos celulares completando o ciclo. A maior vantagem de adaptações epigenéticas é que não se envolvem mecanismos lentos como replicação, meiose e mutação para se adaptar. O entendimento da regulação epigenética assim se mostra um ponto interessante para explicar processos fisiológicos da doença e possível intervenção (MERRICK; DURASINGH, 2010). Adaptações ainda mais rápidas existem agindo de maneira pós-transcricional levando a reprogramações quase instantâneas, importantes no desenvolvimento sexual em hospedeiro invertebrado na hora da transmissão (TARIQUE et al., 2013).

Figura 5 - Alterações epigenéticas em processos adaptativos de *Plasmodium*

Modulação de genes por ação epigenética em *Plasmodium*.

Fonte: Modificado de Duraisingh et al., 2010)

No gênero *Plasmodium* existem diversas famílias multigênicas e em *P. falciparum* as famílias que codificam antígenos potencialmente expostos são as famílias *var* (de *variant*) de aproximadamente 60 membros (SU et al., 1995), *rif* (repetitive interspersed family, 180 membros) e *stevor* de aproximadamente 30 membros (CHENG et al., 1998). Ainda existem as famílias Pfmc-2TM (SAM-YELLOWE et al., 2004) com 11 membros. Os genes *var* e seus ortólogos se encontram especificamente em espécies de *Plasmodium* que infectam primatas e

codificam para adhesinas denominadas PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (LEECH et al., 1984)) que medeiam a interação de hemácias infectadas com receptores endoteliais do hospedeiro. Uma vez instaladas, essas proteínas funcionam como ligantes em proteínas do hospedeiro permitindo desde evasão imunológica (por não deixar a hemácia infectada passar pelo baço) às síndromes severas, responsáveis por grande parte da letalidade associada a *P. falciparum*. Essas síndromes podem ocorrer em condições transitórias do hospedeiro (como malária gestacional) ou impedir eliminação do parasita na corrente sanguínea, levando a quadros crônicos de infecção (por sequestro de formas tardias do desenvolvimento eritrocítico)(MILLER et al., 2002; KRAEMER; SMITH, 2006).

Esse fenômeno é largamente conhecido como citoadesão sendo considerado um dos fatores mais relevantes para a virulência e manifestações crônicas. Um resumo dos ligantes e dos quadros e efeitos da doença, associados a essas proteínas podem ser visto abaixo.

Figura 4 - Características da citoaderência de *P. falciparum*

Variação antigênica de PfEMP1. Diversos fenótipos aderentes associam com as diferentes seqüelas da malária grave. Mudança sucessiva de fenótipos (letras A a F na figura abaixo) leva a constante evasão da resposta imune sem perda da capacidade de citoaderência da hemácias infectadas.

Fonte: Miller et al. 2002.

Diversos estudos apontam que a resposta imune contra esses alvos são marcadores de proteção do hospedeiro humano diminuindo a malignidade da doença e diminuindo sua letalidade (TRAVASSOS et al.2013). Genes dessa família normalmente não são expressos mais que dois (JOERGENSEN et al., 2010) por parasita e isso acontece por um forte controle epigenético na região promotora desses genes (VOSS et al., 2006). O motivo é a seleção clonal pelo sistema imune do hospedeiro, que seleciona clones que apresentem PfEMP1s distintas das já reconhecidas pelo hospedeiro (sendo assim, não passível o reconhecimento imune por anticorpos). Isso gera um mecanismo de variação antigênica que permite a persistência de longas infecções (KLEIN et al., 2014). Interessante mencionar é que a regulação da expressão de genes *var* é controlada por fatores que também regulam o comprometimento do parasita para transformação em gametócitos. O

knockdown do fator HP1 (*heterochromatin protein 1*) leva a expressão de vários genes *var* e também a de-repressão da transcrição do fator ApiAP2-G, cuja expressão leva a formação de gametócitos (PAINTER et al., 2011). Menos informações estão disponíveis sobre o papel funcional e o modo de transcrição de outras famílias multigênicas como *rif* cujos parálogos ocorrem em todas as espécies de *Plasmodium*. Assim sendo foram chamados PIR (*Plasmodium interspersed repeats*), a mais conservada entre todas as famílias multigênicas do gênero *Plasmodium sp.* (JANSSEN et al., 2004). Os genes PIR de *Plasmodium vivax* como genes do tipo *vir*, *Plasmodium knowlesi* como genes do tipo *kir*, *Plasmodium berghei* como genes do tipo *bir*, *Plasmodium yoelii* como genes do tipo *yir* e *Plasmodium chabaudi* como genes do tipo *cir*. Pouco se sabe sobre a função dos genes *pir* fora da sua localização genômica (CRAIG et al., 2012) em posição muitas vezes subtelomérica, lá sujeito a recombinação ectópica como também os genes *var* (FREITAS-JUNIOR et al., 2000). As famílias *pir* variam em quantidade numérica de alelos, nunca sendo menor do 100 alelos por genoma e com poucas funções conhecidas. Por ser de mais fácil cultivo, parasitas da espécie *P. falciparum* são largamente usados como modelo de estudo para esses fatores.

Com a percepção de que as proteínas codificadas por *var* – PfEMP1 – sejam ligantes de receptores endoteliais do hospedeiro, a mesma função de antígenos PIR foi proposta. De fato, RIFINs específicos parecem funcionar como ligantes, como o alelo que media *rosetting* em certos grupos sanguíneos na ausência de ou em conjunto com PfEMP1 (GOEL et al., 2015). Coincidentemente, RIFINs são antígenos reconhecidos por soros de pacientes de área endêmica (ABDEL-LATIF et al., 2002). Entretanto, muitos alelos RIFIN não são exportados até a superfície do eritrócito infectado (JOANNIN et al., 2008) colocando em dúvida um papel como ligante. A regulação de genes *rif* parece ocorrer de forma semelhante dos genes *var* (HOWITT et al., 2009) , entretanto *switching* transcripcional de um alelo para um outro pode ser muito mais rápido (CABRAL; WUNDERLICH, 2009) que de genes *var*. Aparentemente, as mesmas modificações de cromatina regem a ativação e o silenciamento de *rif* (CABRAL et al., 2012).

A exemplo de genes *var*, genes do tipo *yir* já foram relatados como sendo modulados pela resposta imune do hospedeiro (FONAGER et al., 2007). Diferente dos genes *var*, mas não muito de seus ortólogos *rif*, *pir* genes presentes em espécies que infectem murinos (*bir/cir/yir*) são expressos mais de um por vez e

parecem desempenhar papel adaptativo tanto no hospedeiro quanto no vetor(COAKLEY et al., 2015).

Quando parasitas que infectam murinos são repassados muitas vezes sobre um mesmo animal de fundo genético isogênico, poucos genes da família *pir* são selecionados para serem transcritos dentro do repertório gênico de cada parasita (CUNNINGHAM et al., 2009). Esse processo no controle da expressão gênica permanece até que o parasita em questão sofra passagem no hospedeiro invertebrado ou sofra alguma pressão seletiva no hospedeiro, tal como seleção imune. Especificamente no hospedeiro invertebrado, a passagem no mosquito vetor leva uma enorme expressão de genes *pir*, que com sucessivas passagens voltam a ser reprimidos para uma quantidade numérica muito menor de genes expressos por parasita(SPENCE et al., 2013). Isso aponta que esses genes são importantes para adaptações parasita-hospedeiro-vetor até que se estabeleça uma relação dos genes ótimos sendo expressos para cada tipo de hospedeiro (CUNNINGHAM et al., 2005) .

No caso de genes *cir*, a localização das respectivas proteínas CIR em diferentes compartimentos de eritrócitos infectados sugere múltiplas funções (LAWTON et al., 2012), estando também associada ao lado exterior de eritrócitos (sugerindo semelhança as funções de ligantes do tipo PfEMP1) (KAUL et al., 1994). Talvez por isso a expressão desses genes parece se relacionar com órgãos específicos das subpopulações parasitarias que lá são encontrados (EBBINGHAUS; KRUCKEN, 2011). Não está claro quais motivos levam a isso e se ocorre por ação passiva por receptores em cada órgão ou ação ativa em resposta ao microambiente que cada órgão propicia (MERRICK; DURAISINGH, 2010).

Recentemente estudos corroboraram com a função adaptativa de proteínas PIR em processos metabólicos. Parasitas que estão ainda na fase hepática da infecção demonstram a expressão de gene variantes ainda em hepatócitos. Nesse processo pré-eritrocítico, genes do tipo *pir* são expressos e as proteínas produzidas parecem servir para captura de componentes metabólicos através de domínios protéicos START que permitem ao parasita a transferência de fosfatidilcolina do hospedeiro para o uso no metabolismo parasitário (FOUGÈRE et al., 2016). Diferente de artigos anteriores, esse estudo deixa claro o papel metabólico de ao menos uma proteína dessa família e a localização de muitos outros membros em regiões internas de células infectadas, possivelmente associados a processos citoplasmáticos distintos. Uma vez que centenas de genes são conservados por

genoma, é provável que seus papéis funcionais se estendam a outras formas de adaptação parasita-hospedeiro.

1.5 Comunicação intercelular no gênero *Plasmodium* por meio de vesículas

Muitos processos biológicos em organismos multicelulares requerem comunicação entre tecidos distantes. No caso de *Plasmodium*, a coordenação em várias etapas com estágios distintos, como forma hepático-sanguínea e gametócitos, apresenta constante interação entre diferentes células parasitadas e talvez o sistema imunológico do hospedeiro. Seja por usar sistemas fisiológicos do hospedeiro, tal como ciclos cicardianos (O'DONNELL et al., 2011) e sistemas fisiológicos da absorção férrica (EPIPHANIO et al., 2008), diferentes fases do parasita comunicam-se numa rede. Os efeitos desencadeados são variados e incluem: arraste do próprio metabolismo (evitando uma competição entre cepas pelo mesmo hospedeiro) até a completa diferenciação de parasitas em gametócitos (com conseqüente continuidade dos ciclos parasitários). Atualmente fica claro que essa rede de comunicação é coordenada entre diferentes células, por um sistema sofisticado de interação conhecido como exossomos ou microvesículas extracelulares. (REGEV-RUDZKI et al., 2013)

Figura 7 - Origem e componentes de exossomos

Formação de exossomos. MVB significa (multivesicular bodies) corpos multi vesiculares. Exossomos podem conter basicamente qualquer componente citoplasmático.

Fonte:modificado de Schovery et al ,2015

Exossomos permitem a passagem de diferentes componentes entre células distintas, variando seu conteúdo desde genes completos, RNAs, lipídios e

proteínas. A versatilidade no conteúdo dessas vesículas torna possível uma grande variedade e funcionalidade no contexto parasita-hospedeiro (THÉRY et al., 2002). Dentre essas funções destacam-se um papel na comunicação parasita-parasita, manipulações parasita-hospedeiro e proteção imune na relação hospedeiro-parasita. (COAKLEY et al., 2015)

No caso de vesículas produzidas em células infectadas por *Plasmodium* no contexto parasita-parasita, a passagem de DNA e proteínas já foi reconhecido. Acredita-se que outros componentes como RNA (incluindo talvez ncRNA com função ainda desconhecida) e outras moléculas possam ser secretados por essas exovesículas levando a diferentes efeitos no processo de infecção. É curioso notar que esse processo de sinalização permite também o sensoriamento do meio e a passagem de material genético que pode inclusive configurar uma transmissão horizontal de genes (pelo menos em nível experimental) (REGEV-RUDZKI et al., 2013).

A formação de gametócitos em *P. falciparum* parece ser parcialmente coordenado por exossomos. Nesse processo diferentes células liberariam vesículas com conteúdo citoplasmático para o sangue ou meio onde vivem. A liberação dessas vesículas é recebida por outros parasitas em locais distantes de sua emissão. Ao receber essas vesículas os parasitas receptores talvez reorganizem seu modo de transcrição, possivelmente via eventos epigenéticos, se transformando em gametócitos diferenciados. Em parte esse processo é controlado por fatores presentes no hospedeiro, tal como a presença de drogas ou fatores imunes e provavelmente densidade parasitaria no sangue (MANTEL et al., 2013). Esse processo se mostra vantajoso na medida em que um alto índice de infecção pode ser notado pelo próprio parasita por fatores de *stress* metabólico. Isso leva a uma intensificação na diferenciação de gametócitos, que permitem a uma subpopulação de uma mesma linhagem genética infectar um hospedeiro invertebrado dando continuidade ao ciclo.

Essas vesículas celulares não servem somente como um meio de comunicação entre células parasitarias. Muitas delas servem inclusive para interação complexas com o hospedeiro. Em *P. yoelii*, essas vesículas contém antígenos que se usados para gerar resposta pro-inflamatória vacinal geram efeito imune esterilizante do ciclo sanguíneo (MARTIN-JAULAR et al., 2011). O cultivo e obtenção de vesículas obtidas de *P. falciparum* desencadearam resposta

inflamatória pelo sistema imune inato, servindo em parte para ativação de resposta anti-parasitaria. Tal efeito já foi observado em varias infecções causadas pelo gênero passando por *P. vivax* e *P. berghei* (MANTEL; MARTI, 2014; SCHOREY et al., 2015).

Outros modelos tem demonstrado grande ativação imune por parte desses exossomos provenientes de *Plasmodium sp.*, gerando uma gama de efeitos imunes pró-inflamatórios intensos. Quadros graves como malária cerebral são causados parcialmente por adesão parasitaria e parcialmente por extensa ativação imune desencadeando fatores pró-inflamatórios em um efeito em cascata denominado tempestade de citocinas (fatores imune pro infamatórios que em excesso podem ser letais). É possível que exossomos estejam associados ao menos parcialmente a esses processos.(SCHOREY et al., 2015)

A interação entre parasita hospedeiro não está restrita somente a respostas pró-inflamatórias. Em diversos modelos parasitários, exossomos tem como finalidade não somente a ativação imunológica como também a supressão imune por diversos fatores (SCHOREY et al., 2015). Em *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* o efeito imediato dessas vesículas é uma geração de resposta imunossupressora mediada por citocinas antiinflamatórias permitindo um microambiente para a sobrevivência parasitaria (SCHOREY et al., 2015). Em acordo, para *P. yoelii*, a imunização com exossomos dessa espécie previne o surgimento de células com marcadores de exaustão clonal. Células que apresentam esses marcadores são atualmente tidas como grandes responsáveis por respostas imunológicas não efetivas e permanência crônica de parasitas na corrente sanguínea (FREEMAN; SHARPE, 2012). Não fica claro por quais métodos isso ocorre, mas sabe-se que a exemplo de infecções virais e cânceres essas vesículas estão associadas ao surgimento de células exaustas e conseqüente persistência de agente patogênico (WYKES et al., 2014). Provavelmente a retirada rápida da circulação desses fatores, por uma resposta vacinal prévia, possa ser um dos fatores que contribuam para diminuição de células exaustas. (MANTEL; MARTI, 2014)

Algumas vacinas contra tumores visam utilizar componentes de exossomos como alvos vacinais para efetivamente bloquear seu efeito na geração de células imunologicamente anergicas (AZMI et al., 2013)(ZHANG et al., 2015).Tomado em conjunto, esses aspectos demonstram que além de se mostrarem um meio efetivo de interação com células infectadas e com o hospedeiro, essas vesículas e seus

componentes podem ser alvos vacinais efetivos de interesse para intervenções humanas contra malária.

1.6 Novas tecnologias de controle contra malária

Dada o extenso e complexo panorama que se estabelece numa infecção causada por parasitas do gênero *Plasmodium*, novas tecnologias se fazem necessárias para sua erradicação e controle, variando desde o uso clássico de fármacos até a geração de novas estratégias vacinais.

Os métodos clássicos visam à utilização de drogas que interajam com o metabolismo ou a fisiologia parasitaria (CHOI et al., 2016). Infelizmente o reflexo dessas abordagens gera a constante seleção de parasitas resistentes que atualmente um entrave para usos de medicamentos e que tem se espalhado pelo globo (ASHLEY et al., 2014). Em vista dessa crescente demanda por novas drogas, a localização de novos alvos metabólicos que possam ser efetivos são altamente desejáveis. Por esse racional, a caracterização de genes PIR na manutenção metabólica do gênero *Plasmodium* torna-se atrativa para novos alvos.

Por outro lado, estratégias vacinais são efetivas no controle de diversos tipos de infecções. Baseando-se nesse princípio, alvos antigênicos de grande eficiência como PfRH5 (DOUGLAS et al., 2011) ou CSP (SCHWARTZ et al., 2012) são os grandes alvos contra malária atualmente. No entanto, a as vezes difícil obtenção de alvos de forma recombinante é um problema, que requer soluções inovadoras como a mutação direcionada para obtenção de proteínas funcionais com expressão facilitada (CAMPEOTTO et al., 2017).

A integração de métodos que sirvam para aprimoramento de ambas as estratégias através de viés tecnológicos é o futuro para o tratamento de grande endemias, dentre elas malária. Dentre essas técnicas, a utilização de nanoestruturas para entrega de fármacos ou conteúdo antigênico tem se mostrado efetivo para transpor muitas das dificuldades presentes em abordagens farmacológicas e imunológicas (IRVINE, 2011).

Atualmente lipossomos (vesículas nanométricas de forma esférica e estrutura lipídica) destacam-se nesse processo. Contendo em seu interior um espaço aquoso que pode efetivamente carregar fármacos ou antígenos e uma camada lipídica que pode ser extensivamente modificada para conter ligantes específicos ou moléculas lipofílicas, essas nano estruturas amplificam largamente a efetividade de drogas e a imunogenicidade de vacinas (SCHWENDENER, 2014). Por sua extensa capacidade de modificação essas estruturas podem auxiliar basicamente qualquer abordagem,

podendo inclusive diminuir efeitos indesejáveis como efeitos colaterais de muitos tratamentos. Mesmo a integração de respostas farmacológicas e imunológicas é possível utilizando nano estruturas lipossomais (KHAN et al., 2015). Por esse motivo uma abordagem que vise a obtenção de uma resposta imunológica adequada deve se basear numa estratégia que possa além de viabilizar o objetivo vacinal, trazer novas tecnologias para diferentes usos.

Figura 8 - Versatilidade de usos para formulações lipossômicas.

Modificações internas e externa em lipossomos. Em nosso modelo a modificação fica sendo a adição de antígenos sabidamente protetores com domínio GPI a parte externa, facilitando a geração de anticorpos com células do tipo B.

Fonte:modificado de Irvine et al, 2011

Em alguns modelos o uso vacinal de nano-estruturas lipídicas pode evidenciar efetiva resposta imunológica protetora. Utilizando antígenos presentes no processo de reinvasão, estruturas lipídicas compostas de antígenos associados ao exterior de merozoítos podem ser usados de maneira efetiva no controle de parasitemia. Podemos mostrar um efeito nesta direção para *P. berghei* e com ação esterilizante em *P. yoelii* (FOTORAN et al., 2016). Em *P. falciparum*, a imunização com nano-lipossomos carregados com proteínas inibiram a reinvasão e provocaram efeitos atenuantes em processos relacionados a tempestades de citocinas (FOTORAN et al., 2015b). Embora essas estruturas contenham antígenos importantes para modelos vacinais, sua incorporação nas partículas é randômico uma vez que conta somente com antígenos presentes em merozoítos extraídos naturalmente. Nessa linha alguns melhoramentos devem ser almejados.

Para que se obtenha um modelo vacinal que possa conter antígenos definidos incorporados em lipossomos por porções hidrofílicas (e conseqüentemente o posicionamento exterior), o uso de antígenos recombinantes com domínios para sua purificação e obtenção são desejáveis (SINGH et al., 2015). O emprego de um sistema como esse, qualquer antígeno que possa ser obtido poderia ser purificado por extração química e conseqüente purificação para distintos usos em formulações lipossômicas. A aplicação de idéias já presentes, como proteínas recombinantes fusionadas a GPI, com modificações simples permitiriam seus usos para distintos objetivos podendo inclusive conter antígenos para malária como o PfRH5 até possíveis alvos importantes como proteínas da classe PIR, caso estudos validem esses alvos como interessantes para proteção imune.

Desse modo a incorporação de novas tecnologias e ampliação do conhecimento de subpartículas que levem a novos usos funcionais é de grande interesse (HA et al., 2016) para tratamentos em malária e outras doenças.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

2.1 Integração de possíveis papéis de genes variantes em modelos murinos com modelos vacinais nanotecnológicos

Estudos em genes variantes *pir* de origem murina (*bir*) sugerem função metabólica para esses genes (FOUGÈRE et al., 2016). Anteriormente, esses genes e seus antígenos foram associados a funções e características presentes em antígenos variantes do tipo PfEMP1 presente em *P. falciparum*. Para atribuir alguma função para genes *bir* e estabelecer algum efeito na interação com o sistema imunológico do hospedeiro, que possivelmente modularia a expressão de genes *bir*, é imprescindível simplificar o modelo devido ao tamanho da família multigênica *bir*.

Assim, propomos estabelecer um modelo no qual um promotor de genes do tipo *pir* em *P. berghei* pudessem ser estudados e caracterizar sua modulação em diferentes situações da infecção. Para ter um nexo com parasitas que infectam seres humanos, usamos para isso modelos murinos de infecção que pudessem apresentar aspectos fisiopatológicos similares ao que ocorre em *P. falciparum*. Tentamos também elucidar mecanismos moleculares. Para isso abordamos as seguintes questões:

1- Averiguamos a possibilidade das proteínas codificadas por esses genes serem alvos da resposta humoral, a exemplo do que se conhece para genes *var* de *P. falciparum* e validar sua possível localização em eritrócitos infectados.

2- Criamos um plasmídeo de transfecção onde inserimos o gene *gfp* e o gene luciferase sob ação de um promotor variante (*bir*) murino e analisamos seu padrão de expressão em parasitas *P. berghei* transgênicos com esta construção durante uma infecção experimental.

3- Esta infecção ocorre em animais que pudessem desenvolver plena resposta imunológica contra eles (C57BL/6 infectado com *P. berghei* pBir:GFP) e animais que pudessem ter sua resposta imunológica atenuada pela ativação parasitaria de genes que pudessem gerar imunossupressão (C57BL/6/GFP⁺ tolerante a GFP, infectado com *P. berghei* pBir:GFP) e analisamos as respostas desencadeadas tanto no parasita quanto em seu hospedeiro modelo.

4- Inferimos mecanismos usados pelo parasita para desencadear esses efeitos e a consequente resposta no hospedeiro com possíveis implicações para a

relação imune do parasita-hospedeiro em modelo onde a atenuação inflamatória ocorreu por modulação gênica de genes *bir*.

A segunda parte visou a utilização de um sistema vacinal que pudesse compreender tanto alvos vacinais de potencial de antígenos variantes quanto outros alvos relevantes para infecções do gênero *Plasmodium*. Essa parte foi executada em paralelo contra antígenos que sabidamente são relevantes para reinvasão como PfRH5. O sucesso dessa abordagem viabilizaria novos estudos com possível foco em genes/antígenos variantes. A abordagem em paralelo fez-se necessária como controle positivo, uma vez que não existia qualquer segurança no possível papel imunoprotetor contra proteínas codificadas por genes variantes estudados nesse projeto. Para isso é necessário:

- 1- Gerar um sistema para produção de proteínas recombinantes que pudesse resultar proteínas fusionadas com domínios GPI.
- 2- Efetuar e verificar a associação dessas proteínas com nanopartículas lipossomais.
- 3- Comprovar o efeito imunológico dessas partículas quando usadas como modelo vacinal contra antígeno PfRH5.
- 4- Analisar o efeito antiparasitário dessas partículas em modelos *in vitro* que simulem infecções por *P. falciparum*.

Se validado o possível papel protetor de respostas imunes contra antígenos de origem em genes variantes, ambas as abordagens desse trabalho caminhariam em conjunto. Dessa forma a tecnologia desenvolvida em sistemas vacinais poderia ser aplicada a esses antígenos uma vez que teria sido validado com um antígeno comprovadamente eficiente.

2.2 Desenho Experimental para resolução dos modelos propostos

Figura 9 - Primeiro desenho experimental para validação de genes *bir* em eritrócitos infectados

Modelo integrado para validação de respostas contra antígenos variantes de membrana de hemácia. A intenção desse modelo é verificar a existência de antígenos variantes na superfície eritrocitária e analisar possíveis proteínas relacionadas a citoaderência.

Figura 10 - Segundo desenho experimental para investigação de genes *bir* em infecções com possível modulação desses genes na relação parasita-hospedeiro.

Geração de parasita com gene 5'pBir:GFP adicional

Modelo de resposta parasitária ao Hospedeiro

Modelo integrado no estudo de genes variantes em resposta a diferentes hospedeiros. O foco desse desenho experimental é validar a expressão variável de genes variantes com uma proteína que possa ser relevante no processo de infecção. Animais que possuam GFP como gene adicional, possuem tolerância a GFP, podendo afetar a expressão endógena de GFP por parasitas e desenvolver respostas fisiopatologicamente relevantes no hospedeiro. Esse modelo tem também a finalidade de analisar rápidas alterações do parasita que levam a adaptações em seu hospedeiro. Esse modelo que pode revelar uma tendência dos antígenos BIR não trabalharem gerando somente virulência, mas sim de equilíbrio mantendo infecções mais amenas que ajudam a explicar quadros de assintomático em indivíduos infectados.

Figura 11 - Terceiro modelo para produção de um sistema para obtenção de antígenos recombinantes fusionados a ancoras GPI para utilização em lipossomas para usos vacinais.

1-Geração de um sistema para produção dos antígenos recombinantes

2-Geração de um sistema para produção de proteolipossomos contra PfrH5 (antígeno modelo)

3- Validação de efeito antiparasitária dos anticorpos gerados validando potencial vacinal

Modelo vacinal para geração proteolipossomos com proteínas recombinantes com ancora de GPI. Essa aproximação visa utilizar antígenos recombinantes com ancoras de GPI para sua incorporação em nano lipossomos para usos vacinais. Como prova de princípio, escolhemos testar o antígeno PfrH5 por se tratar de uma proteína essencial na reinvasão de *P. falciparum* em hemácias humanas.

2.3 Objetivo

O objetivo geral desse projeto foi verificar um papel funcional de proteínas *BIR* de *P. berghei* e verificar se a regulação de genes *bir* do parasita é influenciada por respostas imunológicas do hospedeiro. Se validado um papel imunológico protetor na aquisição de respostas imune contra esses antígenos, estratégias vacinais desenvolvidas em paralelo poderiam gerar um modelo vacinal contra esses antígenos. Em paralelo, propõe-se estabelecer um modelo vacinal usando nano-lipossomos com cargo definido.

2.3.1 Objetivos específicos

- Desenvolver uma linhagem transgênica de parasitas que contenha um gene *reporter* sob controle de um promotor de gene variante que possa ser usado para monitorar sua expressão.
- Analisar fatores que possam afetar essa expressão e sua consequência para a relação parasita-hospedeiro
- Desenvolver um sistema de proteínas recombinantes que possa ser associado a qualquer antígeno relevante com possível uso para antígenos variantes.
- Validar o sistema vacinal criado com um modelo que sabidamente tenha efeitos anti-reinvasão em *P. falciparum* com antígenos PfRH5.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este mesmo projeto foi submetido para análise na Comissão de Ética para Pesquisa em animais do ICB e a parte em animais foi iniciada apenas após aprovação. O tratamento de animais foi conduzido conforme as recomendações e normas presentes no biotério do Departamento de Parasitologia.

3.2 Parasitas murinos e doses infectivas usadas

Para obtermos uma uniformidade no desafio dos animais transfecção, animais C57BL/6 foram infectados com a cepa *P. berghei* NK65 GFP (SULTAN et al., 1999) e com a cepa *P. berghei* ANKA (JANSE et al., 2006) em diferentes cargas parasitárias. Apenas animais infectados I.P. a partir de 5×10^6 parasitas apresentaram 100% sucesso de infecção. Desse modo animais C57BL/6 foram infectados com *P. berghei* NK65 GFP e foram acompanhados até que a parasitemia dos animais atingisse valores próximos de 15%. Nesse ponto os animais foram sacrificados e o sangue foi preservado em alíquotas de 5×10^7 parasitas em tampão Alsevi's (Tampão PBS contendo glicerol a 40%) e estocado a -80°C para uniformidade em estudos futuros. Uma vez caracterizada essa dose de desafio, cada animal desafiado com *P. berghei* NK65 recebeu doses de desafio iguais 5×10^6 hemácias parasitadas.

3.3 Cultivo de *P. falciparum*

A linhagem NF54 de *P. falciparum* foi mantida *in vitro* em sistema *candle jar* adaptado e cultivado em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de plasma humano B+. Eritrócitos B⁺ foram adicionados à cultura para a obtenção de um hematócrito de 5%. As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C com trocas diárias de meio. A parasitemia foi monitorada através de microscopia de esfregaços corados com *kit* Panótico Rápido. As culturas foram sincronizadas através do uso de sorbitol (LAMBROS; VANDERBERG, 1979) e sedimentação por plasmagel (LELIEVE et al., 2006).

3.4 Transfecção em *P. falciparum*

Alguns vetores obtidos foram transfectados em parasitas NF54 segundo o protocolo estabelecido por Hasenkamp e colegas (HASENKAMP et al. 2012). Para isso, hemácias vazias, previamente lavadas com cytomix (120 mM KCl; 0,15 mM CaCl_2 ; 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,6; 25 mM HEPES pH 7,6; 2 mM EGTA; 3 mM MgCl_2) foram eletroporadas com 40 μg de cada plasmídeo. As condições de eletroporação foram 0,31 kV e 960 μF em cubetas de eletroporação de 2 mm espessura usando o GenePulser 1 (BioRad). Depois, 1 a 5×10^7 parasitas em fase trofozoítio/esquizonte de NF54 previamente concentrados por plasmagel foram colocados para invadirem novamente às hemácias eletroporadas.

Uma vez que os plasmídeos utilizados possuem um *cassette* com a sequência hDHFR (dihidrofolato reductase humana) que confere resistência à pirimetamina e seu derivado WR99210, no segundo dia após a transfecção, os parasitas foram submetidos a seleção por este fármaco. Parasitas resistentes a 2,5 nM WR99210 reapareceram depois de aproximadamente 20 a 25 dias. Quando as parasitemias chegaram 2-4%, uma alíquota foi congelada como *backup*.

3.5 Manipulação de DNA e clonagens

Plasmídeos C-PAC (IWANAGA et al., 2010b), pcDNA3-LUCIFERASE, pBIRLUC, pEFLUC, pcDNA3-R7AGFP GPI, e pcDNA3-R7APFRH5 GPI recombinantes para fim de transfecção foram propagados em bactérias *E. coli* SURE para evitar recombinação indevida dado a presença de grandes trechos de DNA rico em A/T. Montagens de plasmídeos foram conduzidas em *E. coli* DH10B. A manipulação de fragmentos de DNA foi conduzida segundo Sambrook et al. (SAMBROOK, 1991) e a purificação de DNA extraído de gel de TAE agarose foi feito mediante glassmilk (BOYLE; LEW, 1995). Bactérias competentes foram preparadas segundo protocolos acessíveis em http://openwetware.org/wiki/TOP10_chemically_competent_cells). A região 5' UTR *bir* amplificada por PCR e clonadas (Primers: Sense: gtcttaaaaaataatacttcccttatctctcctatctaaaatg, Antisense: ggaatataatttataatctctaggttaagggg). Já GFP (Primers: Sense: ggatccAAAAAATGGCTACACGTG, Antisense: gaattcATAGTTCATC CATACC) e PFRH5 (Primers: Sense: ggatccGAGAACGCCATCAAAAAGACCAAG,

Antisense: gaattcCTGGGTCAGGGGCTTGTTC) foram amplificados e clonados em plasmídio pR7A-GPI. As reações de digestão de DNA plasmidial foram conduzidas conforme os fornecedores das enzimas de restrição (Thermo Fermentas). Vetores prontos foram controlados por sua integridade aplicando digestões enzimáticas diagnósticas e as sequências que sofreram em algum passo amplificação por PCR, foram resequenciadas mediante seqüenciamento semi-automático no sequenciador ABI 3500 do Departamento de Parasitologia (quando a amostra possibilitou esse método, em caso do promotor *bir* somente uma análise parcial e de restrição foi possível).

3.6 Transfecção de células eucariotas e *P. berghei*

Células CHO-K1 ou HEK293T foram cultivadas em garrafas de cultivo em meio RPMI-1640 ou DMEM (HEK293T) acrescidas de 5% (v/v) de FCS (soro bovino fetal) a 37° C em uma atmosfera de 5% CO₂. As células foram tripsinizadas e diluídas 1:4 a cada 3 dias, utilizando-se 0,1% tripsina-EDTA (EMCARE, Campinas).

Células foram transfectadas mediante o reagente ExGene500 (Fermentas) quando estavam em crescimento exponencial e aproximadamente 50% confluência. Foram seguidos as recomendações do fornecedor do reagente e para transfecções estáveis versões linearizadas no *backbone* do plasmídeo foram utilizadas. Transfectantes obtidos foram testados usando imunofluorescência detectando a cauda de histidina exposta na superfície da célula e células com a produção mais forte foram separadas por diluição limitante e análise em citometria de fluxo em aparelho Guava Easycyte da Millipore. A transfecção de *P. berghei* foi conduzida conforme o protocolo padrão (CHRIS J JANSEN, 2006). Esquizontes sincronizados foram transfectados por eletroporação com plasmídeos e infundidos em camundongos. Após um ciclo de replicação seguiram 4 dias de crescimento na presença da droga pirimetamina (Daraprim, 5 µg/ml adicionado à água oferecida aos animais) e mais 5 a 6 dias sem droga. Depois deste prazo, parasitas foram transferidos para novos camundongos que foram tratados por pirimetamina injetada. O procedimento demora comumente 14-15 dias.

3.7 Purificação de proteínas GPI-ancoradas de células eucariotas

Células CHO transfectadas com as construções quiméricas de GFP, PfRH5 com domínios GPI foram submetidos à sonicação (Branston sonifier) em tampão Tris HCl 5 mM, pH7.5 em potência máxima por 1 min com intervalo de 30 segundos em gelo. Após total disrupção do pellet (em geral 4 à 5 ciclos) a concentração de proteínas foi ajustada em 0.5 mg/ml e foi então acrescentado a solução volume de Triton X-114 na proporção a atingir 1% do volume total a ser solubilizado. Essa mistura foi então colocada sob agitação leve em gelo por 1 hora e a cada 10 min uma agitação em vortex foi feita.

Após esse processo a mistura foi então submetida à centrifugação em centrífuga Sorvall a 1480g para obtenção de três fases: fase aquosa, fase rica em GPI e fase de pellet celular. A fase intermediária referente à fase rica em proteínas GPI ancoradas foi separada e incubada em resina de afinidade por níquel e seguiu o protocolo usual para geração de proteínas recombinantes por cauda de histidina (Ni. Sepharose™ High performance GE Healthcare).

3.8 Produção e carregamento de lipossomos com proteínas fusionadas à GPI

Foram usados nesse trabalho lipossomos feitos com DPPC (*Dipalmitoylphosphatidylcholine*) e colesterol na proporção molar 4:1, como descrito por Fotoran et al. (FOTORAN et al., 2015a, 2016). Primeiramente tanto DPPC e colesterol foram dissolvidos em 1 ml de clorofórmio e deixados sob atmosfera de N₂ para completa evaporação do clorofórmio até a formação de um filme de fosfolípidos nas paredes do tubo. Esse filme foi então mantido sob vácuo por pelo menos 1 h para a remoção de qualquer traço de clorofórmio restante. O filme foi reidratado em tampão Tris HCl 5 mM, pH7,5 à 37° C (em TM, Temperatura de transição, do DPPC) e agitado vigorosamente a cada 10 min por 1 h.

A solução leitosa obtida foi então submetida sonicação em força máxima até quase completa transparência da solução. Em sequência, a solução foi ultracentrifugado (100.000g). O sobrenadante contendo vesículas lipídicas unilamelares foi então retirado de qualquer pellet residual e usado na produção de proteolipossomos.

Para a geração de proteolipossomos usamos a incubação de 0.250 mg da fase de proteínas GPI enriquecidas para cada ml de lipossomos. Após um período de 12 h de incubação a solução resultante foi então centrifugada em ultracentrifugas à 180.000g e o pellet foi reservado. O pellet passou por ressuspensão em 1 ml de tampão Tris HCl 5 mM, pH 7,5 e foi preservado para os demais experimentos. A concentração na incubação pode ter sido alterada como apresentado no decorrer desse projeto para caracterização das partículas, quando mudado algum padrão as especificações são informadas na legenda.

3.9 Quantificação de proteínas incorporadas em proteolipossomos e relação de luminosidade por partícula

Para quantificar a relação de proteína incorporada em proteolipossomos usamos a seguinte estratégia. Proteolipossomos foram pelletados e submetidos a quantidade de proteínas em cada amostra. O sobrenadante da coincubação passou pelo mesmo processo. Uma vez que as quantidades adicionadas foram estritamente controladas, foi possível quantificar a porcentagem de proteínas presentes em proteolipossomos pelletados.

Para a quantidade relativa de fluorescência o número de proteolipossomos pelletados com fluorescência positiva para GFP foi analisada em relação a sua média geométrica de fluorescência. A partir desse dado a fluorescência média foi normalizada pela quantidade de proteína e multiplicada pelo número de partículas a fim de se obter a fluorescência média baseada na quantidade de partículas geradas.

3.10 Análise da expressão de GFP em parasitas transgênicos por citometria

Nesse modelo experimental usamos um parasita *P. berghei* transfectado com expressão constitutiva de GFP facilitando a análise de parasitemia no sangue. Monitoramos a presença de GFP no parasita e avaliamos a expressão de GFP por imunoblot e citometria de fluxo. Nos animais infectados analisamos ainda a perda de peso em porcentagem de peso adquirido ou perdido a partir da primeira anotação de peso. Avaliamos a anemia por citometria e finalmente acompanhamos a parasitemia desenvolvida pelos parasitas transgênicos por incorporação *ex vivo* de Brometo de Etídio 1ng/ML nos diferentes animais usados.

Todas as amostras foram coletadas a partir de animais anestesiados com quantidade anestésica de Xilazina e Quetamina de acordo com as normas do comitê de ética. Os animais então foram sangrados pela veia submandibular sem a necessidade de sacrifício. Quando o sacrifício foi essencial para o tipo de coleta (baço, por exemplo) o animal foi morto por overdose de anestesia. Todas as amostras foram preservadas em RPMI e processadas imediatamente. Quando necessário preservação, as amostras de tecido foram guardadas em RPMI com 10% de DMSO e congeladas a -80°C . Já as amostras de soro para análises imunológicas foram preservadas em 50:50 (v:v) de glicerol e congeladas a -20°C .

3.11 Extração de gDNA de *P. berghei*

A cada 100 μl de sangue compactado com no mínimo 5% de parasitemia, foi acrescentado 1,25 ml de PBS (1X) mais 150 μl de saponina 1%. Os parasitas foram levemente misturados por inversão e incubados no gelo por 5 minutos, até a solução ficar translúcida. Logo após, os parasitas agora liberados das hemácias foram centrifugados por 5 minutos a 12000 RPM, o sedimento obtido ($\sim 50\text{ }\mu\text{l}$) foi lavado uma vez com PBS 1X e dissolvido em 250 μl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8 e 1 mM EDTA pH 8). Posteriormente, foi incubado com 100 μl de tampão de lise 4 X (40 mM Tris-HCl pH 8; 4 mM EDTA pH 8; 0,8 mM NaCl e 4% SDS) acrescentando 20 μl de Proteinase K (10 mg/ml) por um período de 3 h a 37°C .

Subsequentes extrações com fenol, fenol/clorofórmio e clorofórmio (400 μl de cada, incubação de 10 minutos na gangorra, e centrifugação a 8000 RPM durante 5 minutos para cada solução, centrifuga Eppendorf) foram feitas para a eliminação de lipídeos e proteínas. Na última extração, o sobrenadante foi retirado e precipitado com 800 μl de etanol 100% por 15 minutos no gelo. Depois foi centrifugado a 8000 RPM em centrifuga eppendorf durante 5 minutos e o sedimento foi lavado uma vez com etanol 70%. O sobrenadante foi então retirado e deixado em estufa até o tubo ficar seco, neste ponto o sedimento foi ressuspenso em 50 μl de TE e armazenado a 4°C .

3.12 Imunoprecipitação de cromatina (ChIP) e geração de primers para estudos por PCR quantitativo

Utilizamos nesse estudo anticorpo anti-Histona 3 Acetilada, Histona 3 Lisina 9 Metil 3 e isotipo controle tais como os usados por Cabral et al (CABRAL et al., 2012).

Os experimentos de imunoprecipitação de cromatina, adaptados para *P. falciparum* foram realizados conforme previamente descrito por (LOPEZ-RUBIO et al., 2007). Os iniciadores utilizados para a amplificação da região promotora que demonstre expressão de GFP incluindo a ORF do gene foram denominados de “Forward 3’ bir” (5’- GGTGAAGTGTGTTGCGTCAC -3’) e “Reverso ORF bir:GFP” (5’GAGCAAGGGCGAGGAG-3’). Os oligonucleotídeos específicos para PCR quantitativo foram desenhados baseados nas sequências de mRNA dos genes anotados no Plasmodb.org, usando o programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Foram escolhidos primers que contivessem a região da ORF do gene pois assim os estudos seriam específicos ao gene inserido por transfecção com plasmídeo C-PAC bir:GFP, excluindo amplificação inespecífica de outros genes variantes.

3.13 Determinação de número de cópias de transgenes por PCR quantitativo

A eficiência dos pares de oligonucleotídeos foi testada com uma curva composta de C-PAC Bir:GFP usando diferentes diluições onde o Ct (*threshold cycle*, que o ciclo da PCR onde a reação entra na fase exponencial e o amplicon começa a emitir fluorescência pela intercalação de SYBR Green acima do *background*) podia variar de +/- 1 entre pares de oligos diferentes.

Todas as reações para quantificação do número de cópias de C-PAC foram feitas em triplicata e um controle negativo. Os dados foram analisados usando a fórmula $2^{-\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) em relação ao controle feito pela curva obtida pela diluição seriada do plasmídeo sozinho. Uma vez que cada reação contou com uma quantidade de 1 µg de gDNA parasitário de *P. berghei* transfectado com C-PAC *pbir:GFP* a quantidade relativa por massa de genoma ou número de moléculas pôde ser calculado.

Para as reações de PCR em tempo real com finalidade de analisar modificações epigenéticas foram utilizados 50 ng de material imunoprecipitado de anticorpos controle (Isotipo) e monoclonais anti-H3 Acetilada e anti-H3K9met3. Os kits usados foram os da marca SYBR Green Master Mix (Fermentas) e os experimentos foram conduzidos no aparelho Realplex 2 (Eppendorf) segundo as instruções do fabricante.

Os dados foram analisados usando a formula $2^{-\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) em relação ao controle feito com isotipo controle para imunoprecipitação. O cálculo do número de cópias do genoma de *P. berghei* leva em conta a existência de um genoma de 20 Mbp e o valor de um base pareada com peso de 660 g/mol.

3.14 Western Blot, Immunoblot e coloração por prata

Para análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e western blot, todas as amostras foram delipidadas através de incubação com clorofórmio e em seguida as proteínas presentes nas amostras foram resolvidas por SDS-PAGE por eletroforese e depois transferida para membranas de nitrocelulose (Hybond-C, GE Healthcare, NJ, EUA), que foram então bloqueadas durante 1 h em temperatura ambiente com 5% leite em PBS-Tween 0,1% (PBS-T). Após 4 lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas em temperatura ambiente com um pool de plasmas de animais imunizados e com um pool de plasmas de animais controles 1:200 em PBS-T+ Leite 1%. Após cinco lavagens com PBS-T, a membrana previamente incubada com soro de camundongos foi incubada com anticorpo de carneiro anti-IgG de camundongos conjugado a peroxidase de raiz forte (Amersham-Pharmacia) diluído em 1:2000. Estas incubações foram realizadas por 1 h sob leve agitação. As membranas foram então lavadas 5 vezes com PBS-T, e reveladas por quimioluminescência (kit Western Pico SuperSignal, Pierce/Thermo Scientific), logo em seguida foram expostas ao filme Amersham Hyperfilm, seguindo as instruções do fabricante.

No caso das amostras serem coradas com prata o SDS-PAGE ocorreu como mencionado acima e o gel foi posteriormente corado como descrito no protocolo presente no kit *Silver staining Kit, Protein* (GE Healthcare).

3.15 Membranas infectadas para imunização de *P. Berghei*

Eritrócitos infectados foram separadas por coluna magnética e tiveram as membranas purificadas usando o seguinte protocolo:

- Lise osmótica por tampão Tris 0.1 molar pH7.5, NaCl 0.5 μ M (30 min no gelo)
- Separação por centrifugação de pellet de membrana e parasitas livres com centrifugação de 13000 rpm por 5 min. Gerou-se duas fases: uma branca de membranas e uma escura de parasitas livres. Separou-se o parasita da membrana e

repetiu-se o processo de centrifugação até as membranas estarem completamente limpas e sem vestígio de parasita.

A restauração após incubação da proteína e membrana de eritrócito na concentração de 100 µg/ml da proteína escolhida (no caso GFP) em tampão de lise, no gelo por 30 min, adiciona-se adjuvante CpG na quantidade de 5 µg/ml e usamos quantidades de 50 ng para cada dose a serem aplicadas em cada animal (em geral 2 garrafas de parasitas sincronizados geram 5 amostras para imunização num total de 200 µg de proteínas totais para cada animal por imunização). Cada animal foi imunizado três vezes e então desafiado. O grupo controle recebeu eritrócitos não infectados de animais C57BL/6. A restauração ocorreu com a adição de um tampão 10 x PBS até a mistura atingir a concentração 1 x. Normalmente são usados 10 µl de tampão 10 x em 100µl de incubação eritrócito/proteína por mais 30 min.

Lavou-se o produto por centrifugação a 1400 rpm por três vezes. Seguiu-se caracterização por citometria/imunofluorescência e imunização.

3.16 Citometria de fluxo para hemácias reconstituídas e ligação de anticorpos anti-hemácias parasitadas

As análises para a reconstituição de hemácias infectadas com GFP foram feitas por fluorescência incorporada em membranas reconstituídas. Esse foi um controle importante pois permitiu observar o particulado usado nas imunizações. Seguimos as análises com o seguinte painel, em verde o controle de eritrócito infectado reconstituído sem proteína (mesmo padrão exibido por eritrócitos não infectados) e com eritrócitos infectados com GFP reconstituído, mostrado em fundo azul:

Figura 12 - Encapsulamento de GFP em eritrócitos infectados.

Encapsulamento de GFP em hemácias infectadas reconstituídas. Em cinza observamos os padrões de tamanho versus granulosidade de membranas vazias reconstituídas em PBS, seguido pelo padrão de fluorescência em GFP e Red=Fluorescência para controle de fluorescência inespecífica. Ao lado de cada painel pode ser observado o histograma da fluorescência incorporada por cada hemácia lavada por três vezes com (em fundo azul) ou sem GFP (em fundo cinza).

Nota-se em ordem os padrões: de tamanho X granulosidade, GFP X Fluorescência controle (RED) e histograma da incorporação de GFP.

Eritrócitos reconstituídos com GFP em seu interior apresentaram padrão de imunofluorescência como o apresentado abaixo.

Figura 13 - Encapsulamento de GFP em eritrócitos infectados por microscopia de fluorescência.

Fluorescência de eritrócitos infectados reconstituídos. A esquerda uma imagem de luz branca em eritrócitos infectados reconstituído com GFP em seu interior e retirada de parasitas. A esquerda fluorescência referente a GFP internalizado.

As análises para reconhecimento de membrana por anticorpos anti-hemácias infectadas gerados pela imunização foram nos seguintes parametros de citometria:

1-Definição do *gate* de hemácias por hemácias providas de animais infectados.

2-Controle de cores em fundo não marcado, ou seja, hemácias de animais infectados sem a adição de nenhum fluorocromo que possa indicar a presença de parasita ou anticorpos na superfície das hemácias infectadas.

Figura 14 - Reconhecimento de eritrócito infectado por soros de animais controles.

Definição dos gates controles para hemácias infectadas. Hemácias não marcadas foram definidas por padrões de tamanho e granulosidade e seguiu-se a definição de padrão negativo para as fluorescências usadas nesse estudo. Verde mostra anticorpo secundário reativo (FITC conjugado) e vermelho indica hemácias infectadas, evidenciadas por incorporação de brometo de etídeo nas hemácias infectadas.

Seguiu-se análise de ligação específica para cada cor (controles positivos):

Figura 15 - Reconhecimento de eritrócito infectado por soros de animais controles hiperimunes.

Controles positivos para hemácias infectadas e para anticorpos anti-hemácias. Utilizando o mesmo gate criado anteriormente avaliamos a presença de marcação para hemácias marcadas com brometo de Etídeo. Isso evidencia a presença de parasitas em seu interior por incorporação do fluoróforo no DNA do parasita (primeiro painel) sem a marcação secundária com anticorpos secundários marcados com FITC. Seguiu-se o mesmo processo marcado hemácias infectadas com pool positivo para hemácias e respectivo secundário anti-mouse marcado com FITC sem a presença de brometo (segundo painel). As figuras deixam claro a marcação específica para cada caso sem nenhuma interferência inespecífica dos fluorocromos usados.

No painel mostrado foram adquiridos os eventos apresentados nos resultados desse trabalho, com pelo menos 25000 eventos para cada análise individual de soro analisado na Figura 18.

3.17 Imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados utilizando células CHO K1 controles ou transfectadas com pcDNA3-R7AGFP e pcDNA3-R7ApfRH5GPI. Cada análise foi feita em separado para cada linhagem transgênica de células. As células foram incubados com 40 µg/ml de DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) e o anticorpo primário utilizado foram anticorpos comerciais antiHis-tag ou antiGFP na diluição de 1:100, em um volume de 100 µl por 1 hora a 37° C, seguido por incubação com os soros em diluição 1:200 para anticorpo anti-IgG murino

marcado com AlexaFluor 594/488 (1:200)(vermelho/verde). Entre cada etapa de incubação foram realizadas 3 lavagens com RPMI pH 7,2. As amostras foram visualizadas em microscópio de fluorescência presente no laboratório do Prof. Claudio Marinho Zeiss Observer , Axiostar plus).

3.18 ELISA

A técnica de ELISA indireta foi estabelecida com algumas alterações: inicialmente, as placas de ELISA (Maxsorb, Nunc, Hampton, NH, USA) foram adsorvidas com o antígeno recombinante na quantidade de 250 ng/poço em tampão carbonato 0,015 M/bicarbonato 0,035 M pH 9.6), a 4° C por 18 horas. Em seguida, a placa foi lavada duas vezes (200 µl cada) com PBS 1 X + Tween 20 (0,05%). Após as lavagens, foi realizado bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação, incubando-se com PBS 1 X adicionado de 4% leite em pó desnatado por 1 h em temperatura ambiente. Novamente, foram realizadas duas lavagens (200 µl cada) com PBS + Tween 20 (0,05%). Em seguida diluições seriadas dos soros de todos os animais, e seus respectivos controles (1:200 a 1:1.000.000) foram realizadas em PBS 1 X adicionado de 2% leite em pó desnatado, e 50 µl de cada diluição, foram adicionados em cada poço da placa deixando por 1 hora em temperatura ambiente. Seguiram-se três lavagens com PBS 1X + Tween 20 (0.05%), e foram usadas diluições de 1:5000 do conjugado (HRP Conjugated Goat anti-Mouse IgG Fc (Immunology Consultants Lab) em 100 µl de PBS 1 X adicionado de 2% leite desnatado, em cada poço da placa, deixando reagir por 1 hora em temperatura ambiente. Três novas lavagens foram realizadas com PBS 1X + Tween 20 (0.05%) e foi adicionado em cada poço 50 µl do substrato para peroxidase (ácido cítrico 0.1 M, fosfato de sódio 0.2 M, H₂O₂ (30 volumes) (Merck, Darmstadt, Germany) com substrato TMB incubando-se por 30 min. Seguido este período a reação foi interrompida com 50 µl de HCl (1 M) e foi realizada a leitura a 450/595 nm. Todos os soros foram avaliados em duplicata.

3.19 Sequenciamento

Os plasmídeos obtidos foram seqüenciados por meio do seqüenciamento de uma ou das duas fitas de DNA utilizando *BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit* (PerkinElmer, MA, USA), em um volume final de 10 µl, contendo 200-300 ng de plasmídeo, 5 pmol de oligonucleotídeo *sense* e/ou *antisense* (de acordo com cada

plasmídeo utilizado), 4 µl de *Big Dye Mix*. As reações foram submetidas a 25 ciclos de: 10s a 96 °C, 5s a 50 °C e 4 min a 60 °C. Após a reação de *Cycle Sequencing*, as amostras foram precipitadas com isopropanol 75%, lavadas com etanol 70%, ressuspensas em formamida e aplicadas em um seqüenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, CA, USA). A análise e o alinhamento das seqüências foram conduzidos utilizando-se os *softwares* ClustalX1.83 e BLAST¹²⁹.

3.20 Purificação de membrana do eritrócito infectado por *P. berghei*, imunoprecipitação de antígenos e espectrometria de massas

Trofozoítas maduros derivados de culturas sincronizadas por cultivo de *P. berghei* (CHRIS J JANSEN, 2006) foram purificados por coluna magnética, peletados e ressuspensos em solução hipotônica (0,2 x RPMI + coquetel inibidor de proteases) em um volume 40 vezes maior que o pellet de eritrócitos infectados. Após 30 minutos de centrifugação a 15000 rpm, o material foi transferido para outro tubo contendo a solução hipotônica (com coquetel de inibidores de protease), para mais uma lavagem, até se obter um sobrenadante claro e translúcido.

Para o *blot*, este material foi incubado com clorofórmio na tentativa de deslipidificar esta amostra, e em seguida as proteínas presentes na membrana deslipidificada foram resolvidas por SDS-PAGE.

Para imunoprecipitar antígenos reconhecidos por soros imunes incubamos membranas infectadas purificadas com anticorpos de animais imunes e pré-imune (como controle) em PBS a 1% de soro fetal bovino (FCS) por 16 h a 4° C. Após esse período as membranas foram peletadas e lavadas em PBS por duas vezes. Beads de proteína G e proteína A covalentemente ligadas foram adicionadas e incubadas por 4 h. Após esse passo as beads foram purificadas por centrifugação e após 5 lavagens os antígenos foram purificados por adição de SDS-PAGE buffer e aquecimento. O produto liberado foi resolvido por SDS-PAGE. Antígenos precipitados de maneira diferencial por soro imune foram retirados para obtenção de resultado em espectrometria de massas. Após serem tripsinizadas as amostras seguiram o seguinte protocolo para identificação de antígenos. Os peptídeos digeridos foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Para isso, foi empregado o sistema EASY-nLC (Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas híbrido ion trap linear-Orbitrap (LTQ

Orbitrap Velos, Thermo Scientific) com fonte de íons nanospray Nano-Flex II (Thermo Scientific).

Para a separação dos peptídeos por cromatografia líquida empregou-se uma coluna capilar C18 (10 cm × 75 µm DI, Thermo Scientific), utilizando-se como fases móveis 0,1% (v/v) ácido fórmico em água (fase móvel A) e 0,1% (v/v) ácido fórmico em acetonitrila (fase móvel B).

A coluna foi equilibrada com 95% de fase móvel A, e as amostras foram injetadas (10 µL/min, 4 min) e eluídas sob vazão de 300 nL/min através do seguinte gradiente de eluição: isocrático a 5% B, 5 min; 5-30% B, 15 min; 30-80% B durante 10 min e isocrático 80% de B por 5 min. O eluato foi inserido no espectrômetro de massas através de uma fonte de íons nanospray. Os dados de LC-MS/MS foram adquiridos utilizando o software XCalibur, versão 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific). Os parâmetros utilizados para as análises foram: modo scan no intervalo de 400 – 1800 m/z, modo positivo, tensão do capilar de 2500 V, nebulizador a 8,0 psi, gás secante a uma vazão de 5,0 L min⁻¹ e temperatura para evaporação do spray de 200°C. Uma janela de exclusão de 45 s foi utilizada para eliminar redundância de sequenciamento de peptídeos abundantes. Os dados obtidos foram processados utilizando-se o software Proteome Discoverer 1.2.0 (Thermo Scientific), analisados e comparados através do programa SEQUEST. Foram utilizados os seguintes parâmetros para a busca: fragmentação por CID (dissociação induzida por colisão), tolerância de 10 ppm dos íons precursores e, para fragmentos de massa, de 2,5 Da e 0,8 Da para espectros de baixa e alta resolução, respectivamente, banco de dados Uniprot-*Mus musculus*-C57Bl/6.

3.21 Citometria de células imunes em animais C57Bl/6 e C57Bl/6-GFP infectados com *P.berghei* pBir:GFP

Após obtenção de esplenócitos de animais tratados anticorpos bloqueadores de receptores para FC (BD Biociência FC Block) e marcados com anti-CD4-PE (cada marcação foi feito em separado) conjugados foram incubados em meio com 5% de FCS com esplenócitos totais por 1 h e lavados 3 vezes com PBS e analisados por citometria como mostrado a seguir:

Figura 16 - Esquema de marcação para células para citometria de células CD4⁺.

Exemplo da estratégia seguida para análise de linfócitos CD4 no modelo de infecção usado

Esplenócitos totais foram analisados em *Side scatter* (granulosidade) e *Forward scatter* (tamanho) e separados na população referente a linfócitos. Essa população foi posteriormente analisada em populações marcadas por PE (vermelho) e em segundo plano para populações marcadas com anticorpos relativo as marcações utilizadas.

Os anticorpos para analisar a resposta imune desencadeada pela infecção seguiu sempre o isolamento de linfócitos CD4⁺ PerCP com marcação subsequente dos seguintes marcadores: CD62L PE-Cy7, CD49 PE, CD279 APC(PD-1), CD51 PE, CD233 PE (LAG-3). Os controles de cada marcação foram isotipos controles marcados com o mesmo fluorocromo relativo. Todos os anticorpos foram comprados da BD Bioscience e a captura foi feito em citômetro BD FACSVerse™ Flow Cytometer Systems da BD Bioscience e as análises feitas em FlowJo e Facs Suite.

3.22 Ensaio de inibição de reinvasão

Para o ensaio de inibição de reinvasão em *P. falciparum* foram usados anticorpos de animais imunizados com nanopartículas com DPPC dotados com PfRH5 GPI recombinante. Culturas de *P. falciparum* NF54 foram sincronizadas e incubadas com soros de animais pré-imunes (para anticorpos gerados com PfRH5 GPI rec) e com soros dos mesmos animais após imunização com nanopartículas. Todas as culturas foram crescidas a partir de 1% parasitemia e analisadas após 24 e

48 h. A redução obtida foi comparada em relação a controles (soros pré imunes ou imunizados com antígeno não relevante) sendo 100% do crescimento a parasitemia obtida com esses soros. Para verificar efeito dose-resposta a quantidade de anticorpos foi variada como mostrado em cada figura.

3.23 Obtenção de exossomos de *P. berghei* e *P. falciparum*

Para a obtenção de parasitas de *P. berghei* animais BALB/c foram infectados e após 5 dias tiveram seu sangue drenado por punção cardíaca. As células foram então colocadas em cultura por 16 h em meio RPMI 5% de FCS. A cultura foi então pelletada por centrifugação de 1.400 rpm por 10 min a 4° C. O sobrenadante foi então separado e sofreu nova centrifugação por 4.500 rpm por 30 min a 4° C. O sobrenadante foi então submetido a nova centrifugação em ultracentrifuga à 100.000 rpm por 6 horas. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado mais uma vez com PBS sofrendo nova centrifugação de 6 horas por 100.000 rpm em ultracentrifuga. Todos os exossomos foram usados à fresco após esse passo.

Para *P. falciparum* o mesmo processo foi feito a partir de culturas estáticas como já descrito. A cultura foi então pelletada por centrifugação de 1.400 rpm por 10 min a 4° C. O sobrenadante foi então separado e sofreu nova centrifugação por 4.500 rpm por 30 min a 4° C. O sobrenadante foi então submetido a nova centrifugação em ultracentrifuga à 100.000 rpm por 6 h. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado mais uma vez com PBS sofrendo nova centrifugação de 6 horas por 100.000 rpm em ultracentrifuga. Seguiu-se um imunoblot com as amostras obtidas.

4 RESULTADOS

4.1 Resultados do primeiro desenho experimental

4.1.1 Membranas de eritrócitos infectados com *P. berghei* e reconstituídas com GFP possuem antígenos de membrana e geram resposta humoral específica contra antígenos parasitários de membrana

Para averiguar a possível localização de antígenos variantes na superfície de eritrócitos infectados, imunizamos animais C57BL/6 com membranas de eritrócitos infectados enriquecidos (90% de parasitemia no mínimo) e reconstituímos essas membranas infectadas (também conhecidas como “ghosts”) com GFP em seu interior. A interiorização de GFP teve vários objetivos, dentre eles verificar resposta imunológica desenvolvida por esse modelo vacinal e uma vez que o parasita a ser usado na infecção experimental contém a expressão constitutiva de GFP queríamos averiguar o crescimento da resposta imune no decorrer da infecção.

Figura 17 - Ghost infectado purificado e resposta humoral contra GFP.

SDS-PAGE seguido de *Silver stain* de *ghosts* infectados e ELISA para validação de resposta humoral desenvolvida. Em A podemos observar o padrão de proteínas de trofozoítas-esquizontes (1) de eritrócitos infectados de C57BL/6 (2), e de eritrócitos vazios (3). Em B a resposta humoral desenvolvida e titulada por ELISA contra PbMSP1₁₉ e contra GFP, inicialmente presente no interior de eritrócitos reconstituídos, n=9 animais. A resposta contra MSP1₁₉ de *P.berghei* recombinante poderia evidenciar potencial contaminação de merozoítos na preparação de *ghosts* a partir de eritrócitos infectados. Animais receberam um protocolo de imunização contendo três doses de 14 em 14 dias e o desafio aconteceu após uma semana da última imunização. Animais controle (n= 9) receberam membrana de eritrócitos reconstituídos e os grupos experimentais receberam membranas de eritrócitos infectados reconstituídas com GFP em seu interior.

Notamos que as preparações de ghosts de eritrócitos infectados de *P. berghei* possuem antígenos de alto peso molecular tal como poderia se observar em *P. falciparum* (MOLL et al., 2008). Essas preparações contam também com outras proteínas de menor peso molecular, alguns presentes tanto em merozoítos quanto nos ghosts infectados e ausentes em eritrócitos normais. Analisamos ainda a presença de proteínas inseridas pelo parasita nos ghosts utilizados em comparação a ghosts de eritrócitos e em comparação com extratos de esquizontes (para verificar possíveis contaminações) por coloração de prata em géis de SDS-PAGE, Figura 17. Como esperado, proteínas de ghosts de eritrócitos não infectados permaneceram presentes nos ghosts de eritrócitos infectados, que ainda apresentaram a inserção de novas proteínas inseridas pelo parasita. Essas proteínas inseridas não foram detectadas nos extratos de trofozoítas-esquizontes, além disso, as bandas mais proeminentes em esquizontes não se mostraram presentes nos ghosts de eritrócitos infectados. Isso demonstra a relativa pureza das formulações em relação a contaminações de trofozoítos e demonstra ainda antígenos inseridos nas membranas pela infecção nos eritrócitos.

A resposta humoral desenvolvida atingiu valores acima de 10^5 em titulação de ELISA e sem desenvolver resposta contra antígenos presentes em trofozoítas-esquizontes, tal como evidenciado pela ausência de resposta contra MSP1₁₉ de *P. berghei* (intensidade de resposta idêntica a os soros controles usados). Excluímos ineficiência no reconhecimento da proteína recombinante de MSP1₁₉, pois ela já apresentou reatividade em outras publicações (FOTORAN et al., 2016). Os parasitas usados para gerar os ghosts de eritrócitos infectados foram *P. berghei* NK65 que expressam GFP constitutivamente.

4.1.2 Eritrócitos infectados são reconhecidos por anticorpos de animais imunizados com ghosts reconstituídos

Mesmo sendo alvo de vários estudos, ainda não se conhece atualmente quais proteínas no modelo murino são responsáveis pela citoadesão do parasita *P. berghei* em diversos tipos diferentes de tecidos (FONAGER et al., 2012,FRANKE-FAYARD et al., 2010). Com o objetivo de detectar proteínas e encontrar uma possível correlação com genes variantes *bir*, utilizamos a seguinte estratégia: retiramos membranas de eritrócitos infectados (ghosts) de formas maduras do parasita *P. berghei* NK65 purificados por coluna magnética. Após imunizações com ghosts reconstituídos prosseguimos com testes nos soros oriundos destes animais por citometria de fluxo, imunofluorescência e imunoblot. Também medimos a capacidade destes animais sobreviverem a infecção e controlarem o crescimento da parasitemia. O soro de animais imunizados foi capaz de reconhecer de maneira significativa eritrócitos infectados por proteínas no exterior de eritrócitos infectados. Uma auto-reatividade contra antígenos em eritrócitos não infectados pode ser observado de maneira basal como previamente documentado pela literatura (SPALTER et al., 1999).

O padrão de marcação por imunofluorescência deixa claro um reconhecimento circular com perfil de superfície em eritrócitos infectados. O padrão seguiu pequenos acúmulos de antígenos gerando pontos levemente espaçados. O padrão de um reconhecimento completo e superficial pode ser visto. Abaixo, dois exemplos permitem a visualização desses padrões. Como controle para o interior do citoplasma do parasita, as imunofluorescências foram feitas com parasitas expressando GFP que evidenciam fluorescência no interior de formas de trofozoítos e esquizontes. Para citometria de fluxo outra linhagem de *P. berghei* NK65 não expressando GFP foi usada permitindo o uso de um anticorpo secundário covalentemente conjugado a FITC.

Figura 18 - Reconhecimento de antígenos de membrana em eritrócitos infectados por antisoros gerados a partir de ghosts de hemácias infectadas

A

B

C

Em **A** temos a porcentagem de eritrócitos infectados reconhecidos em estágio de esquizonte de *P. berghei*. Para maior clareza nos dados, todos os soros de animais imunizados com membranas de eritrócitos (imunizados com membranas vazias) e imunizados com eritrócitos com membranas de células infectadas (imunizados com membrana infectada) foram quantificados e testados contra a possibilidade de reconhecimento diferencial de eritrócitos infectados (Teste T pareado, $n=9$ proveniente de dois experimentos distintos. *** significa $p<0.001$, respectivamente). Para uma análise meramente comparativa, soro de animais hiperimunes (infectados e tratados com cloroquina) contra *P. berghei* foram usados como *pool+* para o reconhecimento (Pool+). Os parasitas usados nesse experimento não foram os mesmos utilizados nos animais desafiados e por isso não produzem GFP como marcador em seu citoplasma. Em **B**, a imunofluorescência de eritrócitos infectados e incubados com soros de animais imunizados é mostrado. Em vermelho aparecem os anticorpos com anti-mouse Alexa 594, em azul usamos marcação de núcleo/DNA com DAPI e o parasita por ter GFP em seu citoplasma pode ser diferenciado no interior do eritrócito. Antissoros controle não demonstraram nenhum reconhecimento (dados não mostrados). Em **C** outro exemplo do reconhecimento em membranas. Animais receberam um protocolo de imunização contendo três doses separadas em intervalos de 14 dias e o desafio aconteceu uma semana após a última imunização.

4.1.3 Animais imunizados reconhecem membranas infectadas com um padrão de proteínas diferente do presente em trofozoítos e esquizontes intracelulares

Verificamos também o padrão de antígenos reconhecidos nos ghosts infectados e no extrato de esquizontes de *P. berghei* NK65 por Western Blot. Os padrões de bandas reconhecidas foram bem específicos e diferentes em ambos os casos. Proteínas que aparecem nas duas frações (intraparasitário e exportadas para a membrana do eritrócito) apresentaram tamanhos idênticos no reconhecimento dos anticorpos gerados. Em *ghosts* de eritrócitos infectados o padrão único de reconhecimento em algumas proteínas mostra antígenos diferencialmente reconhecidos indicando uma eficiente separação do material utilizado.

Figura 19 - Reconhecimento de antígenos de membrana de eritrócitos infectados e em extratos celulares de trofozoítos e esquizontes.

Western blot de membranas infectadas e extraídas de trofozoítos e merozoítos. A direita, é mostrado o imunoblot de material corrido em paralelo e corado com prata no lado esquerdo. No Imunoblot (canaletas 4-6), foi utilizado um *pool* de soros de animais imunizados. Em 1- extrato celular de trofozoito-esquizonte em *Silver staining*, 2-Membranas infectadas usadas nas imunizações, 3-Membranas de eritrócitos não infectados, 4- Extrato celular de trofozoito-esquizonte reconhecido por soro obtido após imunizações, 5-Membranas infectadas usadas nas imunizações, 6-Membrana de eritrócitos não infectados. Animais receberam três doses separadas por 14 dias entre elas e o desafio aconteceu após uma semana da última imunização.

4.1.4 Animais imunizados com membranas infectadas controlam parcialmente a parasitemia com parcial efeito na sobrevida dos imunizados

Após múltiplas infecções por *P. falciparum*, pacientes possuem imunidade parcial associado ao elevado reconhecimento de proteínas da hemácia infectada entre elas PfEMP1 (CHAN et al., 2012). Para averiguar se o mesmo efeito pode ser observado pela imunização com eritrócitos infectados, avaliamos a parasitemia, curva de sobrevida e efeitos em citoaderência. Os animais que receberam imunizações com membranas infectadas puderam controlar a parasitemia em momentos iniciais da infecção (dias 6, 10, 12 e 14) e embora não tenha sido estatisticamente significativo, foi possível observar uma aumento na sobrevida de 7 dias para 17,5 nos grupos controle (imunizados com membrana de eritrócitos não infectados) e imunizados com membranas de eritrócitos infectados, respectivamente (Fig. 20-21). No que diz respeito ao controle parasitário, animais infectados não apresentaram nenhuma mudança em relação a perdas de peso ou morbidade comparando com o grupo controle. Digno de nota, nenhum animal sucumbiu a infecção por efeitos relacionados a malária cerebral uma vez que a infecção com a linhagem *P.berghei* NK65 não possui essa característica.

Figura 20 - Controle parasitário de animais tratados com eritrócitos infectados reconstituídos e infectados com *P. berghei* NK65

Controle parasitário por ação de imunização com membranas infectadas. Parasitas infectados com *P. berghei* NK65 na dose de 5×10^5 controlam a parasitemia inicial nos dias 6 (*, $p < 0.05$), 10 (**, $p < 0.005$), 12 (*, $p < 0.05$) e 14 (*, $p < 0.05$). Parasitas perdem essa capacidade após o dia 15 com curvas na parasitemia se invertendo. Animais que mostraram parasitemia nula foram excluído após esse efeito ter sido observado (1 animal do grupo tratado com membrana infectada). Animais sem parasitemia mantiveram-se assim durante todo o estudo. O teste aplicado foi ANOVA dois fatores, com $n=9$ para cada grupo feitos em dois experimentos distintos. Animais receberam um protocolo de imunização contendo três doses separadas por 14 dias entre elas e o desafio aconteceu após uma semana da última imunização. Animais controle receberam membrana de eritrócitos reconstituídos e os grupos experimentais receberam membranas de eritrócitos infectados reconstituídos com GFP em seu interior.

Figura 21 - Sobrevida de animais tratados com membrana infectada reconstituída e infectados com *P. berghei* NK65

Curva de sobrevivência da infecção por *P. berghei* NK65. Animais imunizados com membranas de eritrócitos reconstituídos sem nenhum antígeno (controle) em seu interior e membrana de eritrócitos infectados com GFP em seu interior foram infectados com *P. berghei* NK65 expressando GFP. A análise de sobrevivência não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa, porém, um aumento na sobrevivência de animais tratados com membranas de eritrócitos infectados subiu para 17,5 em relação a sobrevivência de somente 7 dias para o grupo controle. Um único animal sobreviveu controlando totalmente a parasitemia. O experimento contou com $n=9$ para cada grupo, feito em dois experimentos distintos. Animais receberam um protocolo de imunização contendo três doses separadas por 14 dias entre elas e o desafio aconteceu uma semana após a última imunização.

4.1.6 A imunização com ghosts infectados reverte sequestro de formas maduras do parasita na corrente sanguínea

Formas maduras do parasita como trofozoítas tardios e esquizontes não são vistos na corrente sanguínea de infectados por *P. falciparum* (DAVID et al., 1983) ou *P. berghei* (FONAGER et al., 2012)(em menor intensidade do que o observado em *P. falciparum*). Isso se deve a presença de citoaderência parasitaria em vasos profundos. Embora *P. berghei* não mostra esse efeito de forma como visto em *P. falciparum*, a quantidade dessas formas tende a ser reduzida em sangue periférico de animais infectados, pois vários casos de sequestro em órgão em tecidos já foram vistos para *P. berghei* ANKA (CRAIG et al., 2012.,FONAGER et al., 2012,FRANKE-FAYARD et al., 2010; MORAES, DE et al., 2016; SERCUNDES et al., 2016). Para observar uma eventual diminuição do sequestro de hemácias infectadas durante a infecção, analisamos por citometria a presença de esquizontes no sangue periférico de animais imunizados com membranas de eritrócitos infectados e os respectivos controles.

Após imunização com membranas infectadas reconstituídas e posterior desafio animais que receberam *ghosts* de eritrócitos infectados demonstraram um aumento de formas maduras na corrente sanguínea após o quarto dia. Essas formas se mantiveram presentes em número muito maior que observado para o grupo controle e para infecções experimentais desse gênero. Por isso, observamos em paralelo o tipo de parasita circulante no sangue. As parasitemias sempre seguiram análise por incorporação de brometo de etídio, expressão de GFP e contagem em microscópio de luz convencional. Nessa análise uma maior intensidade média de fluorescência (IMF) de brometo de etídio demonstra formas mais maduras, tal como forma esquizogônica avançada que contém maior fluorescência, Figura 22.

Figura 22 - Dessequestramento de hemácias infectadas com esquizontes em animais imunizados com *ghosts* de hemácias infectadas (*P. berghei* NK65)

Aumento de formas maduras no sangue de animais tratados com membranas infectadas. Em **A** é demonstrado um painel que ilustra por citometria formas maduras de *P. berghei* NK65 na corrente sanguínea de animais imunizados (primeiro quadro) em relação ao grupo controle (segundo quadro) e para ilustrar outra infecção sem nenhum tipo de tratamento (terceiro quadro). Em **B** observamos a intensidade média de fluorescência (IMF) dos eritrócitos infectados circulantes nos dois grupos, a fluorescência é relativa a incorporação de DNA (valores referentes a média geométrica de fluorescência de todas as células infectadas) o que demonstra o estágio do maturação de cada célula circulante, sugerindo formas mais maduras e não seqüestradas nos animais imunizados com membranas infectadas. O efeito parece ser completamente perdido após o dia 15 de infecção. As estáticas usadas foram ANOVA dois fatores com $n=9$ para cada grupo feitos em dois experimentos distintos, demonstrando significância estatística nos dias 8,12 e 14(*** significa $p<0.001$).

O surgimento dessas formas de alta fluorescência só se mostram presentes quando o parasita tem o processo de citoaderência modificado. Assim, concluímos que a imunização com membranas infectadas foi capaz de reverter em parte a citoaderência de hemácias infectadas em tecidos profundos devolvendo formas maduras a circulação sanguínea. Esse efeito é completamente perdido no 15° dia de

infecção e as quantidades de formas percebidas se mantêm constante até a morte dos animais por hiperparasitemia.

4.1.7 Antígenos reconhecidos por imunização com ghosts infectados e imunoprecipitados não apresentam correlação com antígenos relacionados a famílias multigênicas bir

Para validar a correlação de antígenos variantes na superfície de eritrócitos decidimos identificar quais antígenos estariam sendo reconhecidos por animais imunizados com *ghosts* reconstituídos de eritrócitos infectados. Assumindo uma interação simples de receptor-ligante, anticorpos possivelmente reconheceriam também o antígeno responsável pelo sequestro.

Para isso, imunoprecipitamos proteínas usando o soro de animais imunizados contra membranas de hemácias infectadas, a fim de identificar por espectrometria de massas quais antígenos poderiam ser associados com o dessequestro observado. Após imunoprecipitação, 5 antígenos foram diferencialmente imunoprecipitados de forma visível por soros de animais imunizados com eritrócitos infectados. Após resgate desses antígenos de géis de poliacrilamida, os mesmos foram tripsinizados e submetidos a espectrometria de massas para identificação.

Figura 23 - Imunoprecipitação de antígenos diferencialmente reconhecidos por soro de animais imunizados com membranas reconstituídas.

Imunoprecipitação de material por anticorpos gerados após imunizações com eritrócitos infectados e reconstituídos seguido de identificação por espectrometria de massa. Após imunizar animais com eritrócitos infectados reconstituídos sem parasitas em seu interior, incubamos o soro pós-imune de animais com extratos de membranas infectadas, em 2 (15 μ l de pool de soro pós-imune com 250 μ g de extrato protéico). Como controle o soro pré-imune de animais foi incubado com extratos de membranas de mesma origem, visto em 3 (15 μ l de soro com 250 μ g de extrato protéico). Para certificação de que não se tratava de uma reação contra antígenos provenientes do soro, o soro pré-imune foi incubado em extratos de membranas não infectados visto em 1 (15 μ l de soro com 250 μ g de extrato protéico), e o soro sozinho foi corrido para excluir antígenos provenientes do soro em si (15 μ l de soro pool pré-imune +pós-imune). O produto corrido no gel contém os antígenos obtidos de purificação com proteína A/G-sepharose. Após reconhecimento de antígenos diferencialmente precipitados (marcados por setas na figura) os mesmos foram excisados do gel e submetido a espectrometria de massas em aparelhos Maldi-ToF (N=2 advindos de extratos distintos em duas infecções distintas). Embora não seja um antígeno diferencialmente reconhecido, por incapacidade de definição do gel, a banda referente ao antígeno 1 foi analisada por espectrometria. PM=Peso molecular 260 kDa, 140 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa

Tabela 1 - Antígenos diferencialmente reconhecidos por imunoprecipitação em espectrometria de massas.

Gene de referência Uniprot	Nome do Uniprot	Identificação pelo PlasmoDB por Blast
PB001172.02.0	Asparagine-rich antigen, putative	Asparagine-rich antigen, putative
PB000989.00.0	Dynein heavy chain, putative	Dynein heavy chain, putative
PB300582.00.0	Putative uncharacterized protein	NAD(P)H-dependent glutamate synthase, putative
PB300255.00.0	Putative uncharacterized protein	LCCL domain-containing protein (CCP2)

Antígenos reconhecidos por espectrometria de massas. Após tripsinização das amostras obtidas por imunoprecipitação as proteínas foram analisadas em Maldi-Tof e os padrões mínimos de abundância relativos a cada peptídeo gerado foi analisado contra o banco de dados subtraído do presente para proteínas de *Mus Musculus*, disponível no site www.uniprot.com. Após análise inicial a sequência de proteína referente ao gene encontrado foi analisada no site PlasmoDB para identificação dos antígenos referentes ao banco de dados de *P. berghei*. Essa análise revelou os antígenos mostrados na tabela acima.

Nenhuma das proteínas reconhecidas tem associação com genes *bir* (ao contrário de nossa suposição) sendo esperados proteínas no tamanho de 36-45 KDa. No entanto, o retorno de antígenos sabidamente associados a membrana tornam os dados confiáveis se somados aos critérios mínimos utilizados para identificação dos mesmos em espectrometria de massa.

Curiosamente alguns dos antígenos validados são antígenos que se relacionam com citoadesão corroborando nossos dados de reversão de citoaderência de formas maduras. Desse modo, assumimos que nossas imunizações foram capazes de realmente desenvolver respostas contra antígenos de membrana estando ao menos um deles, a proteína LCCL2, associada com a adesão de diversas moléculas (TREXLER et al., 2000). A LCCL2 pode estar associada com efeitos de citoadesão, especialmente por poder se ligar a fator de von Willebrand. Alguns modelos de citoadesão ligam esse fator a citoaderência em

malária relacionada também a CD36 (BRIDGES et al., 2010). O padrão de expressão dessa proteína em eritrócitos parece com os padrões observados por nossos soros em imunofluorescência (CARTER et al., 2008; SAEED et al., 2012).

Em resumo, os experimentos até aqui mostram que proteínas alheias solúveis como GFP podem ser incorporados em hemácias vazias (ou mesmo membrana de eritrócitos infectados) e após imunização desencadeiam uma razoável resposta humoral. Proteínas de *P. berghei* contidas em membranas de hemácias infectadas são imunogênicas e anticorpos contra estas levam ao dessequestro de esquizontes de *P. berghei*, entretanto não conseguem proteger os hospedeiros contra infecção letal embora haja um aumento de sobrevivência. Entre as proteínas reconhecidas possivelmente envolvidos na citoaderência foi identificada uma proteína com domínio LCCL, o qual está envolvida em adesão celular em outros organismos. Por outro lado, não identificamos nenhuma proteína *BIR* reconhecida e assim iniciamos experimentos moleculares para detectar algum papel de proteínas *BIR* na interação parasita-hospedeiro.

4.2 Aproximação para elucidar o papel de genes *bir* na interação entre parasita e hospedeiro

4.2.1 Evolução de genes *bir* em *Plasmodium berghei* demonstram 4 pequenos grupos conservados e um enorme grupo com extensa variação em sequências

Conforme estudos usando regiões 5' não traduzidas de genes variantes assumimos que a expressão de genes *bir* também é controlada pela região 5' não traduzida desses genes. Assim, foi necessário a obtenção de um promotor para posteriormente verificar se existe algum *crosstalk* que possa afetar múltiplos genes por semelhança na sequência primária. Nesse sentido a análise inicial feita a partir dos genes *bir* em *P. berghei* foi a busca por genes que representem a família de genes variantes dessa espécie. Dessa forma, acessamos todas as sequências presentes no plasmDB e de posse delas fizemos uma curadoria manual em genes reais e pseudogenes. De todos os genes usados, fizemos uma busca por identidade em banco de dados do tipo PFAM e conseguimos excluir 60 genes dos 180 presentes no banco de dados, seguiu-se um alinhamento da sequência proteica desses genes (Figura 24). A sequência e sua referente anotação no plasmDB seguem no Anexo I.

Figura 24 - Análise das seqüência de genes *bir* após exclusão manual de genes sem identidade com a família PIR ou pseudogenes

Árvore filogenética de genes variantes *bir* em *P. berghei*. Análise de *bootstrap* foi feito com genes curados manualmente dos genes variantes em *P. berghei* (de *PlasmoDB.org*). Cada ramo representa a relação de semelhança de sequências podendo ter ocorrido duplicação e posterior mutação dos genes relacionados.

A partir da árvore de distância genética podemos catalogar os ramos como famílias e observar quais deles possuem maior identidade entre si. A partir dessa homologia foi possível estabelecer famílias que possam representar maior similaridade e serem controlados por fatores em comum em suas regiões reguladoras como acontece com os genes *var* de *P. falciparum*. O agrupamento em família também permite a suposição de funções similares entre os genes. A divergência causada por mutações permite variação, porém, certo nível de similaridade em estruturas protéicas e possível similaridade na função das proteínas codificadas. A árvore com as famílias estabelecidas foi definida como apresentado abaixo e seguiu modelo próximo a estudos na literatura (LAWTON et al., 2012).

Figura 25 - Agrupamento de genes *bir* em subfamílias por similaridade em seqüência

Comparação de famílias entre os genes variantes *bir* de *P. berghei*. As seqüências que possuíram score de *bootstrap* superior ou igual 450 de 500 alinhamentos demonstram forte semelhança em suas seqüências e foram agrupadas em famílias de A a D.

Podemos notar valores de *bootstrap* altos para genes de origem similares, desse modo esses genes foram catalogados em famílias. Uma vez que buscamos um promotor que possa controlar e afetar a função de outros genes essa análise dá indícios de quais genes escolhermos. Optamos por um gene que pertence a uma família numerosa (família I). A escolha foi baseada em alinhamento (em ClustalX) de todas as regiões 5' UTR (*untranslated region*) dos genes *bir*. O gene pbanka_030020 demonstrou, na região 5', a seqüência mais coincidente a todas as outras regiões 5' de genes *bir*.

Figura 26 - Análise final de genes *bir* em famílias de origem evolutiva.

Organização final das famílias multigênicas de *P. berghei*. Por análise de bootstrap catalogamos as famílias por similaridade de seqüências em 4 famílias. Cada ramo que indica a origem de uma nova família está anotado por um círculo roxo na base que indica naquele ponto similaridade superior de 95% (ou coincidência de agrupamento em pelo menos 450 análises de 500 alinhamentos) entre os genes do ramo em relação a sua origem. As famílias são denotadas como família A (mais numerosa), família B, família C, família D (menos numerosa). O restante dos genes foram catalogados como I e não apresentam similaridade significativa em relação a mesma origem.

Outro fato importante é o número expressivo de genes *bir* de grande variabilidade I. Nesse ponto podemos sugerir que a pouca conservação desses genes permite múltiplas funções frente a constantes mutações observadas.

4.2.2 Clonagem e Amplificação de região 5' UTR de *P. berghei* e inserção em cromossomo artificial gerando o gene *pbir:GFP*

Usando os genes curados anteriormente fizemos um alinhamento de todas as regiões promotoras desses genes utilizando ClustalX. Dessa maneira foi possível obter regiões conservadas na posição 5' - 3' para o desenho de primers que pudessem amplificar completamente a região conservada e promotora desses genes. Escolhemos o gene *pbanka_030020* por possuir as características que precisávamos. Os critérios foram:

1. Ser transcrito e assim possivelmente expresso em fase sanguínea (verificado por padrão sanguíneo em Plasmo DB)
2. Possuir uma família de genes variantes expressiva associada à seu surgimento evolutivo, o que sugere importância, visto que a família se mostra conservada evolutivamente em termos de seqüências similares.
3. Possuir grande homologia dentro de sua família e parcial (verificada por alinhamento em Clustal X) homologia com membros de outras famílias.

Após sua amplificação, o fragmento contendo o 5' UTR de *pbanka_030020* foi analisado por restrição e confirmou-se a inserção dos sítios *Afl*III e *Xho*I em seus flancos. Interior a sequência promotora existe um sítio para *Hind*III liberando um fragmento de 900 bp e 600 bp. Não foi possível seu completo sequenciamento, pois regiões intergênicas de *P. berghei* possuem extensa repetição de Adeninas e Timidinas o que dificulta o sequenciamento comum dessas seqüências. O fragmento obtido foi clonado em plasmídeo pGT (derivado de pUC19 para clonagens A/T) e pGEM T easy (Promega) para obtermos o ganho dos sítios de *Bam*HI em posição 3' (provinda do vetor pGT). O promotor foi então clonado na posição do promotor de elongase presente no plasmídeo C-PAC (IWANAGA et al., 2010a) pelos sítios *Afl*III e *Bam*HI colocando sob ação desse promotor o gene GFP desse plasmídeo. O plasmídeo gerado recebeu o nome de C-PAC5'*pbir:GFP*.

Figura 27 - Clonagem para introdução de uma região 5' UTR *bir* controlando o gene da GFP em cromossomo artificial de *P. berghei*

Clonagem em C-PAC 5'UTR pBIR. O promotor *bir* do gene pbanka_030020 foi amplificado e clonado em pGT para adquirir o sítio relativo a BamHI. Após digestão com AfIII/BamHI o Promotor do gene elongase foi excisado e substituído pelo 5'UTR *bir* clonado pelos mesmos sítios. Em detalhe um gel típico da análise de restrição da inclusão da região 5'UTR de promotor *bir* cortados com AfIII e BamHI, na esquerda plasmídeo C-PAC5'pbir:GFP e a direita C-PAC (vetor original). Acima um desenho ilustrativo do cromossomo obtido. Note que o segmentos mostrados não estão em tamanhos proporcionais.

4.2.3 Região 5' UTR do gene pbanka_030020 de *P. berghei* apresenta atividade em *P. berghei* ANKA evidenciado pelo gene repórter GFP.

Nas primeira tentativas de obter uma linhagem que pudesse apresentar alta parasitemia e longos períodos de infecção tentamos a transfecção dos vetores em linhagem de *P. berghei* NK65. Embora na primeira tentativa tivéssemos conseguido o parasita *P. berghei* NK65/C-PAC não conseguimos parasitas com o *P. berghei* NK65/C-PAC pBir:GFP, mesmo após seis tentativas. Sem ser claro qual fator isso provocou, talvez a região clonada leva ou instabilidade da construção no parasita ou ao completo silenciamento de também o promotor de calmodulina, embora seja separado pelo centrômero (Figura 27). Outra explicação talvez seja que a cepa escolhida pode ser muito lenta para a seleção. Desse modo escolhemos a linhagem ANKA (mais agressiva e de rápida expansão) para verificar se o problema se

encontrava na construção. Logo na primeira tentativa conseguimos o parasita transfectante que apresentou notável expressão do gene repórter GFP na linhagem ANKA, indicando atividade como promotor do 5'UTR *bir*. Em paralelo, e como controle positivo, a mesma cepa foi selecionada com um plasmídeo cedido pelo professor Daniel Bargieri que possui GFP sob ação do forte promotor HSP86. Em comparação com HSP86 o promotor *bir* mostrou similar intensidade de fluorescência relativa logo após seleção do parasita por pirimetamina (Figura 28). A seleção desses parasitas foi feita em animais BALB/C, pois nesse modelo não existe o risco de ocorrerem síndromes de malária cerebral (BAGOT et al., 2002), quadro restrito a fundos genéticos C57BL/6 (BAGOT et al., 2002). Também foi possível quantificar com grande precisão a parasitemia da cepa transfectada observando somente o GFP (o controle foi a contagem de parasitemia por microscópio óptico convencional). Tomados em conjunto nossos dados demonstram funcionalidade do promotor escolhido.

Figura 28 - Expressão de gene *pBir:GFP* em cromossomo artificial logo após seleção em *P. berghei*

Funcionalidade do Promotor *bir* na construção C-PAC *bir:GFP*. Hemácias de camundongos BALB/C foram tomadas como controle e apresentaram fluorescência quase nula. No quadro central temos a intensidade de fluorescência (IF) apresentada por parasitas transfectados com plasmídeo onde GFP está sob controle de HSP86 (HSP86) e no último quadro a parasitemia por GFP de parasitas transfectados com C-PAC *pBir:GFP* tendo GFP sob ação do 5'UTR *bir* do gene *pbanka_030020*.

4.2.4 A seleção de parasitas por pirimetamina com C-PAC *pBir:GFP* gera parasitas sem o fenótipo de malária cerebral em *P. berghei* ANKA infectando animais C57BL/6 com expressão de GFP

O uso de um cromossomo artificial permite que se obtenha uma segregação natural das alterações genéticas contida em seu interior (IWANAGA et al., 2010b). Isso se mostra importante pois não se torna necessário a constante utilização de droga seletiva para manter a construção no parasita, ao contrário do que acontece com plasmídeos convencionais transfectados em *P. falciparum*, que são rapidamente perdidos sem pressão de drogas para mantê-los.

Por outro lado, parasitas de *P. berghei* ANKA apresentam um fenótipo muito agressivo quando infectam animais do tipo C57BL/6 conhecido como malária cerebral. No caso em que se pretende observar a modulação gênica de parasitas, longos períodos de infecção são mais adequados para observar possíveis fenótipos mais sutis. Por isso o adequado seria uma linhagem que não apresentasse esse fenótipo. Após seleção em fundo genético de BALB/C (na presença de pirimetamina) a linhagem obtida foi propagada em animais C57BL/6 para se verificar se o processo de seleção poderia alterar o fenótipo de malária cerebral.

Nesses animais não usamos pirimetamina, permitindo segregação livre e característica do cromossomo artificial usado. Como se pode observar nos gráficos abaixo, Figura 29, parasitas infectados com nossa linhagem não desenvolveram sinais de malária cerebral (que leva a morte de animais em torno do sétimo dia). Esse fenótipo é quase sempre acompanhado de outros sintomas associados à morbidade de animais sob infecção. Em animais selecionados com C-PAC *pbir:GFP* não foi possível observar nenhum sinal similar aos desenvolvidos por animais infectados com *P. berghei* ANKA (todos morreram mostrando morbidade relativa a malária cerebral). Pelo menos até onde pode se observar, as parasitemias puderam ser bem similares em análises de citometria e contagem ótica no que diz respeito até o décimo dia de infecção. Após esse período uma ligeira diferença tem início (Figura 30).

Não acreditamos que essa diferença seja em função da segregação desigual do cromossomo artificial, pois isso iria contradir dados extensivamente publicados pelos autores que desenvolveram o cromossomo artificial (IWANAGA et al., 2010a).

Figura 29 - Expressão de gene *pBir:GFP* em cromossomo artificial logo após seleção em *P. berghei*

Reversão do fenótipo letal conhecido como malária cerebral. Em A é observado curva de parasitemia obtida por citometria de fluxo e por contagem em microscópio ótico (linhas verde) de *P. berghei* ANKA transfectado com C-PAC *pBir:GFP* (linha turquesa) e a parasitemia de *P. berghei* ANKA por microscopia ótica convencional (linha preta). Não houve significância estatística referente aos dados obtidos ($n=5$ por grupo), no entanto, após o dia 10 as contagens de citometria começam a perder a acurácia. Em B a curva de sobrevida dos animais infectados com *P. berghei* ANKA /C-PAC *pBir:GFP* (linha verde) e com *P. berghei* ANKA (linha preta). O experimento foi terminado no dia 14. ($n=5$ sendo estatisticamente relevante com $p<0.05$).

Dois possibilidades surgem pra explicar o efeito de reversão no fenótipo e na letalidade encontrada. É possível que a inserção de um promotor *bir* adicional possa ter afetado a expressão de genes que permitem o fenótipo de malária cerebral – assumindo que o 5'UTR ativo *in trans* causa o silenciamento de um hipotético gene *bir* associado a malária cerebral. Em todos os animais usados nesse estudo nenhuma infecção em animais C57BL/6 pelo parasita transfectado com C-PAC 5'UTR*pBir:GFP* demonstrou sinais de malária cerebral. Outra explicação que pode explicar os dados é que a transfecção e seleção por pirimetamina tenha selecionado

ao acaso uma subpopulação parasitária que não apresente o fenótipo de malária cerebral.

Embora não esteja claro qual das duas abordagens levou aos dados apresentados, conclui-se que um parasita que mantenha múltiplos ciclos efetivos em animais C57BL/6 com o gene GFP sob controle de *bir* 5'UTR tenha sido gerado e apresente ao menos inicialmente (logo após seleção por pirimetamina) expressão de GFP coincidente com as reais parasitemias obtidas por contagem de microscopia convencional.

4.2.5 Parasitas P. berghei ANKA/C-PAC pbir:GFP apresentam maior parasitemia em animais que expressam GFP sem modificar a mortalidade da infecção causada

Uma vez que a linhagem obtida por transfecção poderia ser usada em animais de fundo genético C57BL/6 sem causar malária cerebral, seguimos com experimentos que demonstrassem o uso diferencial da construção 5'UTR *pbir:GFP* por esses parasitas em diferentes contextos imunes do hospedeiro. Para neutralizar efeitos causados por sucessivas passagens em mesmo fundo genético decidimos por seguir com passagens sucessivas em animais de fundo genético não relacionado ao experimental. Para isso executamos três sucessivas passagens da linhagem *P. berghei* ANKA 5'*pbir:GFP* em animais BALB/c. Após essas passagens a mesma quantidade de 5×10^5 parasitas foi inoculada em dois diferentes fundos genéticos. Usamos animais C57BL/6 e C57BL/6 transgênicos para expressão de GFP em células nucleadas (eritrócitos dessa linhagem não possuem a expressão do gene GFP).

A proposta desse modelo é que animais GFP⁺ tem completa tolerância central a esse antígeno. Dessa forma abre-se a pergunta: parasitas que infectem animais GFP⁺ poderiam ser selecionados a manter a expressão diferencial de GFP pelo fundo genético ao qual infectam? Em caso positivo, que efeitos e como essa seleção poderia favorecer parasita e afetar o hospedeiro? Como efeito observamos que parasitas que infectam o fundo genético que possua GFP gera picos de parasitemias mais acentuados demonstrado pelo aumento no crescimento parasitário (evidentes nos dias de infecção 10,12,18 e 24 com inversão no dia 20) em relação a animais que cresçam em animais sem a expressão desse gene (GFP, Figura 30). Curiosamente essa expressão não afeta o a letalidade da doença, representada pelas curvas de sobrevida de ambos os grupos (n=12 em cada grupo).

Figura 30 - Curvas de parasitemia e letalidade desenvolvida por animais C57BL/6 e animais C57BL/6 GFP⁺ desenvolvidas por animais infectados com *P. berghei* ANKA C-PAC 5'UTR pBir:GFP

Parasitemia e letalidade da infecção de *P. berghei* ANKA C-PAC 5'UTRpBir:GFP em animais C57BL/6 e C57BL/6 GFP⁺. Animais C57BL/6 e animais C57BL/6 transgênicos para expressar GFP (C57BL/6 GFP⁺) em células nucleadas (mas não eritrócitos) foram infectados com a linhagem *P. berghei* C-PAC 5' UTRpBir:GFP vinda de passagens sucessivas em animais BALB/c na quantidade de 5×10^5 parasitas por animal. Em A observamos o crescimento parasitário desses parasitas em diferentes contextos genéticos do hospedeiro. Em negro, a curva de infecção de C57BL/6 infectado com *P.berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP e em verde a curva referente a animais C57BL/6 GFP⁺ infectado com *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP, n=12 por grupo. As análises foram feitas em ANOVA dois fatores e a significância estatística é referida como *, **, *** sendo $p < 0.05$, $p < 0.005$, $p < 0.001$, respectivamente. Em B observamos as curvas de sobrevivência, ambos os grupos obtiveram sobrevida média de 15,5 dias sem demonstrar significância estatística notável.

Uma vez que todos os animais infectados receberam igual carga parasitaria da mesma alíquota é notável que frente ao fundo genético que possuiu a expressão de GFP os parasitas obtiveram notável melhora no desenvolvimento parasitário. Esse desenvolvimento parasitário não se refletiu em um aumento da letalidade desenvolvida pelos grupos tratados: os grupos obtiveram a mesma sobrevida média

de 15,5 dias. Tomados em conjunto esses dados demonstram que frente ao hospedeiro, parasitas com GFP sob a ação de uma região 5' UTR passível de variação crescem melhor frente a um fundo genético que possa ser semelhante ao gene variante introduzido nessa linhagem (*P.berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRp*Bir*:GFP).

4.2.6 O crescimento diferencial observado em animais C57BL/6-GFP não é acompanhado de agravamento em sinais fisiopatológicos como anemia ou perda de peso

Embora as curvas de sobrevida no experimento não tenham se mostrado diferentes, a maior parasitemia observada em animais C57BL/6 GFP⁺ poderia gerar fatores patofisiológico significativos graves como agravamento da anemia de animais infectados ou caquexia exarcebada pela infecção. Por isso comparamos esses sinais entre os grupos infectados e não observamos sinais significativos em diferença a esses padrões analisados (Figura 31).

Figura 31 - Hematócrito e perda de peso no curso da infecção.

Hematócrito e perda de peso final apresentado na morte dos infectados. Em A analisamos o hematócrito de animais infectados por parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP sendo em preto dados relativos a animais C57BL/6 e em verde C57BL/6 GFP⁺ nos dias 2, 6, 14, 16, 18, 20, 22, quantificando o número de eritrócitos por μ l de sangue por citometria. Inicialmente cada grupo conteve n=12 e não apresentaram significância estatística em testes T pareados. Em B analisamos a perda de peso relativo dos animais infectados por parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP sendo em preto dados relativos a animais C57BL/6 e em verde C57BL/6 GFP⁺ frente ao primeiro dia de infecção e o peso apresentado no dia de sua morte. Cada grupo contou com n=12 e nenhuma significância estatística pode ser observada em testes T pareados.

A análise do peso relativo final apresentado por cada animal no dia de sua morte e o hematócrito relativo nos dias 2, 6, 14, 18, 20 e 22 das infecções não permite concluir que houve agravamento nos sinais patofisiológicos da doença. Isso sugere que o curso da doença foi similar em ambos os casos porém com maior intensidade parasitaria em animais C57BL/6 GFP⁺ sem agravamento da doença. Esses dados apontam para uma evolução da infecção diferente sem potencial efeitos nocivos ao hospedeiro que diferem de outras linhagens que não expressam GFP de maneira constitutiva em células nucleadas (Figura 31).

4.2.7 Parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpbir:GFP apresentam expressão diferencial de GFP em função do fundo genético do hospedeiro

Seguimos com o racional de identificar se os efeitos no crescimento parasitário foi causado pela expressão diferencial da região 5'UTRpBir levando a conseqüente expressão e tradução diferencial de GFP por parasitas em relação ao fundo genético que infectam. Para isso, animais C57BL/6 e C57BL/6-GFP infectados com *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP tiveram amostras de parasitas tomadas de seu sangue no dia 10 de infecção.

Depois de retirada dos parasitas uma alíquota seguiu para passagem em animais BALB/c por 3-5 dias (parasitemia média de 3%) e então analisamos a

fluorescência de GFP por esses parasitas. A passagem em animais BALB/c foi necessário para evitar contaminação de fluorescência causada pelo fundo genético alterado de animais C57BL/6 GFP⁺. Mesmo não apresentando GFP em eritrócitos, esses animais apresentam GFP circulante de outras células que inviabilizam a análise da expressão por fluorescência de parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRp*Bir*:GFP retirados diretamente da corrente sanguínea dos mesmos.

Uma segunda alíquota foi utilizada para análise da expressão de GFP por Western Blot. Para essa análise células vermelhas foram solubilizadas por saponina sobrando somente extratos parasitários resistentes a esse processo. Após tripla lavagem em meio com saponina essas amostras foram submetidas a Western Blot e analisadas por anticorpos anti-GFP e anti-Myosina de *P. berghei* (Figura 33).

Figura 32 - Expressão de GFP diferencial por parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRp*Bir*:GFP por fluorescência frente a infecção de diferentes fundos genéticos de hospedeiros C57BL/6 e C57BL/6 GFP⁺

Padrão da expressão de GFP por parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRp*Bir*:GFP em hospedeiros que expressam ou não GFP. Animais do tipo C57BL/6 e C57BL/6 GFP⁺ infectados por *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRp*Bir*:GFP tiveram uma alíquota de sangue infectado drenado e passado para animais do tipo BALB/c para diminuir contaminação residual de GFP presente no hospedeiro. Parasitas cresceram em animais BALB/c por 3-5 dias (parasitemia média de 3%) e então analisamos a fluorescência de GFP por esses parasitas. Em **A**, a expressão de GFP por parasitas provenientes de animais C57BL/6 e em **B** a fluorescência apresentada por parasitas provenientes de animais C57BL/6 GFP⁺. Em ambos os grupos tivemos N=3. Para melhor visualização das formas e estágios de desenvolvimento parasitário parasitas foram marcados com DAPI que realça o DNA nuclear.

Figura 33 - Expressão de GFP diferencial por parasitas *P.berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP por Western Blot durante infecção de diferentes fundos genéticos de hospedeiros C57BL/6 e C57BL/6 GFP⁺

Expressão de GFP por Western Blot em diferentes fundos genéticos de hospedeiros C57BL/6 e C57BL/6 GFP⁺ e quantificações relativas. Em **A** células vermelhas infectadas foram lavadas com saponina a 0.1% por três vezes e os pellets parasitários foram resolvidos por SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose. Após transferência anticorpos monoclonais anti-GFP(1:300) e policlonais anti-Miosina(1:1000) de *P. berghei* foram usados para revelar a presença e quantificar a produção de GFP em relação a controle endógeno de Miosina. A esquerda dois exemplos (n=5) da expressão de GFP por parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP vindos da infecção em animais C57BL/6 GFP⁺ e a direita a expressão de dois (n=5) da expressão de GFP por parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP. Em **B** observamos quantificação por densitometria ótica das amostras de Western Blot relativas a expressão de GFP/controlado endógeno de Miosina. O teste contou com n=5 em cada grupo e se mostrou significância estatística em teste T pareado com p<0.05. Em **C** observamos a expressão de GFP de parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP provenientes de infecção em C57BL/6 GFP⁺ em relação a expressão *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP provenientes de infecção em C57BL/6. A análise foi feita em uma relação direta da fluorescência de células infectadas e contou com n=3. Para essa análise parasitas em estágio de desenvolvimento parasitário similar foram usados. Todas as análises por densitometria ótica foram feitas no *software* ImageJ e computados com valores dados por esse programa em relação a quantidade de Pixels por área.

Nossos dados apontam que além de desenvolver uma maior parasitemia quando infecta animais C57BL/6 GFP⁺, parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP expressam mais GFP do que mesma linhagem infectando

animais C57BL/6, Figura 32 e 33. Isso demonstra que um processo integrado entre parasita e hospedeiro teve início, resultando em maior carga parasitária e maior expressão de GFP por esses parasitas. Esses dados também mostram que a atividade transcricional da região 5'UTR em C-PAC p*Bir*:GFP é passível de modulação por aspectos presentes no hospedeiro. Isso fica claro, pois as mesmas alíquotas foram usadas nas infecções de ambos os grupos. Ainda assim, a presença de um único gene diferencial no hospedeiro desencadeou a modulação na expressão de GFP por parasitas. Essa expressão se mostra intensa no parasita, apresentando (por microscopia) padrão difuso em toda a célula infectada incluindo o citoplasma de eritrócitos infectados. No entanto, a expressão de GFP não se mostrou homogênea em todas as células (variando em intensidade) nas amostras testadas, o que indica que apenas uma porção dos parasitas parece expressar GFP em acórdância com o hospedeiro.

*4.2.8 Parasitas P. berghei ANKA/C-PAC 5'UTRp*Bir*:GFP apresentam subpopulações distintas durante a infecção em animais C57BL/6 e animais C57BL/6 GFP⁺*

Após indícios de que a expressão de GFP não se mostra homogênea em todos os parasitas, variando em intensidade percebida por microscopia de fluorescência, investigamos se todos os parasitas expressam GFP de maneira consistente como anteriormente visto logo após seleção por uso de pirimetamina.

Para isso, analisamos a expressão de GFP em amostras dos dias 2, 6, 14, 18, 20 e 22 das infecções de ambos os grupos e comparamos sua expressão relativa em cada contexto de infecção. Parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRp*Bir*:GFP que infectavam animais C57BL/6 GFP⁺ apresentaram maior expressão em porcentagem de células infectadas que parasitas que infectavam animais C57BL/6 (Figura 34 A). Isso deixa claro um favorecimento das populações parasitaria que expressam GFP comparando com a infecção observada em animais C57BL/6. Porém, em ambos os casos a expressão de GFP não coincidiu com a parasitemia obtida por microscopia ótica convencional (Figura 34,B). Uma vez que essa era uma característica observada após seleção por pirimetamina, isso demonstra que inicialmente o 5'UTR *in trans* é transcionalmente ativo, enquanto no decorrer da infecção diferentes populações parasitárias com expressão de GFP variegada se estabeleceram. Aparentemente, em animais C57BL/6 GFP⁺ essa população foi favorecida no processo de infecção se tornando maior relativamente

ao encontrado em animais C57BL/6 sem ser a população majoritária no processo infectivo.

Figura 34 - Expressão de GFP diferencial por parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRp*Bir*:GFP por Western Blot após infecção de hospedeiros C57BL/6 e C57BL/6 GFP⁺

Expressão de GFP em subpopulação durante a infecção por parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRp*Bir*:GFP em diferentes hospedeiros. Células de animais C57BL/6 GFP⁺ não apresentam núcleo e por isso não possuem GFP em seu interior podendo evidenciar a população parasitaria que apresenta GFP. Em **A** foi quantificado a população de parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRp*Bir*:GFP que expressão GFP em termos de porcentagem de eritrócitos infectados nos dias 2, 6, 14, 16, 18, 20. Em preto é mostrada a população GFP⁺ de parasitas infectando animais C57BL/6 e em verde a quantidade de parasitas GFP⁺ em parasitas infectando animais C57BL/6 GFP⁺. Os testes estatísticos seguiram com n=12 variando pela quantidade de animais vivos até o momento da análise. Foi usado teste T pareado entre cada grupo com significância estatística de *= $p < 0.05$, **= $p < 0.005$. Em **B** observamos que em ambos os casos a parasitemia dos animais não mais coincidia com a contagem óptica convencional. Em linhas contínuas pode-se observar a contagem óptica obtida por grupos de animais C57BL/6 (linha preta) e por animais C57BL/6 GFP⁺ (linha verde). A contagem obtida por citometria de fluxo é mostrada em barras de porcentagem abaixo das medições ópticas, em preto animais C57BL/6 e em verde animais C57BL/6 GFP⁺.

Os dados demonstram que após passagem sucessiva em animais BALB/c e infecção sem adição de droga, os parasitas perdem de maneira diferencial a expressão de GFP, mantendo apenas uma subpopulação expressando a construção 5' UTRp*Bir*:GFP.

Uma vez que os cromossomos artificiais se segregam de maneira contínua sem a necessidade de seleção e dificilmente havendo mais de uma cópia por genoma não é esperado que surjam concatâmeros (como ocorre com plasmídeos comuns em *P. falciparum* (HEINBERG et al., 2013), que possam justificar o aumento de GFP. Entretanto, uma pequena população parece manter a expressão de GFP quando parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRp*Bir*:GFP infectam animais

C57BL/6 GFP⁺ de maneira diferencial ao que se mostra em C57BL/6, havendo aumento de parasitas GFP-positivos quando o hospedeiro mantém possui a mesma expressão em células nucleadas.

É evidente que a expressão de GFP não se mostrou continua em todos os parasitas, porém se manteve em alguns parasitas, possuindo um efeito mais intenso nas infecções de C57BL/6 GFP⁺. Caso houvesse problema na segregação dos cromossomos artificiais, isso poderia explicar essa diferença (embora não seja o esperado para a técnica utilizada)(IWANAGA et al., 2010b). Por isso, testamos se a quantidade de C-PAC *pBir:GFP* estava alterada nos dois grupos experimentais de camundongos.

4.2.9 A segregação de cromossomos artificiais 5'UTRpBir:GFP não sofreu alteração nas populações estudadas

Verificamos a possibilidade de diferenças na segregação dos cromossomos nos parasitas transgênicos gerados. A ausência de diferenças neste quesito aponta para a expressão diferencial de GFP a partir do cromossomo artificial em populações parasitárias em diferentes hospedeiros que expressam GFP ou não.

Para averiguar se houve alguma diferença na segregação de cromossomos, prosseguimos com a extração de DNA genômico dos parasitas de camundongos C57BL/6 ou C57BL/6-GFP⁺. Inicialmente fizemos o resgate de cromossomos transfectados e também a quantificação desses plasmídeos normalizada pela quantidade de DNA genômico aplicado em cada experimento.

Não observamos qualquer segregação diferencial do cromossomo usado (n=6 por grupo). Ao contrario, parasitas provenientes de animais C57BL/6 demonstraram discreto número de cópias a mais que os parasitas C57BL/6 GFP⁺. Estes dados corroboram com dados da literatura (no que diz respeito a propagação do cromossomo artificial e ausência de concatâmeros (IWANAGA et al., 2010a)) e apontam para uma expressão diferencial de GFP causada pela região 5' UTR *pBir* utilizada na construção 5'UTR *pBir:GFP*.

Figura 35 - Segregação dos de cromossomo artificial nas linhagens geradas.

Número de colônias resgatadas e cópias de cromossomo artificial por genoma parasitário. Em **A**, o gDNA de *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP providos de animais C57BL/6 (em branco) e de C57BL/6 GFP⁺ (em verde) foram utilizados para resgate do cromossomo artificial usado na geração de *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP em células DH10B e o número de colônias foi contado sendo normalizado pela quantidade de μg de DNA usado para transformação. Em **B** gDNA de *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP foi utilizado para quantificar o número de cópias do cromossomo artificial, por PCR quantitativo medido por curva de diluição do cromossomo e sendo normalizado em relação ao número de cópias do genoma de *P. berghei*. Assumimos um tamanho do genoma de 20Mbp. Nenhuma diferença estatística pôde ser obtida. (n=7 para cada grupo). Os primers usados para essa quantificação foram os mesmos mostrados em Material e Métodos.

O fato de parasitas providos de animais C57BL/6 GFP⁺ não possuírem número de cromossomos artificiais superior ao provindo de animais C57BL/6 (na verdade o que se mostra é o contrário, Figura 35) suporta a idéia de que a alteração obtida na expressão de GFP se deve a alteração na expressão do gene estudado. Isso leva a pergunta se essa região 5' UTR poderia ser diferencialmente alterada na sua atividade transcricional pelo parasita para uma rápida adaptação ao hospedeiro.

4.2.10 A expressão aumentada em parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP tende a se correlacionar modificações locais de cromatina

Genes *rif* ou *var* de *P. falciparum* são modulados na sua atividade transcricional em função de modificações de cromatina que se localizam em nucleossomos associados a 5'UTR dos respectivos (LOPEZ-RUBIO 2008). Para testar se modificações de cromatina também influem na transcrição diferencial do gene GFP em parasitas transgênicos com C-PAC pBir:GFP, seguimos com imunoprecipitação de cromatina de parasitas provenientes de diferentes fundos gênicos e submetemos essa imunoprecipitação a análises de PCR quantitativo com primers específicos a região 5'UTR utilizada com o "forward primer" localizado na

região 5' UTR e o primer reverso alocado após a ORF do gene GFP para inviabilizar amplificação inespecífica com promotores de outros genes variantes *bir* ou alvos com GFP.

Figura 36 - Imunoprecipitação de cromatina de parasitas para monitorar modificações de H3K9 na região 5' UTR *pBir*

Análise-ChIP de região 5' UTR *pBir*. As imunoprecipitações de cromatina contaram com três anticorpos monoclonais distintos sendo eles um isotipo controle, α -H3K9Me1/3 e α - H3 Acetilada. Após imunoprecipitação e extração por fenol/clorofórmio apostaras de todos os anticorpos seguiram para análise por PCR em tempo real, sendo utilizado como controle de amplificasse sítios inespecíficos o material obtido por isotipo controle. Em A, análise individual de cada modificação epigenética testada(n=4 para cada grupo), sendo a caixa preta vazia e caixa preta cheia referente a material obtido de parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRp*Bir*:GFP provenientes de animais C57BL/6. As amostras em caixa vazia de linhas verdes e verde preenchida são relacionadas a parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRp*Bir*:GFP provenientes de animais C57BL/6 GFP⁺. *. Em B, observamos a reação de Acetilação/ metilação(medidas do grafico A) de histonas de grupos C57BL/6 (média=1,33) em preto e C57BL/6 GFP⁺ em verde (média =2,52 com n=4 por cada grupo).

Em *P. falciparum* a relação positiva de correlação com região Histona 3, lisina 9 acetilada na cromatina na proximidade de promotores tem se mostrado evidência de regulação na expressão positiva de genes da família *rif* (SALCEDO-AMAYA et al., 2009). Ao contrário, uma maior metilação (trimetilação) na posição H3K9 tem se mostrado um grande marcador de silenciamento transcricional, Figura 36. Embora os mesmos dados não existam para modelos murinos, podemos assumir que efeitos gerais similares devem existir uma vez que a região promotora de genes PIR contém considerável conservação em algumas seqüências e motivos (FONAGER et al., 2007). Tomados em conjuntos nossos dados demonstram que parasitas provenientes de animais C57BL/6 têm uma relação de modificações epigenéticas próxima de 1,33 enquanto para parasitas provenientes de C57BL/6 GFP⁺ essa

relação sob para 2,53. Isso demonstra que a acetilação das histonas é quase 2 vezes maior em parasitas vindos de fundo genético C57BL/6 GFP⁺, fato que coincidiu com os efeitos observados na expressão de GFP por parasitas quando infectando animais GFP⁺.

Esses dados demonstram também uma rápida adaptação do parasita frente a seu hospedeiro, com aumento na expressão de GFP gerando efeitos favoráveis no seu crescimento demonstrado por maior parasitemia. É novo e único que pela primeira vez um mecanismo molecular como a regulação positiva ou negativa de um gene variante pôde ser alterado em um contexto infectivo restrito como a presença de um único gene diferencial no hospedeiro.

4.2.11 A região 5' UTR pbir permite transcrição transiente em P. falciparum e posteriormente é silenciado

Testamos a hipótese de que os promotores de genes *bir* possuem atividade em *P. falciparum*, por haverem mecanismos possivelmente conservado de controle entre as duas espécies. Desse modo o 5'UTR *bir* foi clonado na mesma posição de um promotor do fator de elongação em um vetor presente em nosso laboratório denominado pEFLUC (AZEVEDO.,2012) gerando dessa forma o plasmídeo pfBirpLUC. Esse plasmídeo é usado constantemente em nosso laboratório como controle positivo para expressão de Luciferase em *P. falciparum* e possui gene de resistência DHFR humano o que permite a seleção de parasitas por adição de pirimetamina na cultura de *P. falciparum*. Um esquema ilustrativo da clonagem segue abaixo, com resultados obtidos na Figura 38.

Figura 37 - Subclonagem de 5'UTR *bir* para transfecção e teste em *P. falciparum*

Substituição do promotor EF por *bir* em *pEFLuc*. Para analisarmos a possível atividade do promotor *bir* em *P. falciparum* clonamos via *AfIII* /*XhoI* o promotor *bir* excisando o promotor de *Elongase* sob os mesmos sítios de restrição.

De maneira transiente testamos se o 5'UTR de *P. berghei* poderia funcionar como promotor em *P. falciparum*. Um sucesso nesse teste inicial pode evidenciar a existência de potenciais reguladores homólogos entre as duas espécies de *Plasmodium*. Nossos dados apontam que o 5'UTR *bir* está ativo em *P. falciparum* (Figura 38). Uma vez que existe a possibilidade de não cromatinização completa e coincidente o não silenciamento da região novos parasitas foram transfectados de maneira estável para alcançar uma expressão mais robusta. Esse experimento também permitirá evidenciar se o promotor *bir* pode vir a sofrer silenciamento, talvez por mecanismos conservados entre *P. berghei* e *P. falciparum*.

Para isso transfectamos o plasmídeo *pBirLuciferaseGFP* de maneira estável na linhagem NF54 de *P. falciparum*. Esperávamos ser possível analisar em qual ponto do ciclo de vida parasitário o promotor se mostrava mais ativo. Para tanto sincronizamos todos os pontos do ciclo na linhagem NF54:*pBirLuciferase*. Curiosamente, em nenhum ponto foi possível medir a atividade da enzima luciferase. Levando em consideração que de forma transiente o parasita apresentava atividade e expressão de luciferase quando recém transfectado, a conclusão primária é de que após um período de acomodação o 5'UTR *bir* de *P. berghei* foi completamente

silenciado (Figura 38). Isso sugere controle transcricional cruzado entre ambos os parasitas no que se refere as regiões 5' UTR dos genes testados.

Figura 38 - Expressão transiente da região 5'UTR *bir* em *P. falciparum* e silenciamento após seleção estável

Transfecção transiente de promotores de *P. berghei* em *P. falciparum* e posterior silenciamento. Em A culturas de *P. falciparum* foram sincronizadas e no estágio de anel transfectadas com os plasmídeos pEF-LUC (promotor de elongase controlando o gene repórter luciferase) e pBIRpLuc (promotor de elongase controlando o gene repórter luciferase) os dados foram normalizados pela quantidade de proteínas usadas em cada teste. (Experimento em triplicata experimental com três diferentes culturas). Em B o mesmo experimento feito com formas selecionadas por 2,5 nM WR99210 de *P. falciparum*.

Estes dados em específico são muito importantes para a discussão dessa tese. Assim como em *P. berghei*, em *P. falciparum* a recente seleção de parasitas por transfecção transiente possibilitou a expressão de luciferase com similar efeito regulatório em seleção estável. Tal como observamos em *P. berghei* a expressão do gene sob ação desse promotor pode ser quase que totalmente silenciada se mantendo expressa somente quando vantajoso na relação parasita/hospedeiro. A expressão de luciferase em nada favoreceria linhagens de NF54 crescendo em cultura, o que torna aceitável seu silenciamento. Assumimos ainda, que esses dados mostram um controle pronunciado na transcrição de genes variantes por *P. falciparum* (esperado pela literatura no que se refere a genes *var* (VOSS et al., 2006).

4.2.12 A resposta desenvolvida em hospedeiro pela manutenção de subpopulações expressando GFP gera extensos marcadores de exaustão imune e aumento na produção de células T regulatórias

A manutenção de uma subpopulação expressando GFP por parte de parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpbir:GFP gera aumento no crescimento parasitário sem agravamento da doença em seu hospedeiro C57BL/6 GFP⁺. Para elucidar quais fatores possuem um papel neste fenômeno, observamos o curso da resposta imune em células do tipo T em diferentes contextos infectivos: C57BL/6 infectado com *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpbir:GFP e C57BL/6 GFP⁺ infectado com *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpbir:GFP. Seguimos para isso com duas análises.

O baço de animais que morreram em experimento de crescimento parasitário e curva de sobrevivência no curso de infecção foram retirados e pesados. Após pesagem, a quantificação relativa a massa corporal foi avaliada demonstrando diminuição significativa do crescimento desse órgão em animais C57BL/6 GFP⁺ em relação a animais C57BL/6. Animais que morreram por hiperparasitemia em animais C57BL/6 GFP⁺ não apresentam esplenomegalia desse órgão, demonstrando menos resposta pró-inflamatória e maior regulação imune nesses processos. Isso aponta para um forte efeito de alteração/regulação imune desencadeado pela infecção com *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpbir:GFP expressando GFP de maneira diferencial no hospedeiro infectado.

Figura 39 - Aumento de baço diferencial de animais C57BL/6 e C57BL/6 GFP⁺ infectados por *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpbir:GFP

Esplenomegalia e alterações em baço de animais C57BL/6 e C57BL/6 GFP⁺ infectados por *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpbir:GFP. Em A o baço de animal C57BL/6 GFP⁺ em verde demonstrando tamanho e peso reduzido em comparação a esplenomegalia de animais C57BL/6,

imagem representativa de análises feita em B com escala em cm. Em B a massa relativa de baço de animais C57BL/6 e C57BL/6 GFP⁺ infectados com *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP a massa total do animal no momento de sua morte por hiperparasitemia, n=7 para cada grupo com significância estatística de p<0.05 em teste U não paramétrico de Mann-Whitney.

A segunda abordagem foi averiguar o fenótipo de células T no baço de animais infectados. Para isso, iniciamos um novo ciclo de infecção com parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP em animais C57BL/6 e C57BL/6 GFP⁺. Entre o dia 7 e 10, quando as parasitemias foram de ao menos 5%, animais foram sacrificados e testados para diferentes marcações em células T para evidenciar a presença de células T regulatórias e marcadores de exaustão imune. As marcações seguiram linfócitos T CD4⁺ com subsequente marcação para PD-1, LAG-3 (principais marcadores de exaustão clonal e anergia) e marcadores presentes em células regulatórias como CD62L (marcador de células em migração), CD49 e CD51 (marcadores de ativação celular) e CD25^{High} que em conjunto com outros marcadores como PD-1 ou LAG-3 representam células T regulatórias (COBBOLD et al., 2009., MAÇON-LEMAÎTRE; TRIEBEL, 2005;), assim como CD62L junto de PD-1 (RAIMONDI et al., 2006) (Figuras 41 e 42).

Figura 40 - Medição de marcadores de ativação nas células T CD4⁺ CD49 e CD51

Expressão de marcadores de ativação CD49 e CD51 no baço de animais C57BL/6 e C57BL/6 GFP⁺ infectados com *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTRpBir:GFP. Em A observamos número de células duplo positivas para marcadores CD4⁺CD49⁺ em animais C57BL/6 em preto e C57BL/6 GFP⁺ em verde. As quantidades de células não apresentou nenhuma diferença estatística e contou com n=7 para C57BL/6 e n=6 para animais C57BL/6 GFP⁺. EM B, observamos o número de células duplamente positivas para marcadores CD4⁺CD51⁺ em animais C57BL/6 em preto e C57BL/6-GFP⁺ em verde. As quantidades de células não apresentaram nenhuma diferença estatisticamente significativa. O n foi 7 animais para C57BL/6 e n=6 para animais C57BL/6 GFP⁺.

Figura 41 – Medição de marcadores de anergia e migração em células TCD4⁺ PD-1, CD62L e LAG-3

Expressão de marcadores de exaustão e migração TCD4-PD-1, CD62L e LAG 3 em células de baço de animais C57BL/6 e C57BL/6 GFP⁺ infectados com *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP. Em A observamos número de células duplo positivas para marcadores CD4⁺PD-1⁺ em animais C57BL/6 em preto e C57BL/6 GFP⁺ em verde. As quantidades de células apresentaram diferença estatística e contaram com n=7 para C57BL/6 e n=6 para animais C57BL/6 GFP⁺. EM B, observamos o número de células duplamente positivas para marcadores CD4⁺CD62L⁺ em animais C57BL/6 em preto e C57BL/6-GFP⁺ em verde. As quantidades de células apresentaram diferença estatística e contaram com n=7 para C57BL/6 e n=6 para animais C57BL/6 GFP⁺. EM C, observamos o número de células duplo positivas para marcadores CD4⁺CD51⁺ em animais C57BL/6 em preto e C57BL/6-GFP⁺ em verde. As quantidades de células não apresentaram nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Figura 42 - Medição de células regulatórias geradas pela infecção com *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP

Marcação de Tregs com dupla marcação CD25^{HIGH+}/PD-1, CD25^{HIGH+}/LAG 3 e CD62L/PD-1. Células regulatórias foram marcadas com perfis distintos e por se tratar de uma marcação não tão simples tecnicamente os *gates* utilizados são demonstrados acima de cada gráfico com referente legenda de *gate* e seu subsequente gráfico associado. No caso de *Gate A* é mostrado a esquerda uma representação de animais C57BL/6 e a direita C57BL GFP⁺. No caso de *Gate B* é mostrado a esquerda uma representação de animais C57BL/6 GFP⁺ e a direita C57BL/6. No caso de *Gate C* é mostrado a esquerda uma representação de animais C57BL/6 e a direita C57BL/6 GFP⁺. Em A, é mostrada a quantificação de Tregs CD4⁺ CD25^{HIGH+}/PD-1⁺ para ambos os grupos C57BL/6 (em preto) e C57BL/6 GFP⁺ (em verde) com n=3 para ambos os grupos com teste T pareado e significância de p<0.05(*). Em B, é mostrada a quantificação de Tregs CD4⁺ CD25^{HIGH+}/LAG 3⁺ para ambos os grupos C57BL/6 (em preto) e C57BL/6 GFP⁺ (em verde) com n=3 para ambos os grupos com teste T pareado e significância de p<0.05(*). Em C, é mostrada a quantificação de Tregs CD4⁺ CD62L/PD-1⁺ para ambos os grupos C57BL/6 (em preto) e C57BL/6 GFP⁺ (em verde) com n=3 para ambos os grupos com teste T pareado e significância de p<0.005(**).

Animais C57BL/6 apresentaram alta esplenomegalia e quando analisamos marcadores de ativação (Figura 40), não houve diferença entre a ativação de células quando comparado com animais C57BL/6 GFP⁺. Isso demonstra que uma forte resposta imune se desenvolveu gerando reflexos pró-inflamatórios importantes,

porém ineficazes na sobrevivência de animais, ou mesmo na diminuição de efeitos relacionados com a morbidade como anemia e caquexia.

Já animais C57BL/6 GFP⁺ infectados não apresentaram sinais de esplenomegalia mesmo apresentando maior carga parasitária, Figura 39 e 30. Nesses animais nenhum efeito de agravamento foi observado na sobrevivência, ou mesmo no aumento de efeitos relacionados com a morbidade como anemia e caquexia. Isso sugere que o animal não teve um curso pior de infecção. O aumento da população parasitária pode ser explicada pela citometria obtida de células do baço desses animais. Estas apresentaram similar padrão de ativação ao de animais C57BL/6 o que demonstra capacidades similares de respostas pró-inflamatórias. No entanto células com marcadores importantes de migração como CD62L e Exaustão/anergia como PD-1 são encontrados de maneira aumentada, o que sugere um bloqueio nos efeitos inflamatórios sem gerar efeitos graves no curso da infecção para o hospedeiro. A ausência de LAG 3 aumentado corrobora com essa análise, uma vez que LAG 3 é um marcador tardio e severo de exaustão resultando na apoptose de células imunes, o que poderia levar o hospedeiro a maior suscetibilidade a outras co-infecções (MCKINNEY et al., 2015., WYKES et al., 2014;).

Curiosamente, animais C57BL/6 GFP⁺ apresentaram número aumentado de células Treg CD4⁺ CD25^{HIGH+}/PD-1⁺ e Treg CD4⁺ CD25^{HIGH+}/LAG 3⁺. Essas marcações correspondem a células regulatórias geradas no processo de tolerância infecciosa por diversos mecanismos de anergia (XING; HOGQUIST, 2012) do hospedeiro e sua expansão na infecção demonstra que a expressão de GFP pelo parasita foi suficiente para evocar processos de tolerância consideráveis no desenvolvimento do hospedeiro. Além disso, células CD62L⁺/PD-1⁺ são um padrão de células regulatórias em atividade. Essas células atingiram porcentagens altas de quase 15% demonstrando intensa atividade e controle regulatório de processos inflamatórios. Em conjunto, a resposta integrada entre parasita e hospedeiro permitiu intensa anergia e regulação ativa, sem no entanto gerar processos nocivos ao hospedeiro, permitindo crescimento parasitário em ondas mais intensas. Isso seria perfeito para manutenção parasitária na corrente sanguínea como já mostrado (WYKES et al., 2014), assim como refletiria em infecções menos sintomatológicas permitindo manutenção de cargas parasitárias eficientes para manutenção de

subpopulações distintas com fenótipos distintos podendo incluir a formação de gametócitos.

Em base dos efeitos e respostas geradas faz-se a pergunta de como uma proteína produzida no citoplasma parasitário com possível vazamento para o citoplasma de eritrócitos infectados pode ter gerado tais efeitos. Uma possibilidade é que parasitas em hemácias infectadas foram fagocitadas e que quantidades significativas de uma proteína “self” desencadaria os efeitos observados. A outra possibilidade é que exossomos produzidos pelo parasita levaram ao padrão de estimulação detectado. Em sequência analisamos se exossomos produzidos possuem algum efeito imunoestimulador.

*4.2.13 Parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP usam exossomos para influenciar respostas imunes no hospedeiro*

Nossos dados apontam que a expressão de GFP é mimetizada por parasitas que infectem animais que possuam GFP como fundo genético, evocando respostas anti-inflamatórias, que se reflete em maior carga parasitaria sem agravamento da doença. Uma vez que a proteína GFP não possui nenhum sinal de secreção, a secreção direta para o meio só se mostra possível apenas em lise do próprio parasita.

Entretanto o grau de interação obtido em nossos dados por parasita/hospedeiro parece apontar para que o crescimento parasitário e reflexo em células imune é algo mais intenso do que o simples reflexo de lise celular, que poderia liberar GFP evocando anergia e tolerância. Outro ponto a esse favor é o fato de que os efeitos (imunes) observados foram obtidos com baixas parasitemias que só então se tornaram mais intensos. Logo, não parece provável a suposição que poucas moléculas liberadas livremente por lises de baixas parasitemias desenvolvam reflexo tão intenso. Se esse fosse o caso, seria esperado que somente em pontos após significativo crescimento parasitário surgissem ondas ainda mais intensas de parasitemias, provocados pela regulação diferencial através de um efeito tolerizante.

Ao contrario dessa idéia, no dia 10 da infecção onde se pode observar o primeiro interrompimento do crescimento continuo de parasitas em animais C57BL/6, o efeito é oposto em animais C57BL/GFP⁺ que apresentam continuo crescimento havendo o primeiro sinal de controle desse crescimento surgindo

apenas no dia 14 (Figura 30). Outro fato é que se fosse accidental, e causada por parasitas morrendo por lise, as populações com GFP deveriam diminuir enquanto outras subpopulações receberiam o “benefício” desse sacrifício se expandindo com maior facilidade. No entanto, nossos dados demonstram que as subpopulações que expressam GFP se mantêm controladas e crescem em acórdância com as demais (Figura 34), o que sugere outros mecanismos.

Uma vez que parasitas que expressem GFP parecem ter parte do citoplasma eritrocitário preenchido por GFP, é razoável supor que exossomos de células infectadas possam exercer os efeitos obtidos. Em tumores os efeitos desencadeados por exossomos são sabidamente importante para anergia contra tumores (AZMI et al., 2013). Outro suporte a essa teoria é o de que exossomos podem ter esses efeitos em diferentes infecções parasitárias (SCHOREY et al., 2015).

Para evitar contaminação residual de GFP proveniente de fundo C57BL/6 GFP⁺ os parasitas infectando os fundos C57BL/6 e C57BL/6 GFP⁺ foram repassados para animais BALB/c e com a parasitemia atingindo 5-10% foram usados para obtenção de exossomos. De posse destes exossomos estimulamos esplenócitos de animais C57BL/6 (naive) e C57BL/6 GFP⁺(naive) com exossomos de parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP provenientes de cada fundo genético GFP⁺ ou GFP⁻. Para confirmar especificidade de exossomos provenientes de parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP vindos de C57BL/6 GFP⁺ testamos a influência desses exossomos também em fundo C57BL/6.

Exossomos provenientes de parasitas infectando animais C57BL/6 GFP⁺ foram capazes de afetar a produção de citocinas pró-inflamatórias em esplenócitos de mesmo fundo genético (esplenócitos provenientes de animais naive GFP⁺). Na contramão, exossomos provenientes de parasitas *P.berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP vindos de animais C57BL/6 tiveram ação inflamatória na produção de citocinas pró-inflamatória. Isso aconteceu não ocorreu para exossomos GFP⁺ em esplenocitos de animais sem GFP. Isso sugere que a natureza desses exossomos é de caráter inflamatório, porém podem ser modulado para outras funções tolerogênicas frente a genéticas específicas (Figura 43). Isso demonstra que a ação antiinflamatória observada é específica ao contexto animal GFP+/Parasita expressando GFP. Além disso, isso também demonstra que independente da origem, exossomos parecem ter uma ação estimulatória de maneira geral como o

visto na literatura (CAMPOS et al., 2015), sendo a restrição quando o hospedeiro contém similaridade genética (no caso gene GFP) e dependendo de adaptação presente em hospedeiro e parasita.

Figura 43 - Padrão de estímulo pró-inflamatório por exossomos com efeito anti-inflamatório em fundo genético específico

Ação de exossomos na produção de citocinas pró-inflamatórias por esplenócitos. Esplenócitos de animais naïve C57BL/6 (Esplen.C57BL/6) e de animais C57BL/6 GFP⁺ (Esplen.C57BL/6 GFP⁺) foram estimulados com exossomos de parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP que expressam GFP (Exossomo GFP+) e de parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP que não expressam GFP (Exossomo GFP-). A combinação de esplenócito e qual exossomos foram usados para estimula se encontra como presente (+) ou ausente (-) na legenda de cada gráfico, sendo verde completo animais C57BL/6 GFP⁺ estimulados com exossomos GFP+, preto completo, animais C57BL/6 estimulados com exossomos GFP⁻ e verde tracejado, animais C57BL/6 estimulados com exossomos GFP+ e preto completo animais C57BL/6 estimulados com exossomos GFP⁻. As análises foram com n=4 e a produção de citocinas no sobrenadante foi feita por kit CBA (BD Bioscience). Dados a grande variância nos grupos as análises de estatísticas não revelaram diferenças significativas (teste ANOVA).

Curiosamente para citocinas de padrão de resposta Th2 como interleucinas IL-2, IL-4 e IL-10 exossomos aumentaram seu perfil de expressão independente do fundo genético usado para estímulo (Figura 44).

Figura 44 - Padrão de estímulo pró-inflamatório por exossomos com efeito anti-inflamatório em fundo genético específico

Ação de exossomos na produção de citocinas do tipo TH2 por esplenócitos. Esplenócitos de animais naive C57BL/6 (Esplen.C57BL/6) e de animais C57BL/6 GFP⁺(Esplen.C57BL/6 GFP⁺) foram estimulados com exossomos de parasitas *P.berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP que expressam GFP (Exossomo GFP+) e de parasitas *P.berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP que não expressam GFP (Exossomo GFP-). A combinação de esplenócito e qual exossomos foram usados para estimular se encontram como presente (+) ou ausente (-) na legenda de cada gráfico, sendo verde completo animais C57BL/6 GFP⁺ estimulados com exossomos GFP+, preto completo animais C57BL/6 estimulados com exossomos GFP⁻ e verde tracejado animais C57BL/6 estimulados com exossomos GFP⁺ e preto completo animais C57BL/6 estimulados com exossomos GFP⁻. As análises foram com n=4 e a produção de citocinas no sobrenadante foi feita por kit CBA. Como no experimento anterior, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi obtida (teste ANOVA).

A ação antiinflamatória dos exossomos foi restrito a fundo genético que possui o gene GFP expresso pelos parasitas *P.berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP. Isso se explica facilmente pela ação de células regulatórias presentes em esplenócitos e presentes em nossos dados experimentais (Fig: 41 e 42). De acordo com a literatura (COAKLEY et al., 2015) a ação pró-inflamatória dessas partículas está presente, indiferente da presença ou ausência de GFP nessas partículas. No entanto nossos dados mostram que esse fator pode ser facilmente subvertido pelo conjunto do genótipo do hospedeiro e expressão de proteínas diferenciais por subpopulações parasitárias que contém um transgene sob controle de 5'UTR de genes variantes como *bir*.

Cabe ressaltar que independente do fundo genético do hospedeiro, mas dependente de subpopulações parasitárias que produzam um antígeno "self", presente no hospedeiro, exossomos parecem ter influenciado respostas de padrão TH2. Esse padrão de resposta imune em células T é tido na literatura como menos inflamatório e característico de respostas menos nocivas(PEREZ-MAZLIAH; LANGHORNE, 2014). Diversos tratamentos em quadros de auto-imunidades tendem a desviar respostas pro-inflamatórias para respostas do tipo TH2 para amenizar respostas autoimunes, na tentativa de diminuir reflexos nocivos dessas respostas. O

padrão de respostas TH2 também é muito importante, especialmente para malária por favorecer a produção de anticorpos. O aumento da resposta humoral é tido como um dos melhores marcadores de proteção a malária (WRIGHT; RAYNER, 2014) e tem papel importante para gerar proteção evitando respostas pró-inflamatórias que possam ser letais.

Em malária a morte de crianças por quadros como malárias graves de anemia, malária cerebral e síndrome de choque tóxico estão associados a padrões pro-inflamatórios (PEREZ-MAZLIAH; LANGHORNE, 2014), enquanto que a proteção na idade adulta esta associada a padrões do tipo TH2. É curioso notar que em nossos dados o desvio para resposta TH2 é restrito a componentes gerados por parasitas que tenham subpopulações mimetizando aspectos do hospedeiro. Isso aponta que um favorecimento desse tipo de resposta pode ser de responsabilidade única do parasita variando com conteúdo introduzido em exossomos, e por ele secretado.

Esses dados são evidências de mais uma tentativa de integração entre parasita/hospedeiro na modulação da imunidade faltando saber se poderiam ser transpostos para modelos humanos.

4.2.14 Parasitas P. berghei ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP possuem GFP em exossomos por ação de promotores bir assim como P. falciparum transgênico com promotores rif controlando expressão de GFP também possuem GFP em exossomos

A fim de testar se a presença de GFP por ação de região 5' UTR de genes variantes murinos pode realmente estar em exossomos e se isso poderia acontecer com modelo de estudos em humanos, testamos a possibilidade de *P. falciparum* NF54 possuir a mesma característica. Para isso testamos se parasitas NF54 transgênicos para uma construção com promotores de genes *rif* controlando a expressão de GFP poderiam desencadear o mesmo efeito observado em exossomos de nosso modelo murino. Para isso exossomos do sobrenadante de culturas de parasitas NF54 contendo a construção promotor *rif*:GFP e exossomos de parasitas *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR *pBir*:GFP vindos de animais C57BL/6 e C57BL/6 GFP⁺ foram recolhidos. Testamos por western Blot para verificar a presença ou ausência de GFP no conteúdo desses exossomos, Figura 45.

Figura 45 - Western Blot de exossomos de NF54 Rif:GFP e de *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP com α -GFP para testar o conteúdo ou ausência de GFP em seu interior.

1-Exossomos de NF54 com promotor Rif:GFP

2-Exossomos de *P.berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP infectando animais C57BL/6 GFP⁺

3-Exossomos de *P.berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP infectando animais C57BL/6

4-Exossomos de *P.berghei* ANKA não GFP

Western Blot de exossomos evidenciando GFP no interior de exossomos. Exossomos provenientes de parasitas *P.falciparum* NF54 transfectados com plasmideo contendo a construção de promotor rif:GFP foi submetido a westerns Blot com anticorpos α -GFP (policlonal) em 1, no mesmo western blot exossomos obtidos de *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP vindos de animais C57BL/6 GFP⁺ (em 2) e C57BL/6 (em 3) foram usados. Como controle, exossomos de *P. berghei* ANKA foram usados em 4. Para evitar contaminação de GFP produzido por animais C57BL/6 GFP⁺, os exossomos de *P. berghei* usados no Western Blot vieram de uma passagem rápida em animais BALB/c até que parasitemias tenham atingindo em torno de 10%. Parasitas foram cultivados *in vitro* para obtenção de exossomos usados na figura.

Foi possível observar GFP nos exossomos testados demonstrando que tanto parasitas que infectam humanos (NF54) e parasitas que infectam murinos podem ou não possuir GFP em seu interior dependendo unicamente de subpopulações parasitárias que expressam GFP de maneira variável, dependendo exclusivamente do fundo genético do hospedeiro infectado.

Isso demonstra que dependendo do conteúdo de proteínas, moduladas pela expressão de genes PIR em ambos os modelos de infecção (humano e murino), ambos os parasitas *P. falciparum* e *P. berghei* se assemelham. Isso sugere que resultados obtidos em nossos estudos possibilitam, ao menos, especulações de que o mesmo fosse observado em parasitas humanos. Até o momento comprovamos que parasitas podem exercer um certo grau de adaptação importante quando encontram um contexto tolerante vantajoso. A neutralidade frente ao gene *pbir*:GFP leva a sua total inativação pois não parece ser selecionado positivamente e o silenciamento natural parece ocorrer. Ainda cabe um terceiro cenário a ser analisado. E se a proteína GFP não pudesse ser inativada em sua expressão e o hospedeiro tivesse resposta imune prévia a ele? A resposta imune prévia a um gene que não possui mecanismos de secreção e que se mostra presente em exossomos poderia ser um alvo importante no curso da infecção? Finalmente seguimos com

uma comparação que possibilita conectar aspectos finais da relação parasita/hospedeiro aqui estudados.

4.2.15 A imunidade prévia a proteína endógenas sem sistema de secreção ou exposição em eritrócitos infectados em nada afeta o curso infectivo levando a supressão imune da respostas prévia após 15 dias

Como último experimento medimos se a imunidade prévia contra GFP poderia afetar o curso da infecção por *P. berghei*. Para isso animais C57BL/6 imunizados com GFP foram infectados com parasitas *P.berghei* NK65 expressando de maneira constitutiva a proteína GFP.

O mesmo teste (C57BL/imunizado contra GFP) com infecção por *P. berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR p*Bir*:GFP não faria sentido, uma vez que em nosso modelo de animais C57BL/6 que não possuem resposta imune prévia, demonstraram quase que total supressão da construção 5'UTR p*bir*:GFP. Frente ao problema de que linhagens *P. berghei* ANKA GFP⁺ que possuímos são capazes de desenvolver malária cerebral em fundo C57BL/6, a única análise possível seria com linhagem que mantivesse infecção longa levando a morte por hiperparasitemia tal como *P.berghei* NK65 GFP⁺ em animais C57BL/6.

Figura 46 - Comparação de respostas adaptativas do hospedeiro pós-imune, tolerante e neutro a presença de antígeno citoplasmático.

Curva de crescimento de contexto infectivo tolerante, neutro ou pós-imune a antígeno citoplasmático. Reproduzimos nesse gráfico para apreciação as curvas de uma infecção tolerante em verde (parasita *P.berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP mimetizando a expressão de GFP em animais C57BL/6 GFP⁺), infecção neutra em preto (animais naive C57BL/6 infectado com *P.berghei* ANKA/C-PAC 5'UTR pBir:GFP silenciando gene GFP) e modelo com resposta prévia pós imune em vermelho (animais C57BL/6 imunizados com membrana infectada reconstituída com GFP infectado com *P.berghei* NK65 GFP⁺ que não pode silenciar a expressão de GFP). Em A as curvas experimentais mostradas na Figura 20 são rerepresentadas com dados de animais imunizados para GFP (curva em vermelho, n=8). A estatística nessa comparação se mantém somente nos dias 10 e 12 em ANOVA dois fatores $p < 0.001$ (***). Em curvas de sobrevida o grupo imunizado contou com média de sobrevida de 17 dias sem diferir estatisticamente dos outros grupos (média 14,5).

A análise de parasitemia e sobrevida não permite concluir nenhuma relevância da existência de resposta imune contra antígenos sem um papel restrito na reinvasão ou expostos na superfície de eritrócitos (como se mostra em Figura 46). Importante salientar que o parasita usado na infecção de animais imunizados com GFP tem a expressão de GFP no citoplasma (tal como o modelo 5'UTR pBir:GFP) sem possibilidade de modular sua expressão. Nesse caso o gene GFP esta sob ação de promotores constitutivos não podendo ser desligado por fatores epigenéticos e estando integrado ao genoma parasitário. Mesmo assim nenhum efeito significativo pode ser notado. Além disso, verificamos se a resposta humoral desses animais se manteve, imaginamos que a constante presença de GFP possa ter levado a manutenção da resposta imune gerada. Curiosamente, a resposta imune humoral não se manteve nesses animais com queda brusca na resposta humoral após o dia 15 levando a um processo que invariavelmente leva a morte desses animais.

Figura 47 - Resposta humoral após 15 dias de infecções contra GFP constitutivamente expresso.

A resposta humoral de animais imunes sofre exaustão após o 15º dia levando a queda dos títulos contra GFP. Animais foram testados pré-desafio contra títulos anti-GFP (dia 0) e após 15 dias de infecção (DIA15) apresentando queda na resposta humoral (ANOVA, $p < 0.05$). Animais controle (dia 15) sem resposta prévia não desenvolveram resposta humoral contra o antígeno testado (grupo controle, $n=8$ para ambos os grupos).

Concluimos que para o hospedeiro é irrelevante desenvolver respostas imunológicas contra antígenos que não possuam papel decisivo no curso infectivo. O GFP citoplasmático em nada favorece o sistema imune do hospedeiro imunizado contra frente à infecção.

Outros efeitos são a exaustão da resposta imune humoral após o ciclo infectivo. Embora seja constantemente expresso, o GFP gerado pelo parasita não provoca resposta em animais naives (controle) nem mantém ou sustenta a resposta pré-existente, agindo de maneira silenciosa na infecção e sendo importante somente se isso diminui a gravidade da infecção (como o mostrado por animais C57BL/6 GFP⁺ infectados com parasitas que mimetizem a expressão desse gene). Isso justifica a perda do controle da citoadesão mostrado na Figura 23, o que coincide com o mesmo período infectivo. Isso demonstra que antígenos que sigam como sendo preconizados para usos em vacinais devem ter papel continuamente importante nas infecções. O que torna vacinas contra genes/antígenos variantes como genes *var*/PfEMP1 pouco atrativas, salvo para evitar processos fisiológicos específicos como malária gestacional onde VAR2CSA é um ligante definido e bloqueável (BROLIN ET AL., 2010). Porém, antígenos como PfRH5 que possuem papel crítico na reinvasão eritrocitária e baixa variabilidade genética tornam-se ótimos alvos.

Por isso focamos na última parte do projeto no uso de PfRH5 para validação de modelos vacinais onde testamos a capacidade de gerar vacinas com antígenos recombinantes com nanoestruturas lipossomais.

4.2.16 Pontos evidenciados pelo segundo desenho experimental

Tomados em conjunto os dados apresentados pelo nosso segundo desenho experimental demonstra aspectos importantes para o entendimento das questões a cerca de genes *bir*.

- 1- Comprovamos a ação de promotor modulável pela nossa construção 5' UTR *pBir:GFP*.
- 2- Essa região sofre variação na expressão em diferentes hospedeiros demonstrando capacidade adaptativa a hospedeiros específicos.
- 3- Apenas subpopulações parasitárias demonstram essa expressão, tornando possível que outras expressam outro *subset* de genes variantes.
- 4- A adaptação gerada por subpopulações parasitárias afetou a patologia da doença diminuindo sinais de morbidade como esplenomegalia e diminuição de citocinas que geram efeitos patológicos como TNF, IL-17, IL-6. Mostramos também que o parasita pode evocar processos de tolerância e anergia por ação desses genes beneficiando o parasita sem afetar aspectos importantes como mortalidade do hospedeiro.
- 5- Evidenciamos que a expressão não é devido a números excessivos de cópias do transgene e sim a regulação modulada de sua expressão como ocorre em genes variantes de *P. falciparum*.
- 6- Mostramos que a região 5'UTR *pbir* possui atividade modulável em *P. falciparum* com alternada atividade de transcrição e completo silenciamento.
- 7- A modulação no hospedeiro parece ocorrer por vesículas exossômicas.
- 8- Mostramos que exossomos de *P. falciparum* também podem veicular GFP quando expressa de forma citossólica.
- 9- Demonstramos que a resposta prévia a antígenos sem relevância na infecção (como interferência em reinvasão ou cito adesão) não colaboram com o hospedeiro. Isso possibilita livre expressão por parte dos parasitas em genes que possam estar no citoplasma e por isso

associado em exossomos, sem pressão imune, possibilitando um papel na indução de anergia ou tolerância. Isso pode levar inclusive a perda da resposta imune desenvolvida contra eles, possivelmente por exaustão ou anergia imune que se refletiu em perda de respostas humorais.

Considerando que não obtivemos evidência de papel de antígenos BIR em sequestro ou mesmo como alvo da resposta imune e que sua localização não é coincidente com antígenos parasitários na superfície de eritrócitos, seguimos com modelo vacinal para antígenos sabidamente protetores e envolvidos na reinvasão como PfRH5.

4.3 Resultados do terceiro modelo experimental

4.3.1 *Geração de um sistema de produção de antígenos recombinantes para purificação e obtenção de antígenos específicos fusionados a GPI para uso em modelos baseados em lipossomos*

Em artigos produzidos durante o doutorado (FOTORAN et al., 2015a, 2016) desenvolvemos um modelo de nanopartículas lipossomais dotadas com antígenos extraídos de merozoítos que mostraram-se eficientes no bloqueio da reinvasão de eritrócitos por *P. falciparum*. Ainda, proteolipossomos imunizados foram capazes de evitar a morte de animais em modelo de resposta aguda como *P. yoelii* XL apresentando também considerável resposta protetora na progressão de parasitemia crônica no modelo de *P. berghei* NK65. Esse modelo mostra-se limitado em termos biotecnológicos (difícil *scaling-up*), pois necessita da retirada nativa de proteínas que possam ter em sua porção terminal domínios GPI para sua ancoragem na superfície dessas partículas lipossômicas. Por conta desse problema desenvolvemos um sistema recombinante onde antígenos possam ser produzidos e artificialmente associados a domínios GPI.

Desse modo clonamos a porção final do domínio lipídico da proteína CD14 em fase de leitura com um vetor presente em nosso laboratório denominado pcDNA3R7A. Esse plasmídeo possui os sítios de clonagem presente no vetor pRSETA e por isso contém também a cauda de histidina (6xHis) para purificação de proteínas. Nesse vetor ainda temos um *cassette* para seleção em células eucariotas por neomicina/G418 oriundo do vetor pcDNA3 (Invitrogen). Nesse vetor também foi introduzido o intron A (do Citomegalovirus) seguido por um sinal de secreção para

células eucariotas (do gene *tissue plasminogen activator*, TPA signal). Após clonagem da porção terminal da proteína CD14 (sabidamente uma proteína GPI ancorada) um sítio interno composto por BamHI e por EcoRI ainda pode ser usado para clonagem de qualquer antígeno ou domínio que possa vir a ser amplificado por técnicas de PCR ou obtido por restrição.

Concentramos nossos esforços na obtenção de antígenos que pudessem facilitar a caracterização de respostas imunes e que trouxessem vantagem na purificação dos mesmos. Usamos como modelo a proteína GFP, e como antígeno importante nas respostas imunes de *P. falciparum* o antígeno PfRH5. Escolhemos esse antígeno por se tratar de um novo alvo vacinal importante no ciclo sanguíneo (8). Ainda, o gene da PfRH5 foi obtido de forma codon-otimizada para expressão em células eucariotas (gentilmente cedido por Dr. Simon Draper, Oxford). As duas construções foram facilmente clonados gerando os vetores pR7AGFPGPI e pR7APfRH5GPI e sua expressão caracterizada por imunofluorescência Figura 48 e 50.

Figura 48 - Fluorescência de células GFP GPI recombinantes (GFPGPIr).

Fluorescência de proteínas GFP-GPI em células CHO. Da esquerda para a direita temos a sobreposição das cores (microscopia ótica convencional), a marcação característica de núcleo proporcionado por DAPI (meio) e a fluorescência emitida por células transfectadas com o vetor pR7AGFPGPI para canal de GFP. As transfecções foram feitas em células CHO selecionadas pelo cassete de resistência a neomicina e um dia antes dos experimentos as células foram colocadas em LabTecs específicas para experimentos de imunofluorescência. Note que células CHO em LabTec apresentam formato diferente do usual em cultura e crescem em formas mais arredondadas.

Em paralelo fotografamos células não transfectadas para validar a intensidade da fluorescência referente a proteína GFPGPIr, Figura 49.

Figura 49 - Fluorescência de células CHO recombinantes controle.

Fluorescência em células CHO controle. Em (A) temos a marcação característica de núcleo proporcionado por DAPI. Em (B) temos a fluorescência emitida por células controle do tipo CHO em absorção de fluorescência referente ao mesmo espectro e intensidade usado para verificação da presença de proteínas GFP. Em C temos as cores sobre a microscopia ótica convencional. As imagens foram feitas em células CHO e um dia antes dos experimentos as células foram colocadas em LabTecs específicas para imunofluorescência.

Assim como feito com o vetor pcDNA3A-GFPGPI, células CHO foram transfectadas com o vetor pcDNA 3 PfrH5GPI, selecionadas pelo fator de resistência à neomicina e seguiu-se imunofluorescência contra o *tag* de histidina presente no vetor. Dessa maneira podemos além de caracterizar a expressão das proteínas e confirmar sua presença na porção externa das células transfectadas.

Figura 50 - Imunofluorescência de células PfrH5 GPI recombinantes (PfrH5GPIr).

Imunofluorescência em células CHO/pR7APfrH5GPI. Da esquerda para direita temos a fluorescência emitida por células controle do tipo CHO marcadas com anticorpo anti-His tag marcado com anticorpo

secundário anti-Mouse Alexa 594 em absorção de fluorescência referente ao mesmo espectro 594 mais marcação nuclear, somente a marcação por DAPI relativa ao núcleo (meio) e somente a fluorescência emitida por células controle do tipo CHO marcadas com anticorpo anti-His tag marcado com anticorpo secundário anti-Mouse Alexa 594 em absorção de fluorescência referente ao mesmo espectro 594. As imagens foram feitas em células CHO e um dia antes dos experimentos as células foram colocadas em LabTecs específicas para imunofluorescência, salientamos que fotos dos respectivos controle foram feitas e não demonstraram nenhuma reatividade contra a superfície em células não transfectadas (semelhante ao mostrado em Figura 49).

De posse de um sistema que possua os domínios propostos por nosso projeto utilizamos proteínas extraídas dessas células para caracterizar nosso modelo vacinal com essas proteínas.

4.3.2 Antígenos com domínio GPI apresentam maior afinidade por partículas lipossômicas

Utilizamos como modelo vacinal partículas lisossômicas dotadas de antígenos ancorados pela porção lipídica presente nos domínios GPI. Porém, o modelo de nanopartículas lipossomais prevê uma grande variedade de manipulações. Caracterizamos o comportamento de antígenos no fluido aquoso interno a partículas lipossomais e externa por ancoragem do domínio lipofílico GPI. Nos experimentos que se seguem temos antígenos hidrofílicos produzidos em bactéria em fusão com domínios GST que foram incubados junto a nanopartículas lipossomais. Ao incubarmos essas proteínas com as partículas podemos verificar a fluorescência adquirida pelas partículas pertinente a interiorização de antígenos fluorescentes e sua correspondente eficiência. Incubamos 1 ml de lipossomos com as seguintes quantidades de proteínas: 500 µg, 250 µg, 125 µg 72,5 µg, 36 µg e 18 µg. A incorporação foi calculada pela diferença da quantidade de proteína retida nos proteolipossomos e a quantidade presente nos respectivos sobrenadantes de cada incubação. As partículas carreando proteínas sofreram ultra centrifugação e foram lavadas para serem quantificadas por Bradford. Uma eletroforese SDS-PAGE seguido de gel SDS-PAGE corado com prata foi feito a fim de visualizarmos a cadência da incorporação de cada antígeno e verificar a relevância de possuir ou não uma porção lipofílica provinda do domínio GPI (Figuras 51 e 52).

Figura 51 - Retenção de antígenos hidrofílicos por coincubação em vesículas lipossômicas

Retenção em partículas lipossomais por co-incubação de proteínas GST-GFP evidenciado SDS-PAGE/coloração de prata. Incubamos 1ml de lipossomos com as quantidades de proteínas solúveis GST-GFP nas quantidades de 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 72,5 µg/ml, 36 µg/ml e 18 µg/ml. As partículas proteolipossomais foram peletadas por ultra-centrifugação e separadas em gel de SDS-PAGE a fim de verificarmos a diferença na inclusão em lipossomos. Corremos em paralelo o sobrenadante das incubações possuindo a quantidade não incorporada da incubação. Desse modo temos em 1-Poço com o padrão de peso molecular 260 kDa, 140 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa. 2-Proteína recombinante utilizada, 3-Pellet provindo da incubação de 500 µg/ml, 4-Pellet provindo da incubação de 250 µg/ml, 5-Pellet provindo da incubação de 125 µg/ml 6-Pellet provindo da incubação de 72,5 µg/ml, 7-Pellet provindo da incubação de 36 µg/ml e 8-Pellet provindo da incubação de 18 µg/ml. O poço 9s corresponde ao sobrenadante provindo da incubação de 500 µg/ml, em 10s temos o sobrenadante provindo da incubação de 250 µg/ml, e em 11s temos o sobrenadante provindo da incubação de 125 µg/ml. A seta azul salienta a posição do antígeno hidrofílico recombinante GST-GFP. A canelata 5 parece ter tido uma incorporação inconsistente com o esperado, em vista disso o experimento foi refeito e demonstrou padrão consistente em novas medições.

O mesmo processo foi feito com antígenos com domínio GPI em paralelo. Podemos observar que a adição de um domínio lipofílico no lugar de um domínio hidrofílico proporcionou maior capacidade do antígeno de se ligar a partículas lipossomais.

Figura 52 - Retenção de antígenos hidrofílicos por coincubação em vesículas lipossômicas

Retenção em partículas lipossomais por co-incubação de proteínas GFP_{GPI} evidenciado por coloração de prata. Em A Incubamos 1ml de lipossomos com as quantidades de proteínas solúveis GFP_GST nas quantidades de 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml 72,5 µg/ml, 36 µg/ml e 18 µg/ml. As partículas proteolipossomais foram peletadas por ultra-centrifugação e separadas em gel de SDS-PAGE a fim de verificarmos a diferença na incorporação. Analisamos em paralelo o sobrenadante das incubações visualizando a quantidade não incorporada da incubação. Desse modo temos em 1- Poço com o padrão de peso molecular 260 kDa, 140 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa. 2-Proteína recombinante utilizada provinda de células CHO purificadas por Ni-Sepharose, 3-Pellet provindo da incubação de 500 µg/ml, 4-Pellet provindo da incubação de 250 µg/ml, 5-Pellet provindo da incubação de 125 µg/ml 6-Pellet provindo da incubação de 72,5 µg/ml, 7-Pellet provindo da incubação de 36 µg/ml e 8-Pellet provindo da incubação de 18 µg/ml. O poço 9s corresponde ao sobrenadante provindo da incubação de 500 µg/ml, em 10s temos o sobrenadante provindo da incubação de 250 µg/ml, em 11s temos o sobrenadante provindo da incubação de 125 µg/ml, 12s temos o sobrenadante provindo da incubação de 72,5 µg/ml, e em 13 s temos o sobrenadante provindo da incubação de 36 µg/ml. As setas azuis salientam as posições dos antígenos lipofílicos recombinantes GFP_{GPI}. EM B temos o Western Blot contra GFP do antígeno recombinante usado que mostra a detecção da proteína completa e uma forma truncada.

Analisamos a fluorescência presente nas partículas peletadas (por citometria de fluxo) e normalizamos sua fluorescência pela quantidade de proteínas presentes em cada fração. Os dois gráficos a seguir resumem a fluorescência de cada partícula e sua respectiva eficiência de incorporação por co-incubação, Figura 53.

Figura 53 - Retenção de antígenos hidrofílicos por coincubação em vesículas lipossômicas

Fluorescência e eficiência na retenção de proteínas. Em A temos a eficiência de retenção de cada incubação com lipossomos de formas solúveis e lipofílicas da proteína GFP. Em B, a fluorescência de cada partícula normalizada por sua quantidade de proteínas presente em cada pellet provindo de diferentes quantidades de proteínas comparando uma forma solúvel e uma lipofílica da proteína GFP é mostrado.

Nossos dados deixam evidente que proteínas tanto de forma solúvel quanto em associação com GPI podem ser incorporadas em lipossomos tendo a incorporação auxiliada pela fusão com GPI.

Um problema reside na extração de proteínas GPI-ancoradas que não se mostra trivial. O tag utilizado para purificação é altamente inespecífico e a purificação por si mostra-se contaminada por proteínas diversas. Dessa forma estamos no momento testando uma nova etiqueta (strep tag) para purificação dessas proteínas recombinantes.

4.3.3 Diferentes proteínas recombinantes são possíveis de serem obtidas e purificadas em fusão com GPI

No seção anterior 4.3.2. descrevemos a possibilidade de clonar e purificar a proteínas GFP-GPI com sucesso, e a mesma foi usada pra definir parâmetros metodológicos importantes no uso dessas proteínas em conjunto com lipossomos (tais como melhor concentração de incorporação, manutenção de propriedades relevantes como fluorescência após processos de purificação). Demonstramos ainda que pudemos marcar células que apresentassem PfRH5-GPI em sua superfície.

Como propósito de demonstrar que o sistema em questão é possível de ser aplicado a diferentes proteínas, clonamos o domínio ZZ (domínio que se liga a anticorpos via o domínio Fc) da proteína A de *Staphylococcus aureus* (GRAILLE et al., 2000) acoplado a GPI. Assim é possível complexar anticorpos na outra extremidade com a orientação necessária para gerar imunolipossomos. Imunolipossomos são partículas que podem ser direcionadas de maneira específica para moléculas ou células específicas (IJIMA et al., 2011). Por isso, essa proteína poderia facilitar o direcionamento de diversas partículas contra células ou tecidos específicos e melhorar o efeito dessas partículas contra alvos de difícil acesso, como exemplo tumores (IRVINE, 2011). Como prova de que nossa proposta foi alcançada, caracterizamos a obtenção tanto de PfRH5-GPI quando ProtA-GPI pelo método apresentado, tanto por western blot quando por imunoblot contra o domínio de purificação utilizado (strep tag, Figura 54 A e B), sendo os tamanhos das proteínas recombinantes coincidentes com os apresentados na literatura (LJUNGQUIST et al., 1989).

Figura 54 - Western blot contra strep tag revelando ProtA GPIr e PfRH5 GPIr

Reconhecimento de soros contra proteína recombinantes PfRH5GPIr e ProtAGPIr. Em A foi feito um imunoblot contra o antígeno ProtAGPIr. EM B foi feito um imunoblot contra o antígeno recombinante de CHO de PfRH5 fusionado a domínio GPI. Os anticorpos usados foram anti-StrepTagHRP conjugado, numa diluição de 1:2000.

4.3.4 Distintas proteínas recombinantes fusionadas a GPI podem ser associadas a lipossomos para uso em vacina

Como prova de princípio proposto no início do projeto, pudemos produzir de maneira recombinante a proteína GFP GPIr, PfRH5 GPI(PfRH5 GPIr) e ProA GPIr. Partindo desse resultado inicial associamos a proteínas recombinantes com partículas lipossomais e verificamos sua afinidade por vesículas lipossomais. Isso também serviu para caracterizarmos a incorporação do antígeno PfRH5 em formulações que posteriormente foram usadas em imunizações (Figura 55 A).

Para a proteína A de *S. aureus* verificamos apenas sua incorporação em vesículas lipídicas contra a própria proteína A produzida sem GPI e por isso altamente solúvel (Figura 55 B).

Figura 55 - Incorporação de PfRH5 GPIr em formulações vacinais e afinidade de ProtA GPIr por vesículas lipídicas

Retenção de PfRH5GPIr em formulações vacinais consistentemente e afinidade de proteína A GPIr por lipossomos. Em A gel demonstramos a retenção da proteína PfRH5 GPIr em formulações lipossomais usadas em cada imunização. C=lipossomos vazios, S=Sobrenadante das incubações com lipossomos+PfRH5GPI, P=PfRH5GPI recombinante, 1, 2 e 3 são as proteínas retidas nas formulações usadas como vacina (n=3). Em B co-incubamos proteína A solúvel (6 xHIS-Strep TAG) com lipossomos e Proteína A GPIr com lipossomos. Após purificação das partículas, elas foram submetidas a Western Blot contra o TAG de purificação usado para purificá-las. Em 1 é visto a linha correspondente a proteínas A solúveis e em 2 proteínas A GPIr em todos os casos a incubação foi feita na quantidade de 72,5 µg/ml de lipossomos.

4.3.5 Anticorpos gerados contra PfRH5GPI recombinante associado a lipossomos tem a capacidade de reconhecer as proteínas nativas de NF54 e demonstram alto títulos de anticorpos após imunizações

De posse de formulações lipossômicas associadas ao antígeno PfRH5 GPIr testamos a capacidade dessas formulações gerarem respostas humorais efetivas. Para isso animais BALB/c foram imunizados com 10 µg de proteolipossomos e 100 ng de lipídio A (como adjuvante usado) por imunização em cada animal. As imunizações foram feitas em três doses com intervalo de 14 dias entre elas. Após a

última imunização animais tiveram seu sangue extraído por punção cardíaca e o plasma separado para uso em ensaios de ELISA, imunofluorescência e após purificação usados para ensaios de reinvasão parasitária *in vitro*.

Para verificar se existe o reconhecimento nativo de proteínas presentes em *P. falciparum*, culturas de NF54 foram sincronizadas e parasitas vivos foram submetidos a imunofluorescência de anticorpos pós imunização com lipossomo carregados com proteínas PfRH5GPI recombinantes. Nossos resultados demonstram que as imunizações foram efetivas porque anticorpos gerados reconheceram formas sanguíneas em padrão de pontos, que não recobrem a superfície e portanto não coincide com os núcleos do parasita. Esse padrão é esperado para proteínas do micronema/róptria e encontrado para PfRH5 na literatura. Controles pré imunes não mostram nenhuma forma de reconhecimento.

Sabendo que o reconhecimento da proteína para PfRH5, sônicamos extratos de esquizontes e usamos esses extratos para titulação de ELISA. Isso é uma alternativa a produção da proteína e impõem maior grau de dificuldade para titulação em ELISA (Figura 56). Porém, mesmo assim nossos soros foram capazes de reconhecer os extratos parasitários demonstrando alta produção de anticorpos após imunizações. Após imunização todos os animais demonstraram reatividade para a proteína nativa em ensaios de ELISA com endpoint de IgGs em torno de 10^3 - 10^4 . Esses dados demonstram que como veículo vacinal lipossomos dotados de PfRH5 GPIr podem ser utilizados para fins vacinais.

Figura 56 - Reconhecimento de proteína nativa de *Plasmodium falciparum* e títulos gerados pelas imunizações.

Reconhecimento *in vitro* de parasitas NF54 por anticorpos anti-PfRH5 e ELISA contra extratos de esquizontes. Em A, Soro de animais imunizados com lipossomos contendo PfRH5 GPIr (n=10) foram incubados com formas vivas e sincronizadas de esquizontes da linhagem NF54, o núcleo de parasitas foi corado com DAPI e reconhecimento de anticorpos pós- e pré-ímunes foram visualizados com o uso de anti-mouse Alexa 488. Formas incubadas com anticorpos pré-ímunes não apresentaram nenhuma forma de reconhecimento quando expostos ao campo referente de Alexa 488 (dados não mostrados). Em B o título máximo obtido por cada animal após três imunizações em ELISA, como proteína para detecção foram utilizados extratos sônicos de merozoítos purificados de eritrócitos sincronizados por Nicodenz, n=10. Os títulos foram relacionados a soros reativos acima do *cutoff* que foi o próprio soro de animais pré imune contra os mesmos extratos de esquizontes.

4.3.6 A resposta humoral criada a partir de proteolipossomos carregados com proteínas PfRH5GPI recombinantes produz anticorpos anti-reinvasão com efeito dose resposta

Para medirmos a funcionalidade dos anticorpos criados a partir de lipossomos catiônicos ou carregados com proteínas GPI ancorados, um ensaio de inibição da reinvasão de *P. falciparum* (linhagem NF54) foi feito com cada soro individualmente. Nesse ensaio, que contou com um efeito dose-resposta, os parasitas foram incubados com soros purificados por coluna de afinidade por proteína G e proteína A.

Figura 57 - Efetividade de anticorpos α -PfRH5 GPIr contra *P. falciparum* *in vitro*

Para o teste com proteínas PfRH5 GPIrec as concentrações dos anticorpos variaram de 180 µg/ml até 600 µg/ml e obtiveram efeitos mínimos de 22,70% (+/- 3,43) e máximos de 48% (+/- 6,8). O controle desses ensaios foram anticorpos pré-ímmes dos próprios animais e soro purificado de animais imunizados com formulações sem nenhuma proteína associada a lipossomos. Em ambos os casos os valores dos controles foram similares. Os valores atingidos por esses parasitas foram considerados o 100% de crescimento parasitário. Os anticorpos gerados por essas formulações foram capazes de gerar efeitos inibitórios comparáveis a estudos que usaram o mesmo antígeno como modelo vacinal (Douglas et al., 2011, 2015).

4.3.7 Resumo dos resultados no terceiro desenho experimental

Nosso terceiro desenho experimental foi feito na tentativa de criar um modelo que pudesse produzir e aprimorar vacinas baseadas em proteolipossomos para uso contra proteínas de genes variantes. Nenhum de nossos modelos experimentais murinos anteriores demonstrou que proteínas variantes sejam bons candidatos a serem incluídos em modelos vacinais. Portanto, focamos nosso desenho vacinal contra um antígeno de sabido caráter protetor em modelos humanos contra malária. A vantagem dessa escolha é termos criado dados que corroborem com a eficiência desse antígeno e que crie um modelo biotecnologicamente explorável com antígenos purificados fusionados a GPI para incorporação a lipossomos.

- 1- Foi possível desenvolver um sistema produção de proteínas recombinantes com âncora de GPI que possui 2 diferentes domínios para a purificação dos mesmos.

- 2- Mostramos que através de proteínas recombinantes foi possível a obtenção de proteínas recombinantes GFP-GPIr, proteína A-GPIr e PfRH5-GPIr sublinhando a versatilidade do sistema usado.
- 3- Demonstramos que a associação de proteínas é favorecida pela inclusão do domínio GPI aumentando de maneira controlada a associação dessas proteínas com lipossomos.

Quando usamos a proteína PfRH5-GPIr como antígeno em proteolipossomos formos capazes de produzir modelos vacinais que geram eficiente resposta contra formas maduras do parasita e permitindo seu reconhecimento. Os anticorpos gerados obtiveram efeito anti-reinvasivo contra *P. falciparum* demonstrando grande eficiência e sendo a prova de princípio de que modelos vacinais baseados em proteolipossomos podem ser usados de maneira eficiente em processos reinvasivos.

5 DISCUSSÃO

O gênero *Plasmodium* tem se espalhado por todo o globo dado seu sucesso evolutivo. Em parte esse sucesso evolutivo é fruto da alta capacidade desse gênero a constantes mudanças e adaptações. Destaca-se que todos os membros do gênero possuem famílias variantes do tipo PIR o papel adaptativo desses genes não está claro. Em *P. falciparum* a família polimórfica dos genes *var* codifica proteínas com importante papel na evasão imune, e em função disso foi proposto que proteínas codificadas pelas demais famílias multigênicas com evidência de translocação para a hemácia infectada, incluindo PIR, tenham um papel parecido. Em *P. vivax* o papel desses genes como sendo importantes em estratégias imuno-evasivas já foi postulado (FERNANDEZ-BECERRA et al., 2009). Outros grupos tem mostrado que certos variantes VIR talvez tenham um papel na virulência de *P. vivax* (LOPES et al., 2014). Recentemente, o grupo de Mats Wahlgren mostrou um alelo RIFIN com propriedades cito-adesivos em hemácias não infectadas (GOEL et al., 2015), levando ao efeito de *rosetting* em infecções com *P. falciparum*. No entanto, pouco se sabe sobre o papel desses genes e antígenos em relação as demais espécies do gênero.

Em parasitas usados em modelos murinos o papel de genes PIR não foi totalmente elucidado. Estudos em *P. yoelii* (CUNNINGHAM et al., 2009) mostraram que o modo de expressão de genes *yir* de alguma maneira sofre *switching* rápido, sugerindo um papel de escape imunológico. Em parasitas *P. chabaudi*, resultados parecidos foram obtidos e órgãos diferentes continham parasitas com padrão diferente de transcrição *cir* (EBBINGHAUS; KRUCKEN, 2011). Estas informações levaram a opinião que especificamente proteínas BIR possam exercer um papel parecido com PfEMP1, dado o fato que *P. berghei* ANKA causa malária cerebral em camundongos C57Bl/6. Em um estudo recente foi mostrado que apenas uma pequena parcela (4%) de genes *bir* codificam proteínas alocadas em membranas de hemácias infectadas (FOUGÈRE et al., 2016).

Uma das perguntas centrais neste estudo foi se proteínas BIR e genes *bir* estão associados a determinados fenótipos de citoaderência, no caso associados a malária cerebral no modelo *P. berghei*. Para isso, testamos primeiro se alvos na hemácia infectada são reconhecidas e quando isso acontece, anticorpos direcionadas contra essas estruturas, se estes anticorpos são protetores. Como observado esse foi o caso, com menor eficiência do que o esperado. Cabe ressaltar que ocorreu desquestro considerável de hemácias infectadas em camundongos

imunizados com membranas de hemácias infectadas. Uma vez que esse processo é vital no crescimento parasitário é possível que em outras linhagens como *P. berghei* ANKA existam outros efeitos protetores associados a síndromes severas como malária cerebral (BAGOT et al., 2002, KAUL et al., 1994). O efeito imune desenvolvido foi capaz de produzir resposta humoral que reconhecesse especificamente eritrócitos infectados e reverter por 15 dias a citoadesão de formas maduras. No entanto, após 15 dias essa resposta imune sucumbiu com queda na produção de anticorpos contra GFP (que se encontrava coadministrada na hemácias resseladas), no mesmo período, efeitos observados em reversão de citoaderência também cessaram sugerindo um efeito generalizado de cessão de resposta. De maneira geral, infecções pelo gênero geram efeitos de exaustão imune (FREEMAN; SHARPE, 2012). Essa exaustão leva a anergia de células imunes, tornando infecções pelo gênero um processo crônico. Não pudemos identificar nenhuma proteína variante ligada ao processo de citoadesão ou mesmo presente em membranas de eritrocitos infectados. Dentre as proteínas encontradas observamos proteínas associadas a funções desconhecidas, porem também alguns antígenos interessantes, tal como proteínas com domínios LCCL2. Na literatura esse domínio está associado ao desenvolvimento de esporozoitos em vetores invertebrados (DESSENS et al., 2011), essa proteína possui domínios que direcionam para retículo endoplasmático e sua localização já pôde ser observada na superfície de eritrócitos infectados (SAEED et al., 2012). Conhecida como um ligante de lectina-like, dentre outras moléculas, essa proteína pode ser o potencial causador dos efeitos observados. O domínio LCCL tem homologia com proteínas de mamíferos (LIEPINSH et al., 2001; TREXLER et al., 2000;). Ainda, domínios da molécula CD14 possuem estrutura similar a LCCL, o que possibilitaria conexão com lipossacarídeos (WANG et al., 2009) e consequente ativação de receptores imunes de origem inata como receptores do tipo Toll. Por se tratar de um domínio conservado que potencialmente se liga a fatores de Von Willebrand é possível que essa proteína possa ter correlação agregação plaquetária e possível retenção como preconizado para algumas PfEMPs de *P. falciparum* em processos inflamatórios (FRANCISCHETTI et al., 2008).

Para ver a influência na expressão de genes *bir* (e ver se havia um feedback em nível de transcrição conforme ocorre com genes *var* que são controlados na transcrição por exclusão alélica (SCHERF et al., 1998; VOSS et al., 2006) propomos

a construção de dois vetores contendo o gene *gfp* ou o gene de diidrofolatoredutase de *T. gondii* (TgDHFR-TS) num vetor plasmidial que seja replicado como um cromossomo (IWANAGA et al., 2010b). Não foi possível a clonagem do vetor que continha o gene TgDHFR-TS, provavelmente pelo tamanho excessivo da construção e a grande quantidade de sequências AT ricas que impossibilitaram a propagação do plasmídeo em bactérias *E. coli*. Este efeito foi comentado no estudo que estabeleceu o vetor base C-PAC (IWANAGA et al., 2010b). A clonagem no cromossomo artificial teve como objetivo também mimetizar o contexto de outros loci *bir* cromossomais em termos de modificações de cromatina. Procedemos então com o vetor que apenas tinha o gene *gfp* controlado por um promotor *bir* e testamos a hipótese desses genes sofrerem rápida adaptação para estabelecer um ambiente colaborativo e/ou competitivo com o hospedeiro. O promotor *bir* que foi escolhido foi obtido de uma subfamília de genes *bir* com diversos membros. O gene em questão pertence a um subgrupo de grande variabilidade genética com diversidade proteica denominada I nesse estudo. A região promotora é extremamente conservada em sequência com outros *bir* e sua transcrição controle já pode ser visto em formas sanguíneas (perfil de expressão plasmoDB (OTTO et al., 2014)), critério essencial para este estudo.

Este procedimento permitiu seguir a expressão desse gene em *P. berghei*. Como teste usamos dois grupos de animais C57BL/6 isogênicos com a única diferença de uma linhagem expressar um gene *gfp* em células nucleadas. Logo, eritrócitos da linhagem C57BL/6-GFP não possuem GFP em seu interior (OKABE et al., 1997).

Criamos parasitas *P. berghei* NK65-GFP que expressam GFP de forma constitutiva (usando promotor de *elongation factor 1* da síntese protéica). No entanto nunca conseguimos uma versão com promotor variante para a linhagem *P. berghei* NK65. Acreditando que o problema pudesse ser a natureza da replicação do plasmídeo nesta linhagem, logo tentamos transfectar a mesma construção em *P. berghei* ANKA. Nessa linhagem conseguimos inserir a construção 5' UTR *pbir*:GFP. *P.berghei* ANKA é uma linhagem que sabidamente causa malária cerebral em animais C57BL/6 (KAUL et al., 1994). Verificamos que os parasitas selecionados por transfecção com o cromossomo artificial perderam a característica de causar síndromes de malária cerebral. Embora seja tentador pensar que a simples inserção de um gene controlado por uma região 5'UTR variante tenha alterado a expressão

de genes variantes codificando ligantes importantes para o fenótipo (supondo que exclusão alélica está regulando genes *bir* e que o promotor *in trans* seja capaz de *crosstalk*), essa hipótese é prematura. O efeito poderia ser facilmente explicado pelo processo de seleção durante a transfecção. Poucos parasitas são de fato manipulados na transfecção (CHRIS J JANSEN, 2006) e isso torna possível a seleção ao acaso de parasitas que naturalmente não causassem malária cerebral. Independente disso, ter um parasita que não fosse letal em curto período favoreceu nosso modelo experimental permitindo medir a evolução da parasitemia e testes de expressão do transgene.

Mimetizando apenas uma única proteína do seu hospedeiro, os parasitas *P. berghei* ANKA *pbir*:GFP foram capazes de evocar potente anergia e mesmo aumentar a circulação de células regulatórias no hospedeiro. Nos experimentos, camundongos infectados com parasitas expressando GFP em camundongos tolerantes a GFP, a anergia medida por aumento na expressão de PD-1⁺/CD62L⁺ e CD25^{high}/PD-1⁺ e CD25^{high}/LAG-3⁺ estava mais evidente que em parasitas sem expressão de GFP no mesmo camundongo tolerante a GFP. Isso sugere que a expressão seletiva de GFP por parasitas desencadeiam efeitos de exaustão clonal, por aumento de PD-1⁺ em células T CD4 gerando uma “tolerância infecciosa” (COBBOLD et al., 2009) com subsequente anergia imune. Isso é importante, pois a cronicidade de infecções pelo gênero *Plasmodium* reside potencialmente em exaustão e anergia imunológica, sendo um grande fato a ser transposto para eliminar infecções crônicas e desenvolver respostas imunes satisfatórios e esterilizantes contra o parasita (FREEMAN; SHARPE, 2012). Se extrapolarmos estes dados, genes variantes parecem ser expressos não somente em processos de virulência como os extensivamente relatados em *P. falciparum* e *P. vivax* (PORTILLO, DEL et al., 2001), mas também para extensão crônica de infecções por mecanismos diferente do propostos para proteínas PfEMP1 (MILLER et al., 2002)

Outro aspecto importante é a comprovação do efeito modulável da região 5' UTR clonada. Essa região gênica mostrou efeito modulável e mostramos que há uma tendência que isso acontece em função de modificação de cromatina. Cabe ressaltar que quando usado em *P. falciparum* essa região promoveu inicialmente a transcrição de um transgene (luciferase), mostrando que de fato se trata de um promotor funcional, porém, logo ficou reprimido de maneira forte, tal como esperado para a maioria do genes variantes de *P. falciparum* (VOSS et al., 2006).

Futuramente testaremos uma modificação do vetor utilizado para conter ainda um gene de resistência a blasticidina para ficarem selecionáveis parasitas que ainda possuem a região 5'UTR *bir* transcricionalmente ativa, semelhante ao que foi feito por Witmer et al (BRANCUCCI et al., 2014, WITMER 2014).

A expressão mimética de GFP por parasitas em camundongos C57BL/6 GFP⁺ não foi homogêneo nos parasitas. Somente uma subpopulação mantém constante a expressão desse gene enquanto as demais reprimiram esse gene. Isso é curioso pois demonstra subpopulações parasitárias numa mesma infecção com diferentes perfis de expressão gênico para genes variantes. Desse modo outras subpopulações poderiam expressar outros genes variantes tendo efeitos distintos no hospedeiro. Este efeito já foi mostrado em infecções por *P. chabaudi* onde em cada órgão a expressão de genes PIR se mostrava alterada (EBBINGHAUS; KRUCKEN, 2011; LAWTON et al., 2012)

A expressão de GFP por subpopulação permitiu que maiores parasitemias fossem alcançadas sem desencadear problemas adicionais ao hospedeiro. Nossos dados apontam que a anergia e exaustão imune podem ter sido o fator responsável por isso, tal como em outros modelos (WYKES et al., 2014; YI et al., 2010). A mímica molecular relacionada a genes variantes já foi proposta para *P. knowlesi* e proteínas KIR (PAIN et al., 2008) como mecanismo de evasão imune e é usado por varios modelos de infecção em protozooses (LUDIN et al., 2011). Dada a variação genética de famílias multigenicas em populações sob infecção natural (CHEN et al., 2011), é possível hipotetizar que parasitas numa única infecção gerem subpopulações distintas que expressem genes variantes distintos, até encontro do melhor padrão para sobrevivência em cada hospedeiro. Isso explicaria casos raros em que indivíduos possuem por anos parasitas sem nunca apresentarem sintomas (GREENWOOD et al., 2008; HOWDEN et al., 2005). Neste sentido, o parasita *P. malariae* que teve seu genoma publicado recentemente (RUTLEDGE et al., 2017) e que muitas vezes causa infecções assintomáticas, talvez seja interessante para futura análise estrutural de proteínas “MIR”.

A conexão entre subpopulações parasitárias provavelmente ocorre por meio de exossomos e existem poucos estudos que estabelecem um papel em infecções naturais. Talvez um efeito observado em pacientes ocorra não apenas por resposta imune mas também em função de exossomos. Foi observado que a transcrição de genes variantes em indivíduos infectados é altamente coordenada e não há

expressão simultânea de apenas 60 genes *var* por uma biomassa de bilhões de parasitas numa pessoa infectada (NOBLE ET AL., 2013). No nosso estudo, exovesículas demonstram potencial papel efetor. Não acreditamos que os efeitos gerados por GFP possam ser associados a secreção deliberada pelo parasita (a proteína não possuiu sinal para ser exportada ou secretada) ou liberação por lise acidental de parasitas. Os efeitos benéficos ao parasita se estabelecem rapidamente e em baixas parasitemias o que sugere um efeito modulatório e não acidental. Exossomos são grandes moduladores antiinflamatórios em infecções protozoológicas (COAKLEY et al., 2015; SCHOREY et al., 2015;) e mas também em tumores que usam anergia imune e exaustão imune para gerar microambientes propícios ao seu crescimento (ZHANG; WANG, 2015; ZHANG et al., 2015).

Em nosso modelo testamos essa possibilidade de exossomos serem o mecanismo efetor do processo observado e quando em contato com esplenócitos específicos, nossos dados apontam sugestiva diminuição de fatores pró-inflamatórios em dependência da genética do hospedeiro. Exossomos purificados puderam reduzir a produção *ex vivo* de citocinas que são sabidamente responsáveis por choque tóxico como TNF α , IL-6 e IL-17, em células esplênicas de animais GFP⁺ estimulados com exossomos de parasitas GFP⁺. Independente da genética do hospedeiro, exovesículas de parasitas que expressaram GFP foram capaz de modular respostas imunes do tipo TH2 tal como IL-2 e IL-4 com IL-10 sem grande alteração. Citocinas e respostas TH2 são típicas de padrões menos agressivos (ANTHONY et al., 2007; BERGER, 2000) e são alvos de tratamentos para diminuir a toxicidade de reações autoimunes (HELMBY, 2015) e diminuição de processos nocivos de origem inflamatória (PAUL; ZHU, 2010). Isso poderia indicar mais uma característica de modulação imune pelo parasita e merece ser investigada futuramente. O foco de usar exossomos em intervenções imunológicas tem sido objetivo de alguns grupos. O grupo de Hernando del Portillo (MARTIN-JAULAR et al., 2011) demonstrou que exossomos de *P. yoelii* contém componentes que aumentam a sobrevivência de animais desafiados após imunização com exossomos. Isso demonstra que seus usos podem ser explorados de maneira vacinal. Em outros modelos de infecção tal como *Leishmania* ou *Giardia* essas vesículas tem papel imunossupressor com potencial modulação imune de hospedeiros gerando mecanismos de “tolerância infecciosa” desencadeando processos sistêmicos (COBBOLD et al., 2009; SCHOREY et al., 2015; XING; HOGQUIST, 2012;),

podendo inclusive ser uma forma de lidar com infecções sem resistir a elas (SCHNEIDER; AYRES, 2008). A extensa localização de proteínas codificadas por genes variantes PIR no citoplasma de células infectadas (STURM et al., 2009) sugere que muitas delas podem estar alocadas em exossomos, caso já visto para proteínas do tipo YIR (SIAU et al., 2016).

Estimulado pelo sucesso de experimentos iniciais de imunização com ghosts infectados no dessequestro de hemácias infectadas em modelo murino e ainda pela eficiência de imunização com proteínas GPI ancoradas (vide anexos I e II, (FOTORAN et al., 2015b, 2016)), seguimos experiências sem uso de proteínas da superfície da hemácia infectada em modelo de camundongo e focamos no emprego de proteínas definidas relevantes para malária humana. Focamos o restante do trabalho em obter modelos vacinais contra PfRH5 por possuir características distintas dos genes variantes: 1- ser altamente conservado. 2- Ser alvo de difícil resposta imune. 3- ser sabidamente efetivo em inibir processos de reinvasão.

Tentamos transpor a baixa imunogenicidade de PfRH5 com modelos vacinais gerando proteolipossomos específicos a esse antígeno. Um modelo similar já apresentou resultados encorajadores anteriormente para malária *in vivo* e *in vitro* (vide anexos I e II, (FOTORAN et al., 2015b, 2016)). Buscamos a produção de um sistema baseado no mesmo conceito, porém, com melhora significativa. Nossos modelos anteriores são baseados na extração química de proteínas nativas de natureza desconhecida, o que gera o problema de não termos controle de qual e quanto, cada antígeno é adicionado a formulação. Em vista desse problema e dos potenciais usos de lipossomos como veículos de entrega, aprimoramos nosso sistema para que pudesse produzir qualquer proteína desejável em fusão com GPI para associação em nano-lipossomos. Incluímos domínios para sua purificação, gerando proteínas mais limpas, que se torna vantajoso em diversas aplicações.

Lipossomos são uma área de notável sucesso em biotecnologia. Desde entrega de material genético (vide anexo III) até fármacos (SERCOMBE et al., 2015), essas estruturas podem produzir efeitos direcionados em células e tecidos pela adição de ligantes em sua camada exterior. Em nosso modelo usamos esse princípio para gerar respostas humorais. Alocando proteínas no exterior de lipossomos favorecendo o encontro de células B com epítomos presentes nos antígenos, foi gerada uma resposta humoral efetiva. Conseguimos títulos altos contra as proteínas presentes nos lipossomos em animais imunizados. Mais

importante, ao purificar e usar de maneira quantificada, os IgGs de animais imunizados com PfRH5 mostraram um efeito muito comparável ao que foi alcançado após imunização com adenovírus recombinante (BUSTAMANTE et al., 2013; DOUGLAS et al., 2015). Por exemplo, enquanto o efeito inibitório observado após imunização com proteolipossomos foi de 48% inibição de crescimento para 600µg/ml, IgGs após imunização com adenovírus mostraram (média) 45% inibição na mesma concentração (DOUGLAS et al., 2011). Nossa aproximação até alcançou melhores índices de bloqueio de reinvasão que uma recente construção recombinante de PfRH5 (HJERRILD et al., 2016).

Conseguimos ainda demonstrar a eficiência da adição do domínio GPI para finalidade biotecnológica. Como prova de princípio geramos três diferentes proteínas fusionadas e todas elas apresentaram padrão similar de associação com partículas lipídicas. O uso de proteína A de *S. aureus* fusionada, é de particular interesse porque permitirá direcionar mediante anticorpos específicos para geração de lipossomos direcionáveis e será futuramente testada nesse sentido. Uma aproximação parecida foi mostrada por outros grupos (NIZARD et al., 1998), tendo a vantagem de evitar conjugações químicas covalentes (FRIEDMAN et al., 2013; TABATA et al., 2013). Imunolipossomo (como são chamados lipossomos direcionados por anticorpos) tem grande papel na busca de alvos específicos na entrega de drogas tanto em estratégias refinadas contra tumores (HOSOKAWA et al., 2003; SAEED et al., 2016) quanto contra o próprio gênero *Plasmodium* (URBÁN et al., 2011, 2015). Por carregarem um grande número de moléculas em seu interior, vesículas direcionáveis podem atingir alvos de difícil acesso, incluindo tecidos cerebrais protegidos por barreira hemato-encefálica (MARUYAMA et al., 1990; PARDRIDGE, 2007). Logo o potencial de aplicação para imunolipossomos baseados em proteína A de *S. aureus* GPI-fusionada mostra-se atrativa em múltiplos contextos e não necessita de manipulação extra, podendo ser gerado por simples coincubação de maneira controlada em quantidade e densidade de moléculas usadas (fator importante para eficiência dessas formulações)(HOSOKAWA et al., 2003).

Finalmente, o viés de uso de lipossomos vacinais foi extensivamente estudado nesta tese. A fim de unirmos estudos de caráter presente na fisiologia celular do parasita e seus reflexos em processos imunes do hospedeiro numa única

tese, deixamos esses dados de fora por estarem publicados e aqui são apresentados como apêndices.

6 CONCLUSÕES

1 - Demonstramos que antígenos em eritrócitos infectados podem exercer papel relevante em processos de controle parasitário e reversão em citoaderência.

2 - Provavelmente, antígenos BIR não exercem um papel de citoaderência. Detectamos um antígeno com domínio reminescente a LCCL2, conhecido por ser ligante celular.

3 - Provamos que uma região 5'UTR *bir in trans* é modulável em *P. berghei* em dependência do fundo genético do hospedeiro.

4 - Parasitas expressam GFP quando em hospedeiro que expressa GFP. Aparentemente, a expressão de proteínas contra quais o hospedeiro é tolerante impulsiona o desenvolvimento de anergia e produção de células regulatórias no sistema imune do hospedeiro.

5 - Demonstramos que esses efeitos são restritos a subpopulações parasitárias e que o provável meio de comunicação parasita/hospedeiro para os efeitos observados parece ser por exossomos.

6 - Criamos em paralelo um sistema de proteínas recombinantes que leve proteínas distintas a serem fusionadas a GPI.

7 - A incorporação desse domínio permite simples conjugação de proteínas a vesículas lipossomais.

8 - Se destinadas para fins vacinais contra PfRH5, essas proteínas recombinantes em associação com lipossomos permitem gerar proteolipossomos com efeito imune protetor *in vitro* contra *P. falciparum*.

REFERÊNCIAS

ABDEL-LATIF, M. S.; KHATTAB, A.; LINDENTHAL, C.; KREMSNER, P. G.; KLINKERT, M.-Q. Recognition of variant Rifin antigens by human antibodies induced during natural *Plasmodium falciparum* infections. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 7013–7021, 2002.

ANTHONY, R. M.; RUTITZKY, L. I.; URBAN, J. F.; et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 12, p. 975–987, 2007.

ASHLEY, E. A.; DHORDA, M.; FAIRHURST, R. M.; et al. Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 5, p. 411–423, 2014.

AZEVEDO, MF ; GILSON PR ; GABRIEL, H.B. ; SIMÕES RF ; ANGRISANO F ; BAUM J ; CRABB BS ; WUNDERLICH, G. . Systematic analysis of FKBP inducible degradation domain tagging strategies for the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Plos One*, v. 7, p. e40981, 2012.

AY, F.; BUNNIK, E. M.; VAROQUAUX, N.; et al. Multiple dimensions of epigenetic gene regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **BioEssays**, v. 37, n. 2, p. 182–194, 2015.

AZMI, A. S.; BAO, B.; SARKAR, F. H. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. **Cancer metastasis reviews**, v. 32, n. 3–4, p. 623–642, 2013.

BAGOT, S.; IDRISSE BOUBOU, M.; CAMPINO, S.; et al. Susceptibility to experimental cerebral malaria induced by *Plasmodium berghei* ANKA in inbred mouse strains recently derived from wild stock. **Infection and immunity**, v. 70, n. 4, p. 2049–2056, 2002.

BARGIERI, D. Y.; ANDENMATTEN, N.; LAGAL, V.; et al. Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion. **Nature Communications**, v. 4, p. 2552, 2013.

BERGER, A. Th1 and Th2 responses: what are they? **BMJ**, v. 321, n. 7258, 2000.

BOYLE, J. S.; LEW, A. M. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. **Trends Genet**, v. 11, n. 1, p. 8, 1995.

BRANCUCCI, N. M. B.; WITMER, K.; SCHMID, C.; VOSS, T. S. A var gene upstream element controls protein synthesis at the level of translation initiation in *Plasmodium falciparum*. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100183, 2014. Public Library of Science.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRIDGES, D. J.; BUNN, J.; MOURIK, J. A. VAN; et al. Rapid activation of endothelial cells enables *Plasmodium falciparum* adhesion to platelet-decorated von Willebrand factor strings. **Blood**, v. 115, n. 7, p. 1472–1474, 2010.

BUSTAMANTE, L. Y.; BARTHOLDSON, S. J.; CROSNIER, C.; et al. A full-length recombinant *Plasmodium falciparum* PfRH5 protein induces inhibitory antibodies that are effective across common PfRH5 genetic variants. **Vaccine**, v. 31, n. 2, p. 373–379, 2013.

CABRAL, F. J.; FOTORAN, W. L.; WUNDERLICH, G. Dynamic activation and repression of the *plasmodium falciparum* rif gene family and their relation to chromatin modification. **PLoS One**, v. 7, p. e29881, 2012. United States.

CABRAL, F. J.; WUNDERLICH, G. Transcriptional memory and switching in the *Plasmodium falciparum* rif gene family. **Mol Biochem Parasitol**, v. 168, p. 186–190, 2009. Netherlands.

CAMPEOTTO, I.; GOLDENZWEIG, A.; DAVEY, J.; et al. One-step design of a stable variant of the malaria invasion protein RH5 for use as a vaccine immunogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 5, p. 998–1002, 2017.

CAMPOS, J. H.; SOARES, R. P.; RIBEIRO, K.; et al. Extracellular Vesicles: Role in Inflammatory Responses and Potential Uses in Vaccination in Cancer and Infectious Diseases. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–14, 2015.

CARTER, V.; SHIMIZU, S.; ARAI, M.; et al. PbSR is synthesized in macrogametocytes and involved in formation of the malaria crystalloids. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 1560–1569, 2008.

CHAN, J.-A.; FOWKES, F. J. I.; BEESON, J. G. Surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 71, n. 19, p. 3633–3657, 2014.

CHAN, J.-A.; HOWELL, K. B.; REILING, L.; et al. Targets of antibodies against *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in malaria immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 9, p. 3227–3238, 2012.

CHEN, D. S.; BARRY, A. E.; LELIWA-SYTEK, A.; et al. A Molecular Epidemiological Study of var Gene Diversity to Characterize the Reservoir of *Plasmodium falciparum* in Humans in Africa. (A. C. Gruner, Ed.) **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16629, 2011.

CHENG, Q.; CLOONAN, N.; FISCHER, K.; et al. *stevor* and *rif* are *Plasmodium falciparum* multicopy gene families which potentially encode variant antigens. **Mol Biochem Parasitol**, v. 97, n. 1–2, p. 161–176, 1998.

CHOI, A.-R.; KIM, J.-H.; WOO, Y. H.; KIM, H. S.; YOON, S. Anti-malarial Drugs Primaquine and Chloroquine Have Different Sensitization Effects with Anti-mitotic Drugs in Resistant Cancer Cells. **Anticancer research**, v. 36, n. 4, p. 1641–1648,

2016.

CHRIS J JANSE¹, J. R. & A. P. W. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* : Article : Nature Protocols. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 346–356, 2006.

COAKLEY, G.; MAIZELS, R. M.; BUCK, A. H. Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. **Trends in parasitology**, v. 31, n. 10, p. 477–489, 2015.

COBBOLD, S. P.; ADAMS, E.; FARQUHAR, C. A.; et al. Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. , 2009.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755–766, 2006.

CRABB, B. S.; COWMAN, A. F. *Plasmodium falciparum* virulence determinants unveiled. **Genome biology**, v. 3, n. 11, p. REVIEWS1031, 2002.

CRAIG, A. G.; GRAU, G. E.; JANSE, C.; et al. The Role of Animal Models for Research on Severe Malaria. (G. F. Rall, Ed.) **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002401, 2012.

CUNNINGHAM, D. A.; JARRA, W.; KOERNIG, S.; et al. Host immunity modulates transcriptional changes in a multigene family (yir) of rodent malaria. **Mol Microbiol**, v. 58, n. 3, p. 636–647, 2005.

CUNNINGHAM, D.; FONAGER, J.; JARRA, W.; et al. Rapid changes in transcription profiles of the *Plasmodium yoelii* yir multigene family in clonal populations: lack of epigenetic memory? **PLoS One**, v. 4, n. 1, p. e4285, 2009.

DAVID, P. H.; HOMMEL, M.; MILLER, L. H.; UDEINYA, I. J.; OLIGINO, L. D. Parasite sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 16, p. 5075–5079, 1983.

DESSENS, J. T.; SAEED, S.; TREMP, A. Z.; CARTER, V. Malaria crystalloids: specialized structures for parasite transmission? **Trends in parasitology**, v. 27, n. 3, p. 106–110, 2011.

DOUGLAS, A. D.; BALDEVIANO, G. C.; LUCAS, C. M.; et al. A PfRH5-based vaccine is efficacious against heterologous strain blood-stage *Plasmodium falciparum* infection in aotus monkeys. **Cell host & microbe**, v. 17, n. 1, p. 130–139, 2015.

DOUGLAS, A. D.; WILLIAMS, A. R.; ILLINGWORTH, J. J.; et al. The blood-stage malaria antigen PfRH5 is susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody. **Nature communications**, v. 2, p. 601, 2011.

DRUGS, I. et al. **The parasite, the mosquito, and the disease**. New York: Elsevier, 2004. 450 p.

EBBINGHAUS, P.; KRUCKEN, J. Characterization and tissue-specific expression patterns of the *Plasmodium chabaudi* cir multigene family. **Malar J**, v. 10, p. 272, 2011.

EPIPHANIO, S.; MIKOLAJCZAK, S. A.; GONÇALVES, L. A.; et al. Heme oxygenase-1 is an anti-inflammatory host factor that promotes murine plasmodium liver infection. **Cell host & microbe**, v. 3, n. 5, p. 331–8, 2008.

FERNANDEZ-BECERRA, C.; YAMAMOTO, M. M.; VÊNCIO, R. Z. N.; et al. *Plasmodium vivax* and the importance of the subtelomeric multigene vir superfamily. **Trends in parasitology**, v. 25, n. 1, p. 44–51, 2009.

FONAGER, J.; CUNNINGHAM, D.; JARRA, W.; et al. Transcription and alternative splicing in the yir multigene family of the malaria parasite *Plasmodium y. yoelii*: identification of motifs suggesting epigenetic and post-transcriptional control of RNA expression. **Mol Biochem Parasitol**, v. 156, n. 1, p. 1–11, 2007.

FONAGER, J.; PASINI, E. M.; BRAKS, J. A. M.; et al. Reduced CD36-dependent tissue sequestration of *Plasmodium* -infected erythrocytes is detrimental to malaria parasite growth in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 1, p. 93–107, 2012.

FOTORAN, W. L.; COLHONE, M. C.; CIANCAGLINI, P.; STABELI, R. G.; WUNDERLICH, G. Merozoite-Protein Loaded Liposomes Protect against Challenge in Two Murine Models of *Plasmodium* Infection. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 2, n. 12, p. 2276–2286, 2016.

FOTORAN, W. L.; SANTANGELO, R. M.; MEDEIROS, M. M.; et al. Liposomes loaded with *P. falciparum* merozoite-derived proteins are highly immunogenic and produce invasion-inhibiting and anti-toxin antibodies. **Journal of Controlled Release**, v. 217, p. 121–127, 2015a.

FOTORAN, W. L.; SANTANGELO, R. M.; MEDEIROS, M. M.; et al. Liposomes loaded with *P. falciparum* merozoite-derived proteins are highly immunogenic and produce invasion-inhibiting and anti-toxin antibodies. **Journal of Controlled Release**, v. 217, p. 121–127, 2015b.

FOUGÈRE, A.; JACKSON, A. P.; BECHTSL, D. P.; et al. Variant Exported Blood-Stage Proteins Encoded by *Plasmodium* Multigene Families Are Expressed in Liver Stages Where They Are Exported into the Parasitophorous Vacuole. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 11, p. e1005917, 2016.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; SEYDEL, K. B.; MONTEIRO, R. Q. Blood coagulation, inflammation, and malaria. **Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)**, v. 15, n. 2, p. 81–107, 2008.

FRANKE-FAYARD, B.; FONAGER, J.; BRAKS, A.; KHAN, S. M.; JANSE, C. J. Sequestration and Tissue Accumulation of Human Malaria Parasites: Can We Learn Anything from Rodent Models of Malaria? (M. Manchester, Ed.) **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, p. e1001032, 2010.

FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. A new therapeutic strategy for malaria: targeting T cell exhaustion. **Nature Immunology**, v. 13, n. 2, p. 113–115, 2012.

FREITAS-JUNIOR, L. H.; BOTTIUS, E.; PIRRI, L. A.; et al. Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. **Nature**, v. 407, n. 6807, p. 1018–1022, 2000.

FRIEDMAN, A. D.; CLAYPOOL, S. E.; LIU, R. The smart targeting of nanoparticles. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 35, p. 6315–29, 2013.

GOEL, S.; PALMKVIST, M.; MOLL, K.; et al. RIFINs are adhesins implicated in severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature Medicine**, v. 21, n. 4, p. 314–317, 2015.

GRAILLE, M.; STURA, E. A.; CORPER, A. L.; et al. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 10, p. 5399–5404, 2000.

GREENWOOD, T.; VIKERFORS, T.; SJÖBERG, M.; SKEPPNER, G.; FÄRNERT, A. Febrile *Plasmodium falciparum* Malaria 4 Years after Exposure in a Man with Sickle Cell Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 4, p. e39–e41, 2008.

HA, D.; YANG, N.; NADITHE, V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 6, n. 4, p. 287–296, 2016.

HAY, S. I.; OKIRO, E. A.; GETHING, P. W.; et al. Estimating the Global Clinical Burden of *Plasmodium falciparum* Malaria in 2007. (I. Mueller, Ed.) **PLoS Medicine**, v. 7, n. 6, p. e1000290, 2010.

HEIBER, A.; KRUSE, F.; PICK, C.; et al. Identification of new PNEPs indicates a substantial non-PEXEL exportome and underpins common features in *Plasmodium falciparum* protein export. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 8, p. e1003546, 2013.

HEINBERG, A.; SIU, E.; STERN, C.; et al. Direct evidence for the adaptive role of copy number variation on antifolate susceptibility in *Plasmodium falciparum*. **Molecular microbiology**, v. 88, n. 4, p. 702–712, 2013.

HEINTZELMAN, M. B. Gliding motility in apicomplexan parasites. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 46, p. 135–142, 2015.

HELMBY, H. Human helminth therapy to treat inflammatory disorders - where do we stand? **BMC immunology**, v. 16, p. 12, 2015.

HILLER, N. L.; BHATTACHARJEE, S.; OOIJ, C. VAN; et al. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. **Science**, v. 306, n. 5703, p. 1934–1937, 2004.

HJERRILD, K. A.; JIN, J.; WRIGHT, K. E.; et al. Production of full-length soluble *Plasmodium falciparum* RH5 protein vaccine using a *Drosophila melanogaster* Schneider 2 stable cell line system. **Scientific Reports**, v. 6, p. 30357, 2016.

HOSOKAWA, S.; TAGAWA, T.; NIKI, H.; et al. Efficacy of immunoliposomes on cancer models in a cell-surface-antigen-density-dependent manner. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 8, p. 1545–1551, 2003.

HOWDEN, B. P.; VADDADI, G.; MANITTA, J.; GRAYSON, M. L. Chronic falciparum malaria causing massive splenomegaly 9 years after leaving an endemic area. **The Medical journal of Australia**, v. 182, n. 4, p. 186–188, 2005.

HOWITT, C. A.; WILINSKI, D.; LLINAS, M.; et al. Clonally variant gene families in *Plasmodium falciparum* share a common activation factor. **Mol Microbiol**, v. 73, n. 6, p. 1171–1185, 2009.

IIJIMA, M.; KADOYA, H.; HATAHIRA, S.; et al. Nanocapsules incorporating IgG Fc-binding domain derived from *Staphylococcus aureus* protein A for displaying IgGs on immunosensor chips. **Biomaterials**, v. 32, n. 6, p. 1455–1464, 2011.

IRVINE, D. J. Drug delivery: One nanoparticle, one kill. **Nature Materials**, v. 10, n. 5, p. 342–343, 2011.

IWANAGA, S.; KHAN, S. M.; KANEKO, I.; et al. Functional identification of the *Plasmodium* centromere and generation of a *Plasmodium* artificial chromosome. **Cell host & microbe**, v. 7, n. 3, p. 245–255, 2010a.

IWANAGA, S.; KHAN, S. M.; KANEKO, I.; et al. Functional identification of the *Plasmodium* centromere and generation of a *Plasmodium* artificial chromosome. **Cell host & microbe**, v. 7, n. 3, p. 245–255, 2010b.

JANSE, C. J.; FRANKE-FAYARD, B.; WATERS, A. P. Selection by flow-sorting of genetically transformed, GFP-expressing blood stages of the rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 614–623, 2006.

JANSSEN, C. S.; PHILLIPS, R. S.; TURNER, C. M. R.; BARRETT, M. P. *Plasmodium* interspersed repeats: the major multigene superfamily of malaria parasites. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 19, p. 5712–5720, 2004.

JOANNIN, N.; ABHIMAN, S.; SONNHAMMER, E. L.; WAHLGREN, M. Sub-grouping and sub-functionalization of the RIFIN multi-copy protein family. **BMC Genomics**, v. 9, p. 19, 2008.

JOERGENSEN, L.; BENGTSSON, D. C.; BENGTSSON, A.; et al. Surface co-expression of two different PfEMP1 antigens on single *plasmodium falciparum*-infected erythrocytes facilitates binding to ICAM1 and PECAM1. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 9, p. e1001083, 2010.

KAFSACK, B. F. C.; ROVIRA-GRAELLS, N.; CLARK, T. G.; et al. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. **Nature**, v.

507, n. 7491, p. 248–252, 2014.

KAUL, D. K.; NAGEL, R. L.; LLENA, J. F.; SHEAR, H. L. Cerebral malaria in mice: demonstration of cytoadherence of infected red blood cells and microrheologic correlates. **Am J Trop Med Hyg**, v. 50, n. 4, p. 512–521, 1994.

KHAN, D. R.; WEBB, M. N.; CADOTTE, T. H.; GAVETTE, M. N. Use of Targeted Liposome-based Chemotherapeutics to Treat Breast Cancer. **Breast cancer : basic and clinical research**, v. 9, n. Suppl 2, p. 1–5, 2015.

KLEIN, E. Y.; GRAHAM, A. L.; LLINÁS, M.; LEVIN, S. Cross-reactive immune responses as primary drivers of malaria chronicity. **Infection and immunity**, v. 82, n. 1, p. 140–151, 2014.

KRAEMER, S. M.; SMITH, J. D. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 1–7, 2006.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. **J Parasitol**, v. 65, n. 3, p. 418–420, 1979.

LAWTON, J.; BRUGAT, T.; YAN, Y. X.; et al. Characterization and gene expression analysis of the cir multi-gene family of Plasmodium chabaudi chabaudi (AS). **BMC genomics**, v. 13, p. 125, 2012.

LEECH, J. H.; BARNWELL, J. W.; MILLER, L. H.; HOWARD, R. J. Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 159, n. 6, p. 1567–1575, 1984.

LIEPINSH, E.; TREXLER, M.; KAIKKONEN, A.; et al. NMR structure of the LCCL domain and implications for DFNA9 deafness disorder. **The EMBO journal**, v. 20, n. 19, p. 5347–5353, 2001.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LJUNGQUIST, C.; JANSSON, B.; MOKS, T.; UHLEN, M. Thiol-directed immobilization of recombinant IgG-binding receptors. **European Journal of Biochemistry**, v. 186, n. 3, p. 557–561, 1989.

LONGLEY, R. J.; HILL, A. V. S.; SPENCER, A. J. Malaria vaccines: identifying Plasmodium falciparum liver-stage targets. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 965, 2015.

LOPES, S. C. P.; ALBRECHT, L.; CARVALHO, B. O.; et al. Paucity of Plasmodium vivax Mature Schizonts in Peripheral Blood Is Associated With Their Increased Cytoadhesive Potential. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 9, p. 1403–1407, 2014.

LOPEZ-RUBIO, J.-J.; SIEGEL, T. N.; SCHERF, A. Genome-wide Chromatin Immunoprecipitation-Sequencing in Plasmodium. . p.321–333, 2012.

LUDIN, P.; NILSSON, D.; MÄSER, P. Genome-wide identification of molecular mimicry candidates in parasites. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17546, 2011.

MAÇON-LEMAÎTRE, L.; TRIEBEL, F. The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells. **Immunology**, v. 115, n. 2, p. 170–178, 2005.

MANTEL, P.-Y.; HOANG, A. N.; GOLDOWITZ, I.; et al. Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. **Cell host & microbe**, v. 13, n. 5, p. 521–534, 2013.

MANTEL, P.-Y.; MARTI, M. The role of extracellular vesicles in Plasmodium and other protozoan parasites. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 3, p. 344–354, 2014.

MARTI, M.; GOOD, R. T.; RUG, M.; KNUEPFER, E.; COWMAN, A. F. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. **Science**, v. 306, n. 5703, p. 1930–1933, 2004.

MARTIN-JAULAR, L.; NAKAYASU, E. S.; FERRER, M.; et al. Exosomes from Plasmodium yoelii-Infected Reticulocytes Protect Mice from Lethal Infections. (L. Réna, Ed.)**PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e26588, 2011.

MARUYAMA, K.; KENNEL, S. J.; HUANG, L. Lipid composition is important for highly efficient target binding and retention of immunoliposomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 15, p. 5744–5748, 1990.

MCKINNEY, E. F.; LEE, J. C.; JAYNE, D. R. W.; LYONS, P. A.; SMITH, K. G. C. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. **Nature**, v. 523, n. 7562, p. 612–616, 2015.

MERRICK, C. J.; DURASINGH, M. T. Epigenetics in Plasmodium: what do we really know? **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 8, p. 1150–1158, 2010.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673–679, 2002

MIURA, K. Progress and prospects for blood-stage malaria vaccines. **Expert review of vaccines**, v. 15, n. 6, p. 765–781, 2016..

MOLL, K.; LJUNGSTRÖM, I.; PERLMANN, H. METHODS IN MALARIA RESEARCH. , p. 20110–2209, 2008.

MORAES, L. V. DE; DECHAVANNE, S.; SOUSA, P. M.; et al. Murine Model for Preclinical Studies of Var2CSA-Mediated Pathology Associated with Malaria in Pregnancy. (J. H. Adams, Ed.)**Infection and Immunity**, v. 84, n. 6, p. 1761–1774, 2016.

NIZARD, P.; LIGER, D.; GAILLARD, C.; GILLET, D. Anchoring antibodies to membranes using a diphtheria toxin T domain-ZZ fusion protein as a pH sensitive membrane anchor. **FEBS Letters**, v. 433, n. 1, p. 83–88, 1998.

NOBLE, R.; CHRISTODOULOU, Z.; KYES, S.; et al. The antigenic switching network of *Plasmodium falciparum* and its implications for the immuno-epidemiology of malaria. **eLife**, v. 2, p. e01074, 2013.

O'DONNELL, A. J.; SCHNEIDER, P.; MCWATTERS, H. G.; REECE, S. E. Fitness costs of disrupting circadian rhythms in malaria parasites. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1717, p. 2429–2436, 2011

OKABE, M.; IKAWA, M.; KOMINAMI, K.; NAKANISHI, T.; NISHIMUNE, Y. “Green mice” as a source of ubiquitous green cells. **FEBS letters**, v. 407, n. 3, p. 313–319, 1997.

OTTO, T. D.; BÖHME, U.; JACKSON, A. P.; et al. A comprehensive evaluation of rodent malaria parasite genomes and gene expression. **BMC Biology**, v. 12, n. 1, p. 86, 2014.

PAIN, A.; BÖHME, U.; BERRY, A. E.; et al. The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. **Nature**, v. 455, n. 7214, p. 799–803, 2008.

PAINTER, H. J.; CAMPBELL, T. L.; LLINÁS, M. The Apicomplexan AP2 family: integral factors regulating *Plasmodium* development. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 176, n. 1, p. 1–7, 2011.

PARDRIDGE, W. M. Blood-brain barrier delivery of protein and non-viral gene therapeutics with molecular Trojan horses. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 122, n. 3, p. 345–348, 2007.

PAUL, W. E.; ZHU, J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 4, p. 225–235, 2010.

PEREZ-MAZLIAH, D.; LANGHORNE, J. CD4 T-cell subsets in malaria: TH1/TH2 revisited. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 671, 2014.

PORTILLO, H. A. DEL; FERNANDEZ-BECERRA, C.; BOWMAN, S.; et al. A superfamily of variant genes encoded in the subtelomeric region of *Plasmodium vivax*. **Nature**, v. 410, n. 6830, p. 839–842, 2001.

RAIMONDI, G.; SHUFESKY, W. J.; TOKITA, D.; MORELLI, A. E.; THOMSON, A. W. Regulated Compartmentalization of Programmed Cell Death-1 Discriminates CD4+CD25+ Resting Regulatory T Cells from Activated T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, 2006.

RAHIMI, B.; THAKKINSTIAN, A.; WHITE, N. J.; et al. Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 481, 2014.

REDDY, K. S.; AMLABU, E.; PANDEY, A. K.; et al. Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 4, p. 1179–1184, 2015.

REGEV-RUDZKI, N.; WILSON, D. W.; CARVALHO, T. G.; et al. Cell-Cell Communication between Malaria-Infected Red Blood Cells via Exosome-like Vesicles. **Cell**, v. 153, n. 5, p. 1120–1133, 2013.

RIBAUT, C.; BERRY, A.; CHEVALLEY, S.; et al. Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human *Plasmodium* species. **Malaria journal**, v. 7, p. 45, 2008.

RUTLEDGE, G. G.; BÖHME, U.; SANDERS, M.; et al. *Plasmodium malariae* and *P. ovale* genomes provide insights into malaria parasite evolution. **Nature**, v. 542, n. 7639, p. 101–104, 2017.

SAEED, M.; BRAKEL, M. VAN; ZALBA, S.; et al. Targeting melanoma with immunoliposomes coupled to anti-MAGE A1 TCR-like single-chain antibody. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 955, 2016.

SAEED, S.; TREMP, A. Z.; DESSENS, J. T. Conformational co-dependence between *Plasmodium berghei* LCCL proteins promotes complex formation and stability. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 185, n. 2, p. 170–173, 2012.

SALCEDO-AMAYA, A. M.; DRIEL, M. A. VAN; ALAKO, B. T.; et al. Dynamic histone H3 epigenome marking during the intraerythrocytic cycle of *Plasmodium falciparum*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, p. 9655–9660, 2009. United States.

SAM-YELLOWE, T. Y.; FLORENS, L.; JOHNSON, J. R.; et al. A *Plasmodium* gene family encoding Maurer's cleft membrane proteins: structural properties and expression profiling. **Genome Res**, v. 14, n. 6, p. 1052–1059, 2004.

SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. CSHL Press, 1991.

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**, v. 17, n. 18, p. 5418–5426, 1998.

SCHNEIDER, D. S.; AYRES, J. S. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 11, p. 889–895, 2008.

SCHOREY, J. S.; CHENG, Y.; SINGH, P. P.; SMITH, V. L. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. **EMBO reports**, v. 16, n. 1, p. 24–43, 2015.

SCHWARTZ, L.; BROWN, G. V.; GENTON, B.; et al. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 11, 2012.

SCHWENDENER, R. A. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. **Therapeutic Advances in Vaccines**, v. 2, n. 6, p. 159–182, 2014.

SERCOMBE, L.; VEERATI, T.; MOHEIMANI, F.; et al. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 286, 2015.

SERCUNDES, M. K.; ORTOLAN, L. S.; DEBONE, D.; et al. Targeting Neutrophils to Prevent Malaria-Associated Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome in Mice. (C. R. Engwerda, Ed.) **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 12, p. e1006054, 2016.

SIAU, A.; HUANG, X.; WENG, M.; SZE, S. K.; PREISER, P. R. Proteome mapping of Plasmodium: identification of the P. yoelii remodelome. **Scientific reports**, v. 6, p. 31055, 2016.

SIDIK, S. M.; HUET, D.; GANESAN, S. M.; et al. A Genome-wide CRISPR Screen in Toxoplasma Identifies Essential Apicomplexan Genes. **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1423–1435.e12, 2016.

SINGH, P. K.; DEVASAHAYAM, M.; DEVI, S. Expression of GPI anchored human recombinant erythropoietin in CHO cells is devoid of glycosylation heterogeneity. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 53, p. 195–201, 2015.

SPALTER, S. H.; KAVERI, S. V.; BONNIN, E.; et al. Normal Human Serum Contains Natural Antibodies Reactive With Autologous ABO Blood Group Antigens. **Blood**, v. 93, n. 12, 1999.

SPENCE, P. J.; JARRA, W.; LÉVY, P.; et al. Vector transmission regulates immune control of Plasmodium virulence. **Nature**, v. 498, n. 7453, p. 228–231, 2013.

STURM, A.; AMINO, R.; SAND, C. VAN DE; et al. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 2006.

STURM, A.; GRAEWE, S.; FRANKE-FAYARD, B.; et al. Alteration of the Parasite Plasma Membrane and the Parasitophorous Vacuole Membrane during Exo-Erythrocytic Development of Malaria Parasites. **Protist**, v. 160, n. 1, p. 51–63, 2009.

SU, X. Z.; HEATWOLE, V. M.; WERTHEIMER, S. P.; et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **Cell**, v. 82, p. 89–100, 1995. United States.

SULTAN, A. A.; THATHY, V.; NUSSENZWEIG, V.; MÉNARD, R. Green fluorescent protein as a marker in Plasmodium berghei transformation. **Infection and immunity**, v. 67, n. 5, p. 2602–2606, 1999.

TABATA, A.; OHKUBO, Y.; TAMURA, M.; et al. Construction of an improved drug delivery system tool with enhanced versatility in cell-targeting. **Anticancer research**, v. 33, n. 7, p. 2905–2910, 2013.

TARIQUE, M.; AHMAD, M.; ANSARI, A.; TUTEJA, R. Plasmodium falciparum DOZI, an RNA helicase interacts with eIF4E. **Gene**, v. 522, n. 1, p. 46–59, 2013.

THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nature Reviews Immunology**, Published online: 01 August 2002; | doi:10.1038/nri855, v. 2, n. 8, p. 569, 2002.

TRAVASSOS, M. A.; NIANGALY, A.; BAILEY, J. A.; et al. Seroreactivity to Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 Intracellular Domain in Malaria-Exposed Children and Adults. **J Infect Dis**. N1;208(9):1514-1519, 2013

TREXLER, M.; BÁNYAI, L.; PATTHY, L. The LCCL module. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 18, p. 5751–5757, 2000.

URBÁN, P.; ESTELRICH, J.; ADEVA, A.; CORTÉS, A.; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X. Study of the efficacy of antimalarial drugs delivered inside targeted immunoliposomal nanovectors. **Nanoscale research letters**, v. 6, n. 1, p. 620, 2011.

URBÁN, P.; RANUCCI, E.; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X. Polyamidoamine nanoparticles as nanocarriers for the drug delivery to malaria parasite stages in the mosquito vector. **Nanomedicine**, v. 10, n. 22, p. 3401–3414, 2015.

VOSS, T. S.; HEALER, J.; MARTY, A. J.; et al. A var gene promoter controls allelic exclusion of virulence genes in Plasmodium falciparum malaria. **Nature**, v. 439, n. 7079, p. 1004–1008, 2005.

VOSS, T. S.; HEALER, J.; MARTY, A. J.; et al. A var gene promoter controls allelic exclusion of virulence genes in Plasmodium falciparum malaria. **Nature**. v. 439, p.1004–1008, 2006. England.

WANG, Z.-Q.; XING, W.-M.; FAN, H.-H.; et al. The Novel Lipopolysaccharide-Binding Protein CRISPLD2 Is a Critical Serum Protein to Regulate Endotoxin Function. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6646–6656, 2009. WHO | World Malaria Report 2016. .WHO, 2016. World Health Organization.

WINOGRAD, E.; EDA, S.; SHERMAN, I. W. Chemical modifications of band 3 protein affect the adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to CD36. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 136, n. 2, p. 243–248, 2004.

WRIGHT, G. J.; RAYNER, J. C. Plasmodium falciparum erythrocyte invasion: combining function with immune evasion. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 3, p. e1003943, 2014.

WYKES, M. N.; HORNE-DEBETS, J. M.; LEOW, C.-Y.; KARUNARATHNE, D. S. Malaria drives T cells to exhaustion. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 249, 2014.
XING, Y.; HOGQUIST, K. A. T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. **Cold Spring**

Harbor Perspectives in Biology, v. 4, n. 6, p. a006957–a006957, 2012.

YI, J. S.; COX, M. A.; ZAJAC, A. J. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. **Immunology**, v. 129, n. 4, p. 474–481, 2010.

ZHANG, X.; YUAN, X.; SHI, H.; et al. Exosomes in cancer: small particle, big player. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 8, n. 1, p. 83, 2015. ZHANG, Y.; WANG, X.-F. A niche role for cancer exosomes in metastasis. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 6, p. 709–711, 2015.

Lista se genes usados

Lista se genes relativos as sequencias analisadas a região 5' UTR clonada como promotor Bir:GFP se encontra em amarelo e consta no grupo mais variavel em sequencia proteica denominado I.

Seq 1	PBANKA_010050	Seq 41	PBANKA_072240	Seq 80	PBANKA_124680]
Seq 2	PBANKA_020010	Seq 42	PBANKA_072250	Seq 81	PBANKA_124690
Seq 3	PBANKA_020030	Seq 43	PBANKA_072270	Seq 82	PBANKA_124700
Seq 4	PBANKA_020050	Seq 44	PBANKA_072290	Seq 83	PBANKA_130010
Seq 5	PBANKA_020110	Seq 45	PBANKA_072300	Seq 84	PBANKA_130020
Seq 6	PBANKA_021500	Seq 46	PBANKA_080010	Seq 85	PBANKA_130040
Seq 7	PBANKA_021570	Seq 47	PBANKA_083685	Seq 86	PBANKA_136570
Seq 8	PBANKA_021590	Seq 48	PBANKA_083690	Seq 87	PBANKA_140010
Seq 9	PBANKA_021600	Seq 49	PBANKA_083700	Seq 88	PBANKA_140020
Seq 10	PBANKA_021610	Seq 50	PBANKA_090020	Seq 89	PBANKA_140030
Seq 11	PBANKA_021620	Seq 51	PBANKA_090030	Seq 90	PBANKA_140050
Seq 12	PBANKA_030010	Seq 52	PBANKA_090040	Seq 91	PBANKA_146520
Seq 13	PBANKA_030020	Seq 53	PBANKA_090050	Seq 92	PBANKA_146530
Seq 14	PBANKA_030030	Seq 54	PBANKA_090060	Seq 93	PBANKA_146550
Seq 15	PBANKA_030040	Seq 55	PBANKA_090070	Seq 94	PBANKA_146560
Seq 16	PBANKA_030050	Seq 56	PBANKA_094380	Seq 95	PBANKA_146580
Seq 17	PBANKA_031640	Seq 57	PBANKA_094390	Seq 96	PBANKA_146590
Seq 18	PBANKA_031690	Seq 58	PBANKA_094400	Seq 97	PBANKA_146600
Seq 19	PBANKA_040010	Seq 59	PBANKA_104020	Seq 98	PBANKA_146610
Seq 20	PBANKA_040020	Seq 60	PBANKA_104040	Seq 99	PBANKA_000010
Seq 21	PBANKA_010050	Seq 61	PBANKA_104050	Seq100	PBANKA_000030
Seq 22	PBANKA_020010	Seq 62	PBANKA_110030	Seq101	PBANKA_000050
Seq 23	PBANKA_020030	Seq 63	PBANKA_110040	Seq102	PBANKA_000060
Seq 24	PBANKA_020050	Seq 64	PBANKA_110060	Seq103	PBANKA_000090
Seq 25	PBANKA_020110	Seq 65	PBANKA_110080	Seq104	PBANKA_000100
Seq 26	PBANKA_021570	Seq 66	PBANKA_110085	Seq105	PBANKA_000130
Seq 27	PBANKA_021590	Seq 67	PBANKA_11463	Seq106	PBANKA_000140
Seq 28	PBANKA_021600	Seq 68	PBANKA_114640	Seq107	PBANKA_000150
Seq 29	PBANKA_021610	Seq 69	PBANKA_114650	Seq108	PBANKA_000170
Seq 30	PBANKA_021620	Seq 70	PBANKA_114670	Seq109	PBANKA_000190
Seq 31	PBANKA_030010	Seq 71	PBANKA_120010	Seq110	PBANKA_000200
Seq 32	PBANKA_030020	Seq 72	PBANKA_120030	Seq111	PBANKA_000240
Seq 33	PBANKA_030030	Seq 73	PBANKA_120040	Seq112	PBANKA_000250
Seq 34	PBANKA_030040	Seq 74	PBANKA_120050	Seq113	PBANKA_000260
Seq 35	PBANKA_030050	Seq 75	PBANKA_124595	Seq114	PBANKA_000290
Seq 36	PBANKA_031640	Seq 76	PBANKA_124630	Seq115	PBANKA_000300
Seq 37	PBANKA_031690	Seq 77	PBANKA_124640	Seq116	PBANKA_000310
Seq 38	PBANKA_040010	Seq 78	PBANKA_124650	Seq117	PBANKA_000320
Seq 39	PBANKA_040020	Seq 79	PBANKA_124670	Seq118	PBANKA_000330
Seq 40	PBANKA_072220				

Seq119 PBANKA_000340
Seq120 PBANKA_000360
Seq121 PBANKA_000380
Seq122 PBANKA_000390
Seq123 PBANKA_000410
Seq124 PBANKA_000420
Seq125 PBANKA_000430
Seq126 PBANKA_000440
Seq127 PBANKA_000460
Seq128 PBANKA_000470
Seq129 PBANKA_000480
Seq130 PBANKA_000530
Seq131 PBANKA_000540
Seq132 PBANKA_000570
Seq133 PBANKA_000580
Seq134 PBANKA_000600
Seq135 PBANKA_000630
Seq136 PBANKA_000640
Seq137 PBANKA_001030

Artigos Publicados no período

Liposomes loaded with *P. falciparum* merozoite-derived proteins are highly immunogenic and produce invasion-inhibiting and anti-toxin antibodies

Wesley L. Fotoran, Rachele M. Santangelo, Márcia M. Medeiros, Marcelle Colhone, Pietro Ciancaglini, Renato Barboza, Claudio Romero Farias Marinho, Rodrigo Guerino Stábili, Gerhard Wunderlich*

Institute of Biomedical Sciences, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 July 2015

Accepted 24 August 2015

Available online 31 August 2015

Keywords:

Proteoliposome

PRH5

Plasmodium falciparum

GPI merozoite antigens

ABSTRACT

The formulation of an effective vaccine against malaria is still a significant challenge and the induction of high anti-parasite antibody titers plus a sustained T cell response is mandatory for the success of such a vaccine. We have developed a nanoliposome-based structure which contains plasma membrane-associated proteins (PfMNP) of *Plasmodium falciparum* merozoites on its surface. Incorporation of parasite-derived proteins led to a significant increase in the size and dispersity of particles. Immunization of particles in BalbC and C57BL/6 mice led to high anti-MSP1₁₉ IgG titers (10^4) after the first dose and reached a plateau ($>10^6$) after the third dose. While very high titers were observed against the C-terminal domain of the vaccine candidate MSP1, only modest titers ($\leq 10^3$) were detected against MSP2. The induced antibodies showed also a strong growth-inhibiting effect in reinvasion assays. In addition, PfMNP immunization generated antibodies which partially blocked the inflammatory response, probably by blocking TLR-induced activation of macrophages by malarial toxins such as GPI anchors. The results underline the potential of nanoliposome-based formulations as anti-malarial vaccines.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The induction of immunity by vaccine administration is the main avenue to prevent a number of infectious diseases caused by viruses, bacteria and other pathogens. This is achieved with success by using either attenuated or dead whole organisms, or recombinant components thereof. The employment of vaccines against parasitic diseases such as malaria, American or African trypanosomiasis and schistosomiasis and others, however, has been hampered in part by the lack of definition which antigen or life form of the parasites generates a protective response. In the case of malaria, caused by blood stage forms of the protozoan *Plasmodium*, many antigens were identified against which a significant humoral response seems important for non-sterile protection [1]. On the other hand, the administration of single or even groups of recombinant antigens in a number of different adjuvant systems so far yielded promising but not sufficiently satisfying results when tested in human volunteers [2] or even populations [3], reviewed in [4]. A promising approach to the delivery of antigens or pharmaceutical active compounds is their packaging in nanometer-sized particles consisting of a differing composition of phospholipid esters and/or sterols

(reviewed by A.E. Gregory, et al. [5]). This approach is not only useful for targeting of determined antigens, RNA or drugs to distinct compartments such as dendritic cells [6] or tumor tissue [7] but also for the bulk presentation of pathogen-associated antigens, such as the protozoan parasite *Leishmania* [8]. One feature of artificial loading of lipid-based nanoparticles using bulk pathogen material is that a number of antigens may be excluded while other antigens, mainly glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored proteins, can be enriched. In the case of *Plasmodium*, many of the most abundant surface proteins of the red blood cell invasive form are not only GPI-anchored [9], but they are also considered vaccine antigens such as MSP1 and MSP2. Importantly, the concomitant induction of antibodies against protein structures as well as pro-inflammatory GPI-moieties may result in the simultaneous generation of invasion-inhibiting and inflammation-modulating antibodies, similar to what happens in semi-immune patients [10,11]. Here, we show that merozoite derived GPI-anchored proteins can be loaded efficiently onto liposomes. The proteoliposome formulations are highly immunogenic and generate antibodies which recognize native structures with invasion-inhibitory potential. Additionally, preincubation of parasite lysates with proteoliposome-induced antisera significantly decreased the generation of proinflammatory cytokines and markers in culture macrophages suggesting an anti-toxic side effect of this strategy [12].

* Corresponding author.

E-mail address: gwunder@usp.br (G. Wunderlich).

2. Material and methods

2.1. *P. falciparum* culture and growth inhibition assays

P. falciparum merozoites were cultured at 37 °C in RPMI medium containing 0.5% Albumax I (Life Technologies) in candle jars as described [13]. Synchronization of parasite blood stage forms was achieved by subsequent plasmagel flotation [14] followed by sorbitol lysis [15]. Growth inhibition assays were conducted in triplicate in 100 µl culture volumes at 3% hematocrit starting with >1% mostly trophozoite stage parasites supplementing the culture medium with 1:10 diluted sera from non-immune mice or from proteoliposome immunized mice. Parasitemias were counted by cytometry using ethidium-bromide stained culture material after 24 h and 48 h growth as described previously [16] and the growth inhibition was computed by comparing parasitemias of the pre-immune mice sera treated parasites versus the immunized mice sera treated parasites.

2.2. Preparation and solubilization of GPI-anchored protein from *P. falciparum* merozoites

Late schizont stage parasites already showing merozoites were lysed for 10 min at RT 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.25 containing 10 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ and 0.1% saponin and washed twice in the same buffer. Parasite pellets were obtained by centrifugation at 1200 g for 15 min, and these were kept at –80 °C until required. Then, the frozen merozoites pellets were resuspended in the same buffer without saponin, and sonified at 4 °C during 30 s at 240 W, centrifuged at 1000 g for the sedimentation of organelles, nuclei and intact cells, which were discarded. Membrane fractions were isolated after supernatant ultracentrifugation at 100,000 g for 1 h at 4 °C. The pellet was resuspended and ultracentrifuged again in the same conditions as before. Samples of membrane fraction proteins (0.5 mg/ml) were solubilized in 1% Triton X-114 for 1 h at 4 °C, under constant agitation, and vortexed at 10-min intervals.

2.3. Liposome and proteoliposome preparation

Liposomes and proteoliposomes were prepared with cholesterol and DPPC in standard ratios of 4:1 [17]. The phospholipids and cholesterol in appropriate proportion (1 mg) were dissolved in 1 ml chloroform and dried under nitrogen flow. The obtained lipid film was maintained under vacuum for 1 h. Then, 1 ml of a 50 mM Tris–HCl buffer solution was added to the film. The mixture was incubated for 1 h at 60 °C, above the critical temperature of the lipid, and briefly vortexed at 10 min intervals. After that, the lipid emulsion was sonified, for 2 min at 240 W, by means of a microtip (Branson sonifier). The obtained mixture was centrifuged at 100,000 g for 20 min at room temperature, and the pellet was discarded. The supernatant that corresponds to small unilamellar vesicles was used to obtain proteoliposomes.

A protein sample obtained from the Triton X-114 rich phase (0.25 mg of total protein) was treated with 0.07 g ml^{–1} Biobeads hydrophobic resin for 5 h at 4 °C in order to remove excess detergent. The resulting sample was then mixed with 1 ml of the previously obtained liposome fraction. The mixture was incubated overnight at room temperature. Finally, the resulting solution was centrifuged at 100,000 g for 1 h. The pellet, constituted by proteoliposomes, was resuspended in 50 mM Tris–HCl buffer, and the supernatant was discarded. Importantly, the loading procedure of GPI anchored proteins on preformed liposomes at room temperature turns the outside-out localization of GPI anchored proteins highly probable considering that the transition temperature of the herein used nanoparticle lipids is around 60 °C (see datasheet of Polar Lipids).

2.4. Dynamic light scatter analysis of proteoliposomes

The determination of liposome and/or proteoliposome size distribution was done by dynamic light scattering using a Beckman Coulter (model N5 submicron particle size analyzer) following the manufacturer's instructions. The sample was filtered and diluted and had its polydispersion index measured.

2.5. ELISA and IgG isotypes

96-well ELISA plates were coated with recombinant PfMSP1₁₉ with 250 ng/well at 4 °C overnight. On the next day, plates were washed with PBS/0.1% Tween 20 and blocked with 4% milk/PBS for 2 h at room temperature. Equal quantities of primary antibodies (from pre-immune and immune mice) were used starting in 1:300 dilution and following a serial dilution until the detection limit. Antibodies were incubated for 2 h at RT. After four washing steps, a secondary antibody anti-Mouse IgG–HRP (1:5000) was used for endpoint ELISA (cutoff of reactivity was the pre-immune sera plus two standard deviations). For IgG isotype detection, a set of specific anti-murine IgG subtype–HRP antibodies (1:3000) was used in parallel experiments (murine anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG2c, anti-IgG3 from Bethyl Lab, catalogue numbers: A90-105P, A90-107P, A90-109P, A90-136P and A90-111P, respectively). After washing, all wells were developed with TMB substrate (Pierce), stopped with 1 M HCl and the result of the colorimetric reaction was analyzed in a BioTek plate reader at 450 nm/595 nm.

2.6. Cryoelectron microscopy

Cryoelectron microscopy was performed as described before [18]. Briefly, nanoparticles were analyzed by spotting 3 µl of the specimen to a holey carbon-film grid (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Germany) pretreated with Gatan Solarus 950 plasma cleaner. The grid was plunge-frozen in liquid ethane using a Gatan Cryopluger 3 (Gatan Inc, Pleasanton, CA, USA). Low dose imaging of the frozen, hydrated specimen kept at liquid nitrogen temperature with a Gatan 626 single tilt cryoholder was performed on a JEM2100 electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) operating at 200 kV. All images were recorded at ~40,000× magnification using a Gatan UltraScan 4000 CCD camera.

2.7. Immunization schedules

Male Balb/C mice and C57Black/6 mice, 8–12 weeks old, were bred and maintained under standard conditions in the animal facility at the Institute for Biomedical Sciences, University of São Paulo. Mice were treated in accordance with national animal welfare regulations and the experimental protocol was approved before the actual experiments. Five animals per formulation were immunized intraperitoneally (ip) on days 0, 14, and 28, using 25 µg protein in 100 µl for each immunization. Serum samples were taken on days 0 (preimmune sera), 14, 28 and 42. For antibody titer determination, the samples from all four bleedings were tested for reactivity with recombinant antigens by standard ELISA and used for IgG purification. Recombinant antigens were produced as described previously [19].

2.8. Raw cell activation assay

The RAW264.7 murine macrophage cell line (European Collection of Cell Cultures [ECACC]; Sigma), which secretes TNF in the presence of *P. falciparum* schizont extracts (PfSE) [12] was used for the PfSE neutralization assays. This cell line has previously been used to assess neutralization of toxic shock syndrome toxin 1 (TSS-1) by anti-human TSS-1 antibodies in vitro [20]. PfSE was prepared from plasmagel floated schizont stage parasites [14] which were sonified, had their protein quantity measured and were frozen at –80 °C or used immediately. Purified IgG (100 µl at 0.1 mg/ml) was incubated with PfSE (50 µl at 10⁷/ml

Table 1

Size distribution and polydispersity of liposomes before and after loading with *P. falciparum* merozoite (Pf mz) GPI anchored proteins.

Formulation	Size in nm	Polydispersity
Empty liposomes	77.8 ± 18.9	0.2 ± 0.01
Pf mz proteoliposomes	197.7 ± 61.7	0.5 ± 0.1

schizont equivalents or as indicated on the labels) in triplicate in a sterile 96-well tissue culture plate (Nunc) for 1 h at 37 °C with gentle mixing. Following the 1-h incubation, 5×10^4 RAW264.7 cells were added to each well, and after incubation for 24 h (37 °C, 5% CO₂) the supernatants were collected and assayed for TNF production. Positive-control cultures contained 100 µl of RPMI rather than IgG; negative-control cultures contained only IgG but no PfSE.

Macrophage culture supernatants were assayed by standard capture ELISA using a mouse TNFα ELISA kit (Invitrogen) following the instructions of the manufacturer. Recombinant murine TNF (R&D) was used as a standard. Each supernatant was tested in duplicate, and all assays were repeated at least twice. Specific TNF release from each culture well was calculated by subtracting the appropriate background values, and TNF values were calculated as a percentage of that released by the positive (PfSE) control.

TNF neutralization was calculated according to the following formula: % neutralization = $100 - [(A/B) \times 100]$, where A is the specific amount of TNF released after preincubation with test IgG [(mean amount of TNF released by RAW264.7 cells incubated with IgG plus PfSE) – (mean amount of TNF released by RAW264.7 cells incubated with IgG alone)], and B is the specific amount of PfSE-induced TNF released for the positive control [(mean amount of TNF released by RAW264.7 cells incubated with either PfSE) – (mean amount of TNF released by RAW264.7 cells incubated in medium alone)].

3. Results

3.1. Liposome loading increases their polydispersity and size

The association of GPI-anchored structures alters the physical-chemical structures of the liposome surface leading to a different size distribution. After extraction of merozoite proteins using Triton X114 and loading of this fraction onto liposomes prepared from 4 parts DPPC and 1 part cholesterol, an increase of their dispersity was

measured by dynamic light scattering analysis. As demonstrated in Table 1, the diameter size of merozoite loaded particles was approximately 200 nm with a size range from 140–260 nm, while unloaded liposomes presented with an almost uniform size of 80 nm. In contrast, cryoelectron-microscope images from the final particles loaded with GPI-anchored structures showed particle sizes of still under 100 nm (Fig. 1). This shows that the light scattering is an appropriate marker for protein incorporation but does not reflect the native size of the liposome core.

3.2. Proteoliposomes contain PfMSP1₁₉ and PfrH5

In the following we traced GPI-anchored antigens which are present on the merozoite and therefore could be expected on proteoliposomes. Using an antibody against the GPI-anchored C-terminal portion of PfMSP1 (PfMSP1₁₉), we observed that this protein was abundantly detected in all fractions including the merozoite lysate fraction, the GPI-enriched fraction, and also the proteoliposome fraction while only a minor part remained in the supernatant fraction which contains material not incorporated in liposomes (Fig. 1). Using an antibody against the rhoptry antigen PfrH5 which is not GPI-anchored but forms a complex with PfrRip and the GPI-anchored CyRPA antigen [21], we could detect this antigen in the loaded liposome fraction (fraction in lane 4). We did not detect this antigen in unloaded fractions and also not in the supernatant after loading, suggesting an enrichment of the complex in liposomes. This indicates that GPI anchored proteins and also protein complexes can be efficiently transferred to liposomes, but that the procedure not necessarily reproduces the ratio of GPI proteins as present on native merozoites.

3.3. Immunization with loaded proteoliposomes induces merozoite specific antibodies

In the following we immunized Balb/C mice with proteoliposome preparations. Three doses of 25 µg each of incorporated GPI-anchored proteins were delivered intraperitoneally and blood samples were taken 10 days after each dose. Pooled sera were then used to detect proteins in late schizont/merozoite preparations. As shown in Fig. 2, merozoites were readily recognized by sera of proteoliposome-immunized mice while no signal was obtained when using sera from nanoliposome-immunized or pre-immune mice (data not shown). We also measured the titer against antigens

Fig. 1. Proteoliposomes and efficient incorporation of PfMSP1₁₉ and also PfrH5: In A, Cryoelectron-microscope image from proteoliposomes showing the final structure (unilamellar) and size distribution. In B, lane 1: PfSE, 2: insoluble fraction after Triton X-114 extraction, 3: GPI-enriched fraction after extraction, 4: loaded liposome fraction containing GPI-anchored proteins, 5: supernatant fraction after loading. In each lane, 25 µg of protein was loaded. After electrophoresis and transfer, the membrane was cut in two parts and the part carrying proteins above approx. 45 kDa were analyzed with a mouse antiPfrH5 antiserum (1:250, made in mice immunized with a pcDNA3-based PfrH5 expressing construct) while the smaller proteins were detected with a monoclonal PfMSP1₁₉ antibody (1:500). Note that the blot was overexposed (MSP1₁₉ signal in lane 4 burnt) in order to reveal the PfrH5 signal in lane 4 and the signal in lane MSP1₁₉ signal in lane 5.

which may be localized on the proteoliposomes, namely PfMSP1₁₉, MSP2 and MSP10. While very high titers against MSP1₁₉ were seen in all mice of the test group, low titers of antiMSP2 were observed and no antiMSP10 IgG could be detected in ELISA assays (Fig. 2A and B, and data not shown). These results reflect what was already observed in the previous experiment when PfMSP1₁₉ was easily detected on proteoliposomes.

When we tested by Western blot which other proteins were detected in late stage schizont extracts, we observed 4 to 5 proteins when probing with pooled sera from proteoliposome-immunized mice. The observed sizes were approximately 20, 40, 90 and 110–120 kDa. A band corresponding to the molecular weight of PfRH5 (approximately 53 kDa) could not be detected perhaps due to a too low antibody titer. A faint band of a weak band of 100 kDa was also visible. Interestingly, the spectrum of recognized proteins was different for sera from C57BL/6 mice as compared to sera from Balb/C mice (Fig. 2C). No signal was

obtained using pre-immune serum or empty-liposome immunized mice (data not shown).

3.4. Strong growth inhibitory effect of sera from proteoliposome-immunized mice

An important feature of the antiplasmodial activity of serum antibodies is their growth- or reinvasion-inhibiting capacity. To estimate the growth inhibitory potential of IgG in the sera of proteoliposome-immunized mice, we conducted growth inhibition assays using the *P. falciparum* 3D7 strain which was initially employed to obtain the GPI-anchored proteins for proteoliposomes. The assays were conducted starting with parasites at late trophozoite stage and 1% parasitemia. As shown in Fig. 3, a 1:10 dilution of mouse serum of immunized mice was able to reduce the proliferation of schizont stage parasites to ring stage parasites in almost 70% during 24 h incubation. The inhibitory

Fig. 2. High titers of antiMSP1₁₉ are elicited after proteoliposome immunization of Balb/C and C57BL/6 mice. In A, titers against recombinant GST-PfMSP1₁₉ are shown and in B, titers against GST-PfMSP2. In C whole schizont stage extract proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to Nitrocellulose membranes and probed with a pooled serum after the third proteoliposome immunization of Balb/C mice. In D, late stage schizonts with merozoites were lysed as described and detected with pooled sera from proteoliposome-immunized mice. I shows the bright field microscopy, II, signal obtained by detecting merozoite structures with pooled sera (1:500) and visualized by Alexa488-coupled antimouse-IgG. III shows staining with DAPI and in IV, the overlay of II and III is shown. Three asterisks indicate significant differences evaluated by ANOVA with Bonferroni's correction ($p < 0.05$, $n = 5$) and n.s. means no significant differences.

Fig. 3. The growth inhibitory effect was measured in short term in vitro 3D7 cultures. The negative control consisted of 0.5% Albumax/RPMI supplemented with 10% preimmune mouse serum, and the growth inhibitory effect of pooled proteoliposome-immunized mouse serum is shown in bars. The standard deviation of experimental duplicates is indicated. See Fig. 4 for raw data.

effect slightly increased after 48 h incubation. This indicates that antibodies from sera of proteoliposome-immunized mice exerted a considerable reinvasion-inhibitory effect.

3.5. Different IgG subclasses are observed after proteoliposome immunization

The subclass of vaccine induced antibodies may influence the success of immunization against blood stage forms of *Plasmodium*. There are reports that show a relation of cytophilic antibodies with protection [22,23] although others showed that non-cytophilic antibodies may also be protective [24,25] in frequently infected semi-immune carriers of *Plasmodium*. To test the IgG profile of the elicited immune response, we measured individual IgG subclasses. While most of the IgGs against MSP1₁₉ were not cytophilic (IgG1 higher than 2a/b) in the Balb/C background, the immunization of C57BL/6 mice showed higher portions of cytophilic IgG2a/b antibodies, as expected (Supplementary Fig. S1).

3.6. Pretreatment of parasite lysates with immune serum but not normal serum decreased RAW cell activation and TNF alpha synthesis

Parasite derived GPI anchors are mediators of inflammation mostly via the TLR2/TLR4 signaling pathway [26] and antibodies against them seem to decrease deleterious over-stimulation of endothelial cells. We therefore tested if immunization of liposomes loaded with plasmodial GPI-anchored proteins also elicited antibodies against the GPI moiety using an assay previously employed by de Souza and colleagues [27]. For this, we exposed the macrophage RAW cell line to a schizont protein extract either incubated with pre-immune IgG (Balb/C) or IgG from proteoliposome-immunized Balb/C mice. As shown in Fig. 4, RAW cells incubated in the presence of control IgG showed an increase in the ratio of activation surface marker (CD86, Fig. 4A) and also a stronger intensity of activation (Fig. 4B) leading to increased production of TNF α (Fig. 4C). The incubation with IgG from proteoliposome-immunized mice showed a 70% reduction in the levels of produced TNF α and also inflammatory surface markers such as CD86. In another assay we tested if the activation in fact occurred via TLR2 and 4. As shown in Supplementary Fig. S3, when COS7 cells were transfected with a construct expressing *Photinus* luciferase under a TLR2/4 pathway-dependent promoter together with a plasmid expressing each of the TLRs, no chemoluminescence through the production of *Photinus* luciferase was observed when these cells were incubated with empty liposomes. On the other hand, strong presence of *Photinus* luciferase was seen when transfected COS7 cells were exposed to proteoliposomes. As a control,

no *Photinus* luciferase activation was seen when COS7 cells were only transfected without the TLR2 and 4 expressing plasmids (Supplementary Fig. S3). Taken together, this indicates proteoliposomes do contain TLR2/4 stimulating compounds and that specific IgG from proteoliposome immunized mice might block the activation of RAW cells, possibly by decreasing PfSE-derived GPI binding and subsequently less activation of RAW cell TLR receptors.

4. Discussion

Nanoliposomes are a novel form of delivering antigens or other cargos to potentially any target structure in vitro and in vivo. Starting from the assumption that the merozoite surface contains vaccine-relevant targets of which at least a part contain GPI moieties, we prepared merozoite GPI anchored proteins and loaded them on liposomes. This quite simple approach elicited a strong humoral response against merozoite structures probably including GPI anchors.

Upon preparation of proteoliposomes, we observed the presence of the MSP1₁₉ moiety which then elicited a strong humoral response with achieved antibody titers similar to other studies using the MSP1₁₉ polypeptide [28]. However, only marginal levels of an antiMSP2 response were detected, although this antigen is supposed to make up about 20% of the GPI-anchored merozoite surface coat proteins [9]. In the same study, the same authors observed by mass spectrometry almost 5% abundance of MSP10, however, no response against it could be detected herein. This indicates that MSP2 and MSP10 might be underrepresented in proteoliposomes. Additionally, we detected the presence of PfrH5 solely in the proteoliposomes. The fact that this antigen was not detected in the fractions prior to loading of liposomes but only in loaded liposomes indicates that the PfrH5-containing complex of CyPRA, PfrRipr and PfrH5 is somehow enriched by the procedure – in contrast to MSP2 and MSP10. The presence of PfrH5 is highly interesting since it may be considered one of the most promising vaccine candidates given its conservation and essential function in red blood cell invasion [29,30].

In total, 30 GPI-anchored proteins were predicted to exist in *P. falciparum* of which 11 were detected in schizonts/merozoites [9]. It is not clear what causes the apparent exclusion of MSP2, but nanoparticle lipid composition is supposed to play a role in modulating the preferred incorporation of some proteins and the exclusion of others. This is somewhat similar to what also happens in natural cellular processes [31–33]. Immunization of proteoliposomes resulted in antisera which recognized apparently MSP1₁₉ and cleavage products thereof: protein species in the sizes 19 kDa and 40 kDa. It is not clear which proteins are recognized that had sizes between 90 and 120 kDa. If one assumes that proteoliposomes contained a small fraction of full length MSP1, only the band around 90 kDa may be a cleavage product of MSP1 (83 kDa fragment, [34]). The other protein species with a molecular weight of around 120 kDa may be another digestion product of MSP1. This may be similar to a 125 kDa protein species seen by Gilson and collaborators during the analysis of GPI-anchored proteins using specific antibodies [9], or may be still some other proteins. Taken together, it seems that the major component of plasmodial GPI proteins present on proteoliposomes is indeed MSP1 and cleavage products thereof. Although not specifically tested for, the nanoliposome-incorporated proteins were most probably on the outside since the lipid composition together with the fact that loading was done at room temperature, did not permit “flip-flop” effects of proteins [35]. In previous studies, specific malarial antigens were used with success in lipid-nanosphere formulations, showing a strong enhancement of the immune response observed in lymphoid tissue [18]. The localization of GPI anchored structures on the surface of these particles permits access to the recognition of these structures for B cells, and enhances the production of antibody for those cells [18,35]. Herein, we used the intraperitoneal route of immunization which is supposed to give stronger humoral immune responses than the more acceptable intradermal route (e.g. [36]). We

Fig. 4. Pretreatment of schizonts with sera of proteoliposome-immunized mice decreased RAW cell activation (CD86 expression) and also the expression of TNF α . Schizont extracts were exposed either to preimmune serum or proteoliposome-immunized mice serum and the number of CD86 expressing cells (A) or the intensity of CD86 expression in CD86-positive cells (B) or secretion of TNF α (C) was monitored by cytometry analysis. See Supplementary Fig. S2 for cytometer settings. Two asterisks mean $p < 0.05$ and three $p < 0.005$ (Student's T test) in experimental duplicates using individual sera from five animals.

chose the i.p. route of immunization in order to produce the highest possible titers of antibodies for later use in *in vitro* assays. The intradermal delivery of nanoliposomes was previously shown to be effective (revised in [37]) but remains to be tested for the proteoliposomes used herein. The achieved results in terms of antibody titer at least for the MSP1₁₉ antigen are similar to other studies which used this antigen in immunizations [28].

We then tested the efficacy of antibodies in blocking intraerythrocytic parasite growth and reinvasion. Interestingly, only antibodies from Balb/C immunized mice were able to inhibit parasite growth or reinvasion, while sera from C57Bl/6 mice exerted no effect at all. The principal difference in the immune response of mice against the proteoliposome immunization was the differential development of IgG subclasses. In specific cases, varying genetic background can be an important issue when using combinations of different antigens with similar chemical properties such as a GPI motif. The observed inhibition was comparable to other trials which used defined antigens in vaccine formulations such as those using AMA1 or PfrH5, both of which antigens are associated to merozoite invasion (for example [29,38]).

Another important effect of proteoliposome immunization was the capacity of mice sera to decrease the activation of macrophages exposed to PfSE. Despite the fact that we do not directly show the presence of antiGPI antibodies, the observed effect is most probably a consequence of antiGPI specific immunoglobulins. Importantly, the negative control in this experiment contained unrelated IgG from pre-immune serum. This ruled out a background of inhibitory effects of IgG itself in the response, decreasing TNF production. In a test using TLR2/4 transfected COS7 cells and plasmids expressing constitutively *Renilla* and TLR2/-triggered *Photinus* luciferase, incubation of cells with proteoliposomes showed a strong induction of *Photinus* mediated chemoluminescence while empty liposomes did not show this effect (Supplementary Fig. S3). Also, untreated PfSE also led to an induction of TNF α . The observed activation of TNF α production is a central factor in the development of cerebral malaria (e.g. [39]). However, one must keep in mind that factors other than GPI may play a role in the induction of inflammatory processes since antiGPI titers do not neatly correlate with a decrease in the TNF production [27].

Taken together, our data show that nanoliposome-based approaches focusing on GPI anchored structures hold promise in enhancing invasion- and inflammation-inhibitory activities of vaccines. Additionally, the further enrichment of highly relevant antigens such as PfrH5

may surpass the efficiency of alum- or even recombinant virus-formulated vaccines.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.045>.

Acknowledgments

The authors would like to thank Wolfgang Fischer for technical assistance. This work was funded by CAPES (NANOCAPES granted to RGS) (04/2008-Project 10) and FAPESP (grant 2012/23306-5 to GW and 2012/18617-1 to WLF).

References

- [1] A.V. Hill, Vaccines against malaria, *Philos. Trans. R. Soc. L. B. Biol. Sci.* 366 (2011) 2806–2814, <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2011.0091>.
- [2] B.R. Ogutu, O.J. Apollo, D. McKinney, W. Okoth, J. Siangla, F. Dubovsky, et al., Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya, *PLoS ONE* 4 (2009), e4708 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004708>.
- [3] S.T. Agnandji, B. Lell, S.S. Soulanoudjingar, J.F. Fernandes, B.P. Abossolo, C. Conzelmann, et al., First results of phase 3 trial of RTS, S/AS01 malaria vaccine in African children, *N. Engl. J. Med.* 365 (2011) 1863–1875, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1102287>.
- [4] L. Schwartz, G.V. Brown, B. Genton, V.S. Moorthy, A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table, *Malar. J.* 11 (2012) 11, <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-11-11>.
- [5] A.E. Gregory, R. Titball, D. Williamson, Vaccine delivery using nanoparticles, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3 (2013) 13, <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2013.00013>.
- [6] L.J. Cruz, P.J. Tacken, F. Rueda, J.C. Domingo, F. Albericio, C.G. Figdor, Targeting nanoparticles to dendritic cells for immunotherapy, *Methods Enzymol.* 509 (2012) 143–163, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-391858-1.00008-3>.
- [7] G. Zhang, X. Zeng, P. Li, Nanomaterials in cancer-therapy drug delivery system, *J. Biomed. Nanotechnol.* 9 (2013) 741–750.
- [8] A. Badiie, V. Heravi Shargh, A. Khamesipour, M.R. Jaafari, Micro/nanoparticle adjuvants for antileishmanial vaccines: present and future trends, *Vaccine* 31 (2013) 735–749, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.068>.
- [9] P.R. Gilson, T. Nebl, D. Vukcevic, R.L. Moritz, T. Sargeant, T.P. Speed, et al., Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Mol. Cell. Proteomics* 5 (2006) 1286–1299, <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M600035-MCP200>.
- [10] C.S. Boutlis, D.C. Gowda, R.S. Naik, G.P. Maguire, C.S. Mgone, M.J. Bockarie, et al., Antibodies to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols: inverse association with tolerance of parasitemia in Papua New Guinean children and adults, *Infect. Immun.* 70 (2002) 5052–5057.
- [11] K.E.M. Persson, F.J.I. Fowkes, F.J. McCallum, N. Gicheru, L. Reiling, J.S. Richards, et al., Erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* are targets of human inhibitory antibodies and function to evade naturally acquired immunity, *J. Immunol.* 191 (2013) 785–794, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1300444>.

- [12] L. Schofield, M.C. Hewitt, K. Evans, M.-A. Siomos, P.H. Seeberger, Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria, *Nature* 418 (2002) 785–789, <http://dx.doi.org/10.1038/nature00937>.
- [13] W. Trager, J.B. Jensen, Human malaria parasites in continuous culture, *Science* 80 (193) (1976) 673–675.
- [14] J. Lelievre, A. Berry, F. Benoit-Vical, An alternative method for *Plasmodium* culture synchronization, *Exp. Parasitol.* 109 (2005) 195–197.
- [15] C. Lambros, J.P. Vanderberg, Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture, *J. Parasitol.* 65 (1979) 418–420.
- [16] B.T. Grimberg, Methodology and application of flow cytometry for investigation of human malaria parasites, *J. Immunol. Methods* 367 (2011) 1–16, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2011.01.015>.
- [17] L.E.R. Santos, M.C. Colhone, K.R.P. Daghestanli, R.G. Stabeli, I. Silva-Jardim, P. Ciancaglini, Lipid microspheres loaded with antigenic membrane proteins of the *Leishmania amazonensis* as a potential biotechnology application, *J. Colloid Interface Sci.* 340 (2009) 112–118, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2009.08.025>.
- [18] J.J. Moon, H. Suh, A.V. Li, C.F. Ockenhouse, A. Yadava, D.J. Irvine, Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines that expand Th cells and promote germinal center induction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 1080–1085, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1112648109>.
- [19] M.M. Medeiros, W.L. Fotoran, R.C. Dalla Martha, T.H. Katsuragawa, L.H. Pereira da Silva, G. Wunderlich, Natural antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens MSP5, MSP9 and EBA175 is associated to clinical protection in the Brazilian Amazon, *BMC Infect. Dis.* 13 (2013) 608, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-608>.
- [20] A. Hirose-Kumagai, F.H. Whipple, T. Ikejima, C.A. Dinarello, D.M. Gill, H.L. Ritz, et al., A comparison of neutralizing and antigen-binding assays for human antibodies against toxic-shock-syndrome toxin 1, *J. Infect. Dis.* 150 (1984) 788.
- [21] K.S. Reddy, E. Amlabu, A.K. Pandey, P. Mitra, V.S. Chauhan, D. Gaur, Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfPRH5 and PfPR1 is crucial for *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) 201415466, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1415466112>.
- [22] C. Roussilhon, C. Oeuvray, C. Muller-Graf, A. Tall, C. Rogier, J.F. Trape, et al., Long-term clinical protection from *falciparum* malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3, *PLoS Med.* 4 (2007) e320.
- [23] H.A. Giha, A. Nasr, N.C. Iriemenam, H.A. Balogun, D. Arnot, T.G. Theander, et al., Age-dependent association between IgG2 and IgG3 subclasses to Pf332–C231 antigen and protection from malaria, and induction of protective antibodies by sub-patent malaria infections, in Daraweesh, *Vaccine* 28 (2010) 1732–1739, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.12.018>.
- [24] C. Aucan, Y. Traoré, F. Tall, B. Nacro, T. Traoré-Leroux, F. Fumoux, et al., High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria, *Infect. Immun.* 68 (2000) 1252–1258.
- [25] A.L. Goodman, E.K. Forbes, A.R. Williams, A.D. Douglas, S.C. de Cassan, K. Bauza, et al., The utility of *Plasmodium berghei* as a rodent model for anti-merozoite malaria vaccine assessment, *Sci. Rep.* 3 (2013) 1706, <http://dx.doi.org/10.1038/srep01706>.
- [26] R.S. Naik, O.H. Branch, A.S. Woods, M. Vijaykumar, D.J. Perkins, B.L. Nahlen, et al., Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1563–1576, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.192.11.1563>.
- [27] J.B. de Souza, M. Runglall, P.H. Corran, L.C. Okell, S. Kumar, D.C. Gowda, et al., Neutralization of malaria glycosylphosphatidylinositol in vitro by serum IgG from malaria-exposed individuals, *Infect. Immun.* 78 (2010) 3920–3929, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00359-10>.
- [28] P.K. Gupta, P. Mukherjee, S. Dhawan, A.K. Pandey, S. Mazumdar, D. Gaur, et al., Production and preclinical evaluation of *Plasmodium falciparum* MSP-119 and MSP-311 chimeric protein, *PMSP-Fu24*, *Clin. Vaccine Immunol.* 21 (2014) 886–897, <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00179-14>.
- [29] A.D. Douglas, A.R. Williams, J.J. Illingworth, G. Kamuyu, S. Biswas, A.L. Goodman, et al., The blood-stage malaria antigen PfPRH5 is susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody, *Nat. Commun.* 2 (2011) 601, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1615>.
- [30] C. Crosnier, L.Y. Bustamante, S.J. Bartholdson, A.K. Bei, M. Theron, M. Uchikawa, et al., Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*, *Nature* 480 (2011) 534–537, <http://dx.doi.org/10.1038/nature10606>.
- [31] A.M. Seddon, P. Curnow, P.J. Booth, Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera, *Biochim. Biophys. Acta* 1666 (2004) 105–117, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2004.04.011>.
- [32] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 112–124, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2330>.
- [33] M.C. Colhone, T.M. Nobre, M.E.D. Zaniquelli, R.G. Stabeli, P. Ciancaglini, Incorporation of antigenic GPI-proteins from *Leishmania amazonensis* to membrane mimetic systems: influence of DPPC/cholesterol ratio, *J. Colloid Interface Sci.* 333 (2009) 373–379, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2009.01.043>.
- [34] M.J. Blackman, T.J. Scott-Finnigan, S. Shai, A.A. Holder, Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 389–393.
- [35] M.C. Hanson, W. Abraham, M.P. Crespo, S.H. Chen, H. Liu, G.L. Szeto, et al., Liposomal vaccines incorporating molecular adjuvants and intrastructural T-cell help promote the immunogenicity of HIV membrane-proximal external region peptides, *Vaccine* 33 (2015) 861–868, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.12.045>.
- [36] J. Thatte, S. Rath, V. Bal, Analysis of immunization route-related variation in the immune response to heat-killed *Salmonella typhimurium* in mice, *Infect. Immun.* 63 (1995) 99–103.
- [37] S. Hansen, C.-M. Lehr, Nanoparticles for transcutaneous vaccination, *Microb. Biotechnol.* 5 (2012) 156–167, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00284.x>.
- [38] A.R. Williams, A.D. Douglas, K. Miura, J.J. Illingworth, P. Choudhary, L.M. Murungi, et al., Enhancing blockade of *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: assessing combinations of antibodies against PfPRH5 and other merozoite antigens, *PLoS Pathog.* 8 (2012), e1002991 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002991>.
- [39] L.J. Robinson, M.C. D'Ombrain, D.I. Stanisic, J. Taraika, N. Bernard, J.S. Richards, et al., Cellular tumor necrosis factor, gamma interferon, and interleukin-6 responses as correlates of immunity and risk of clinical *Plasmodium falciparum* malaria in children from Papua New Guinea, *Infect. Immun.* 77 (2009) 3033–3043, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00211-09>.

Merozoite-Protein Loaded Liposomes Protect against Challenge in Two Murine Models of *Plasmodium* Infection

Wesley L. Fotoran,[†] Marcelle C. Colhone,[‡] Pietro Ciancaglini,[‡] Rodrigo G. Stabeli,[§] and Gerhard Wunderlich^{*,†}

[†]Department of Parasitology, Institute for Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

[‡]Department of Chemistry, FFCLRP-USP, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

[§]Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas a Saúde, Fiocruz—Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, e Departamento de Medicina da Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Porto Velho, Rondônia, Brazil

S Supporting Information

ABSTRACT: Liposomes loaded with GPI-anchored proteins induce a strong and effective response against protozoan pathogens when immunized in mice. On the basis of results using *Plasmodium falciparum* merozoite proteins loaded on liposomes, we tested whether a similar approach would be protective in the *P. yoelii* XL and *P. berghei* NK65 models of lethal murine malaria infections. We also analyzed the enhancing capacity of additional adjuvants. As expected, merozoite protein loaded liposomes provided strong humoral responses (IgG titers of 10⁵ against MSP1₁₉) in BALB/c and C57BL/6 host backgrounds and showed total protection in lethal challenges (100% survival) with *P. yoelii*, while protection against lethal challenge with *P. berghei* NK was at least partial (11%–20% in C57BL/6 mice and no protection in BALB/c). Thus, immunization with proteoliposomes is not only highly immunogenic but also provides a protective response in widely used murine models of malaria.

KEYWORDS: proteoliposomes, malaria, merozoite surface protein, GPI anchors, antitoxic response

INTRODUCTION

The infection with *Plasmodium* parasites still poses a significant problem in tropical areas of the planet, and *Plasmodium falciparum* alone is believed to kill approximately half a million individuals per year, mostly children younger than 5 years and pregnant women in sub-Saharan Africa.¹ Although significant progress such as decreasing numbers of new infections and malaria deaths has been made in the last 10 years, the fact that a number of field isolates are showing increased refractoriness to the most efficient treatment against malaria^{2,3} is alarming and makes thorough containment measures urgent. In addition to therapy and protection from infective mosquito bites through impregnated bednets, the introduction of an effective vaccine is supposed to sustain a further decrease of malaria-related deaths. Recently, the European Community licensed the RTS/S vaccine against *P. falciparum* malaria.⁴ This vaccine is far from being perfect and shows only moderate but very reproducible degrees of protection.⁵ However, the modest extent of protection of RTS/S calls for an improved version of a malaria vaccine. A very promising vaccine candidate is the merozoite associated blood stage antigen *P. falciparum* rhoptry protein 5 (PfRH5) of *P. falciparum*⁶ and apparently also the proteins RH5 interacting protein (RIPR) and cysteine-rich protective antigen (CyRPA) in complex with it.⁷ All three proteins show very few polymorphisms and are functional during red blood

cell invasion. Since antibodies against plasmodial proteins are an important factor of the immune response against parasites or parasitized cells⁸ (reviewed in ref 9), it can be expected that the inclusion of novel targets as vaccine antigens and delivery of mixtures of different alleles in case of polymorphic antigens would increase the efficiency of a vaccine. In addition, the presence of antiplasmodial glycosphosphatidylinositol (GPI) antibodies seems to be beneficial in terms of decreasing a detrimental inflammatory response (“antitoxic response”).^{10,11} Another factor is the adjuvant with which a vaccine is formulated. For example, QS21 (a saponine derivate) made the RTS/S vaccine much more effective than the widely used aluminum hydroxide.¹² Importantly, RTS/S is a virosome, consisting of a modified hepatitis B virus small surface antigen (HBs) particle with a portion of N-terminally fused circumsporozoite protein. In general terms, antigens presented on larger structures at high surface densities such as on virosomes may lead to the direct activation of specific B-cells by directly cross-linking membrane-resident IgGs.

Recently, we have shown that artificially created liposomes, made from dipalmitoylphosphatidyl choline (DPPC) and

Received: August 23, 2016

Accepted: October 4, 2016

cholesterol, can be loaded with *P. falciparum* merozoite derived GPI-anchored proteins and proteins associated with these.¹¹ After immunization of proteoliposomes in mice, we observed a strong induction of antibodies directed against merozoite proteins such as merozoite surface protein 1 (MSP1). Additionally, we observed an *in vitro* blockade of the inflammatory effect of *P. falciparum* GPIs (PfGPI), apparently caused by PfGPI-specific antibodies. Moreover, the IgG contained in the sera of immunized mice were able to block the reinvasion of *P. falciparum* *in vitro*. In the following, we show that the loading of merozoite derived proteins is also highly effective in murine models of malaria infection, namely, in the lethal models of *P. yoelii* XL and partially *P. berghei* NK65, testing in two different genetic host backgrounds. Our results underpin the view that the proteoliposomal vaccine formulation is a very efficient means of inducing protective humoral responses *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

***P. yoelii* and *P. berghei* Culture and Synchronization.** Parasites were collected by heart puncture from completely anesthetized mice when the infection reached 30% parasitemia. After the puncture, *P. yoelii* XL and *P. berghei* NK65 GFP trophozoites were cultured at 37 °C in RPMI medium containing 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) in a 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂ atmosphere.¹³ Synchronization of parasite blood stage forms was achieved by subsequent overnight growth. Late schizont stage parasites already showing merozoites were then lysed for 10 min at RT in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.25, containing 10 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, and 0.1% saponin and washed twice in the same buffer. Parasite pellets were obtained by centrifugation at 1200g for 15 min, and these were kept at -80 °C until required.

Preparation and Solubilization of GPI-Anchored Protein from *P. yoelii* and *P. berghei* Merozoites. The frozen schizont-derived merozoite pellets were resuspended in PBS without saponin and subjected to sonication at 4 °C during 30 s at 240 W (Branson sonifier), and centrifuged at 1000g for the sedimentation of organelles, nuclei, and intact cells, which were discarded. Membrane fractions were isolated after supernatant ultracentrifugation at 100,000g for 1 h at 4 °C. The pellet was resuspended and ultracentrifuged again in the same conditions as before. Samples of membrane fraction proteins (0.5 mg/mL) were solubilized in 1% Triton X-114/PBS for 1 h at 4 °C, under constant agitation, and vortexed at 10 min intervals. The final protein concentration of the GPI-protein enriched fraction was measured by the Lowry-method.¹⁴ For Cryo-TEM analyses, CHO-cell expressed GPI-anchored proteins were used.

Liposome and Proteoliposome Preparation. Liposomes and proteoliposomes were prepared using cholesterol and DPPC in standard ratios of 1:4.¹⁵ Phospholipids and cholesterol in appropriate proportions (totalling 1 mg) were dissolved in 1 mL of chloroform and dried under nitrogen flow. The obtained lipid film was maintained under vacuum for 1 h. Then, 1 mL of 50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.5 was added to the film. The mixture was incubated for 1 h at 60 °C, above the critical temperature of the lipid, and briefly vortexed at 10 min-intervals. After that, the lipid emulsion was subjected to sonication for 2 min at 240 W using a microtip (Branson sonifier). The obtained mixture was centrifuged at 100,000g for 20 min at room temperature, and the pellet was discarded. The supernatant that corresponds to small unilamellar vesicles was used to obtain proteoliposomes.

A protein sample obtained from the Triton X-114 rich phase (0.25 mg of total protein) was treated with 0.07 g mL⁻¹ Biobeads hydrophobic resin for 5 h at 4 °C in order to remove excess detergent. The resulting sample was then mixed with 1 mL of the previously obtained liposome fraction. The mixture was incubated overnight at room temperature. When the sample received MPLA as adjuvant (dissolved in PBS), it was added in this step at a total quantity of 150 ng for each batch, providing sufficient dose volume for five animals. Finally, the resulting solution was centrifuged at 100,000g

for 1 h. The pellet, constituted of proteoliposomes, was resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer, and the supernatant was discarded. Importantly, the loading procedure of GPI anchored proteins on preformed liposomes was done at room temperature, well below the transition temperature of 41.3 °C of the herein used lipids (see datasheet of Polar Lipids). Taking into account the steric interaction of protein moieties, it can be assumed that GPI anchored proteins are exposed on the outside of proteoliposomes.

Dynamic Light Scatter Analysis of Proteoliposomes. We determined the size distribution of liposomes and/or proteoliposomes by dynamic light scattering using a Beckman Coulter (model N5 submicron particle size analyzer) following the manufacturer's instructions. The sample was filtered and diluted, and the polydispersion index was measured.

Cryoelectron Microscopy. Cryoelectron microscopy was performed as described before.¹⁶ Briefly, nanoparticle solutions were analyzed by spotting 3 μL of the specimen to a holey carbon-film grid (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Germany) pretreated with a Gatan Solarus 950 plasma cleaner. The grid was plunge-frozen in liquid ethane using a Gatan Cryoplunge 3 (Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA). Low dose imaging of the frozen, hydrated specimen kept at liquid nitrogen temperature with a Gatan 626 single tilt cryoholder was performed on a JEM2100 electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) operating at 200 kV. All images were recorded at ~40,000× magnification using a Gatan UltraScan 4000 CCD camera.

Polyacrylamid Gel Electrophoresis and Immunoblotting Procedures. When whole parasites were analyzed, these were obtained by saponin-lysis (0.1% in PBS) of IRBC from infected mice as described before.¹⁷ Recovered parasites were then lysed in sample buffer (4% SDS, Tris/Cl, pH 6.8, and 12% glycerol) and loaded on standard 10% polyacrylamide gels using Tris/SDS/glycine running buffer as described¹⁸ using Thermo/Fermentas' Spectra Broad Range molecular weight marker for size determination. Proteoliposome-associated proteins were analyzed either directly by mixing the proteoliposome solution with sample buffer or were delipidated by one chloroform extraction before addition of sample buffer. After electrophoresis in Mini-Protein 3 devices (BioRad, Hercules, CA), gels were either stained with Coomassie blue G250¹⁸ or the silver stain method using kits from GE Healthcare following the instructions provided in the kit. For immunoblots, proteins in unstained gels were transferred employing wet-transfer in Tris/glycine/10% methanol buffer in a BioRad Mini-Protein chamber system for 1 h at 1 V/cm² onto Hybond C membranes (GE Healthcare). Membranes were blocked in 4% skimmed milk in 1× PBS/Tween20 and washed with 1× PBS/Tween20 between incubations with antisera, which occurred in 1% skimmed milk PBS/Tween 20. Binding antibodies were detected with HRP-coupled antimouse IgG antibodies (KPL), and HRP was detected using Western Pico chemoluminescent detection kits (Pierce). Chemoluminescence was documented on an Image-Quant Device from GE Healthcare.

ELISA and IgG Isotypes. 96-well ELISA plates were coated with recombinant PyMSP1₁₉/PbMSP1₁₉ (rPyMSP1₁₉/rPbMSP1₁₉) or *P. yoelii*/*P. berghei* extracts (PySE/PbSE) using 250 ng/well at 4 °C overnight. On the next day, plates were washed with PBS/0.1% Tween 20 (PBS-T) and blocked with 4% milk/PBS-T for 2 h at room temperature. Equal quantities of sera (from preimmune, immunized mice, or immunized and infected mice) were used starting in 1:300 dilution and following a serial dilution until the detection limit. Antibodies were incubated for 2 h at RT. After four washing steps, a secondary antibody anti-Mouse IgG-HRP (KPL, 1:5000) was used for end point ELISA, and the cutoff of reactivity was calculated from the signal of the preimmune sera plus two standard deviations. For IgG isotype detection, a set of specific anti murine IgG subtype-HRP antibodies (1:3000) was used in parallel experiments (murine anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG2c, and anti-IgG3 from Bethyl Lab, catalogue numbers: A90-105P, A90-107P, A90-109P, A90-136P, and A90-111P, respectively). After washing, all wells were developed with the TMB substrate (Pierce) and stopped with an equal volume of 1 M HCl, and the results of the colorimetric reaction was analyzed in a BioTek plate reader at 450 nm/595 nm.

Immunization Schedules. Male, 8–12 weeks old BALB/c and C57BL/6 mice were bred and maintained under standard conditions in the animal facility at the Institute for Biomedical Sciences, University of São Paulo. Mice were treated in accordance with national animal welfare regulations, and the experimental protocol was approved before the actual experiments (protocol 15_03_03 from 2013). Five animals per group and formulation were immunized intraperitoneally (ip) on days 0, 14, and 28 using 25 μ g of protein in 100 μ L for each immunization. When used, monophosphoryl lipid A (MPLA) dissolved in PBS was added at 25 ng per dose (see above). MPLA was added at the time point of GPI-protein/liposome coinubation. When Alum was used, 100 μ L of Alum hydrogel were mixed with 25 μ g of protein loaded on liposomes (per dose). Serum samples were taken on days 0 (preimmune sera), directly before challenge and 15 days after challenge (*P. berghei* challenge). For antibody titer determination, the samples from the two prechallenge bleedings and postchallenge were tested for reactivity with recombinant antigens by standard ELISA and used for IgG purification. Recombinant antigens were produced as described previously.¹⁹

Challenge of Animals and Parasitemia Measurements. On the 35th day after the first immunization, all immunized animals received an intraperitoneal dose of 5×10^6 blood stage parasites *P. berghei* NK65 GFP²⁰ or $1 \times 10^{6.21}$ parasites for challenge with *P. yoelii* XL. For the *P. berghei* challenge, all animals still alive after 15 days were bled from their tail vein, and the resulting sera were analyzed for antibody responses at this point. The parasitemia from each animal was measured by FACS analyses and by blood smear for *P. berghei*. For *P. yoelii*, the blood smear was used as the standard method.

Immunofluorescence. Live parasite immunofluorescence assays were conducted with enriched *P. yoelii* or *P. berghei* NK65. Reacting antibodies were either from mice that were immunized with proteoliposomes or a polyclonal, and a monospecific rabbit antiPyMSP1₁₉ antibody (obtained from MR4) was used. For visualization, trophozoite/schizont stage parasites were incubated with 40 μ g/mL of 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in 100 μ L of RPMI/1% bovine serum albumin for 60 min at 37 °C, followed by primary sera (dilution 1:250) incubation. The secondary antibody was an Alexa Fluor 594 labeled antimouse-IgG or antirabbit antibody (Molecular Probes, 1:500 dilution). Between each incubation step, the material was washed three times with RPMI, pH 7.2. Immunofluorescence was visualized on a Zeiss Imager M2 fluorescence microscope.

Preparation of GPI Anchors from *P. berghei* Merozoites. *P. berghei* GPI anchors for use in ELISA were prepared as follows: Triton X-114 extracted proteins were treated overnight with 0.25 U phospholipase C and then with 20 μ g proteinase K for the complete destruction of any proteic motif. Afterward, proteic components were removed by phenol/chloroform extraction. The aqueous phase containing the sugar moieties was then used to coat microtiter plates. The sugar moieties were not quantified, and the quantity used for coating corresponded to initially 250 ng of GPI-proteins per well.

RESULTS

Different Proteins Are Reproducibly Incorporated in Liposomes Using GPI Proteins from *P. berghei* and *P. yoelii*. After enrichment of the GPI phase of proteins from *P. berghei* and *P. yoelii* merozoites, we incubated liposomes with these proteins to test their capacity to associate to proteoliposomes. In Figure 1, the example of the production of three independent lots of proteoliposomes made from *P. berghei* merozoites is shown. Incorporated proteins are readily visible when proteoliposomes were delipidated before polyacrylamid gel electrophoresis. As a result, many differently sized proteins were visible in these samples, while proteins from untreated proteoliposomes were not easily resolved (lane “proteoliposomes native formulation”). In order to check if a typical GPI-anchored protein, *P. berghei* MSP1, was reproducibly

Figure 1. GPI anchored protein incorporated in liposomes. Incorporation of *P. berghei* proteins shown by silver stained SDS-PAGE: lane 1, total merozoite extract; lane 2, GPI-enriched fraction (Triton X-114 soluble); lane 3, loaded proteoliposomes lot 1, chloroform-delipidated; lane 4, loaded proteoliposomes lot 2, delipidated; lane 5, loaded proteoliposomes lot 3, untreated; lane 6, supernatant of nonincorporated proteins of lot 3 (after pelleting of loaded proteoliposomes). Note that material in lanes 1 and 2 was then loaded resulting in three different proteoliposome preparations of lots 1–3, shown in lanes 3–5. The upper band between 140 and 260 kDa shows the immunodetection of the N-terminus of PbMSP1 present on liposomes. Each lane contained approximately 5 μ g of proteins.

cably present on proteoliposomes, we transferred proteins from a similar polyacrylamid gel onto membranes and detected full length PbMSP1 using a monoclonal antibody against the N-terminal portion of the protein by Immunoblot. As expected, the full length protein was clearly detected in all fractions; however, the untreated sample showed a higher amount, indicating that delipidation using chloroform also leads to a loss of detectable protein. A major band of 50 kDa and 17 kDa can be observed in all fractions, while the 35 kDa band, present in the GPI-protein-enriched phase, was less represented in delipidated samples. In the proteoliposomes made from *P. yoelii* GPI-anchored proteins, we observed similarly sized proteins (Supplementary Figure 1). This shows that GPI proteins from different species and with different sizes can be loaded onto liposomes. Similar to what was observed before,¹¹ the size of the liposomes increased after the incorporation of proteins from 70 nm to approximately 200 nm (Table 1). In

Table 1. Size and Polydispersity of Liposomes before and after Loading of Merozoite GPI-Anchored Proteins

lipid formulation	size (nm)	polydispersity (nm)
empty liposomes	77 $\pm$ 18	0.20 $\pm$ 0.00
proteoliposomes/ <i>P. berghei</i>	210 $\pm$ 45	0.60 $\pm$ 0.1
proteoliposomes/ <i>P. yoelii</i>	200 $\pm$ 93	0.64 $\pm$ 0.03
proteoliposomes/ <i>P. berghei</i> before lyophilization	233 $\pm$ 104	0.65 $\pm$ 0.05
proteoliposomes/ <i>P. berghei</i> after lyophilization	122 $\pm$ 16	1

order to analyze the stability over time during storage, we tried to lyophilize the samples. After rehydration, the average size of proteoliposomes decreased, while the polydispersity increased (Table 1). The morphological changes of liposome loading with GPI-anchored proteins are illustrated in Supplementary Figure 1.

Immunizations with Proteoliposomes from *P. yoelii* Proteins Generate a Strong Humoral Response against Merozoite Proteins. In the next step, we monitored if 300

immunization with *P. yoelii* proteoliposomes was effective in generating antibody titers against proteins probably represented on merozoites or schizonts. For this, we performed ELISA assays using recombinant PyMSP1₁₉ or *P. yoelii* schizont extract (PySE) as substrates. In order to analyze if adjuvants further enhanced the effect of proteoliposomes as described by others,²² we used MPLA in an additional group. As shown in Figure 2, the titers against PySE were not higher in the group

immunized with MPLA-proteoliposome compared to the proteoliposome group, but a significantly higher antiPyMSP1₁₉ titer was observed using MPLA ($p = 0.01$, Kruskal–Wallis test). This underlines the capacity of proteoliposomes immunized alone to induce humoral responses. The response possibly reached a plateau considering that MPLA did not further increase antibodies against PySE (Figure 2A). In order to elucidate against which proteins antibodies were developed, we performed a Western blot with the immune sera. Proteins in the size between 10 and 25 kDa and 50–70 kDa but also proteins between 100 and 140 kDa and around 260 kDa were detected. We also checked if the generated antibodies could react with native proteins found on intact *P. yoelii* schizonts and merozoites. In both cases, these forms were readily detected by immunofluorescence microscopy using pooled immune sera (Supplementary Figure 2). On the other hand, preimmune sera did not recognize any protein in ELISA, Western blot, or immunofluorescence (data not shown). Finally, we determined the IgG isotype of antibodies against rPyMSP1₁₉ produced after immunizations (Supplementary Figure 3). Without MPLA, a prevalence of IgG1 was observed, while addition of MPLA resulted in a mixed isotype response indicating a modulating effect of MPLA.

Immunizations with Proteoliposomes Fully Protect Animals against Challenge with Lethal *P. yoelii* XL

A landmark of a *Plasmodium*-directed vaccine formulation is its protective effect in mouse models. Accordingly, groups of BALB/c mice were immunized with three doses of proteoliposomes as before and then infected i.p. with 10^6 *P. yoelii* XL infected red blood cells. As shown in Figure 3, 100% of animals were able to control an initial parasitemia of up to 36% and were protected from death. In contrast, all animals of the control group succumbed to infection by day 12 after challenge. Groups of animals which received a coformulation of MPLA and proteoliposomes showed only 40% survivors but still lower peak parasitemias. Importantly, MPLA-immunized

Figure 2. Antibody response of Py-proteoliposome immunized animals. (A) IgG titers against *P. yoelii* schizont extracts or recombinant PyMSP1₁₉ after immunization with proteoliposomes (P) or MPLA-adjuvanted proteoliposomes (P+LA). Titers were measured by end point dilution ELISAs. In B, immunization-generated antisera recognized different *P. yoelii* protein species. Sera were used at a 1:2000 dilution in 10 μ g of *P. yoelii* schizont total protein extracts. * means significantly different ($p = 0.01$, Kruskal–Wallis, $n = 5$ per group).

Figure 3. Immunization of proteoliposomes protects BALB/c mice from death after *P. yoelii* challenge. Groups of mice ($n = 5$) were immunized with three doses of *P. yoelii* protein loaded liposomes with (C) or without MPLA (B) or with empty liposomes (A) and challenged i.p. with blood stage *P. yoelii*. The development of parasitemias are shown in each of the three groups, and the survival rate is shown in D. The experiment was repeated once with similar results. ** means statistically different (Mantel–Cox test, $p < 0.005$, $n = 5$ per group).

Figure 4. Immunization of BALB/c and C57BL/6 mice with *P. berghei* protein loaded liposomes (Plp) elicits immune responses against *P. berghei* extracts but only modest titers against rPbMSP1₁₉. In A, the antibody titers immediately before challenge ($n = 9–10$, control group $n = 3$) and 15 days after challenge (15 d) against *P. berghei* schizont extracts are shown. In B, the IgG titers against rPbMSP1₁₉ are shown, immediately before challenge and 15 days after infection (15 d, at least $n = 3$ ranging to 6; the range is caused by the death of mice). Note that there are a number of nonresponding mice and that infection led to boosting of titers in some mice. In C, a number of similar *P. berghei* schizont extract proteins were recognized by prechallenge sera of mice from two different genetic backgrounds.

animals seemed to die rather as a consequence of an overshooting immune response caused by subsequent contact with parasite antigens than due to high parasitemias which never surpassed 6% in surviving mice.

Immunizations with *P. berghei* Merozoite Proteins on Liposomes Elicit a Strong Response against Many Merozoite Proteins but Only a Modest Response against MSP1₁₉. A different profile of immune response and outcomes was observed when proteoliposomes were produced using GPI proteins from *P. berghei*. A strong antibody response against *P. berghei* schizont extract (PbSE) could be observed in many but not all mice, but only a few animals showed immunoglobulins specifically against MSP1₁₉ from *P. berghei* (Figure 4A). Again, we used two mouse lines to verify if the lack of immunity is restricted to a specific genetic host background. In all immunizations, the same result could be observed: a humoral response to PbSE (Figure 4B) but only a marginal response against rPbMSP1₁₉ when compared to the result achieved with rPyMSP1₁₉ (Figure 2). These data suggest that a response against PbMSP1₁₉ is more difficult to achieve than against MSP1₁₉ from other *Plasmodium* species. This is in accordance with previously published results.²³ When testing

immune sera in Western blots, recognition patterns slightly different from that of *P. yoelii* were observed. The recognized protein species had around 17 kDa, 40–50 kDa, and 25–35 kDa (Figure 4C).

We wondered if the lack of response against rPbMSP1₁₉ (Figure 4B) could be overcome by the use of an additional adjuvant. Taking into account the apparent toxic effect of MPLA on survival after *P. yoelii* challenge (Figure 3C), we decided to use Alum as an adjuvant to enhance the immune response caused by proteoliposomes. As a result, the amplitude of IgG response against MSP1₁₉ did not change, but we still observed a strong reaction against PbSE similar to immunization without Alum (Figure 4). This shows that a plateau of IgG response is reached already by proteoliposome immunization itself. Live parasites could be recognized by antibodies after immunization as seen in immunofluorescence microscopy using *P. berghei* merozoites (Supplementary Figure 2G). These results point to promising aspects for proteoliposomal formulations but also an intrinsic difficulty to induce an immune response against *P. berghei* including the normally strongly recognized MSP1₁₉. However, it seems that *P. berghei* is a resistant model for this type of immunization.²³ The use of Alum provoked

Figure 5. Parasitemia and survival of *P. berghei*-challenged C57BL/6 and BALB/c mice. Groups of mice ($n = 9$) were immunized with three doses of empty liposomes plus Alum (controls), proteoliposomes or proteoliposomes plus Alum and infected. In A and B, parasitemias and survival rates for C57BL/6 mice are shown. In C and D, parasitemias and survival rates for BALB/c mice are shown. The IgG isotypes change under infection: In BALB/c mice, an increase of IgG3 compared to IgG2a is observed (E), while in C57BL/6 mice an IgG2b increase in relation to IgG1 (paired t test in E and F with $n = 8-9$ to pre challenge) was noted. See [Supplementary Figures 4 and 5](#) for individual data.

only subtle changes in the subtypes of IgG produced by the immunizations ([Supplementary Figures 4 and 5](#)). Thus, the profile of produced isotypes was more influenced by the genetic background than the adjuvant used for immunizations. The dominantly induced IgG isotype is IgG2b in C57BL/6 mice, while IgG3 dominates in BALB/c mice. This difference was already observed using other infectious organisms such as *Leishmania*.^{24,25}

Proteoliposome-Induced Parasite Directed Antibodies Are Boosted in the *P. berghei* NK65-C57BL/6 and -BALB/c Model of Infection. In contrast to many other *Plasmodium* species, successful immunization with recombinant *P. berghei* MSP1₁₉ is difficult and results in very low antibody titers which are not boosted by infection.²³ This insufficient immune response against rPbMSP1₁₉ can be partially improved by administration of proteoliposomes. After immunizing mice with proteoliposomes, only few animals produced significant

antibody titers against rPbMSP1₁₉ ([Figure 4A](#)). We then measured if any existing antiPbMSP1₁₉ or antiPbSE titers could be boosted during infection. As shown in [Figure 4](#), 15 days after infection the control group showed a weak response against PbSE and only a marginal response against PbMSP1₁₉. On the other hand, animals immunized with proteoliposomes showed a significant increase in responses against rPbMSP1₁₉ and PbSE ($p < 0.05$, Kruskal–Wallis) ([Figure 4](#)). Curiously, in some cases, immunized animals without detectable antibodies against PbMSP1₁₉ at the time point of challenge showed titers on day 15. The response against schizont extracts increased from day 0 until day 15 of infection; however, a discrete decrease of titers occurred in some proteoliposome-immunized animals. This effect was more visible in the C57BL/6 proteoliposome/alum group. These data suggest that our immunization created immune responses against proteins loaded on proteoliposomes

Figure 6. Tendency of the increase of interleukins after challenge with *P. berghei*. Sera of C57BL/6 and BALB/c mice were analyzed by CBA for increase of interleukins during infection. Groups of mice (C57BL/6, black lines and BALB/c, red lines; each line represents one mouse) were immunized with three doses of empty liposomes plus Alum (controls) or proteoliposomes, and infected. In A and B, results of TNF- α production are shown for animals immunized with proteoliposomes and the control group (C57BL/6 mice), respectively. The levels of other interleukins IL-2, IL-4, and Inf- γ for C57BL/6 and BALB/c mice are shown in C, D, and E, respectively. The level of interleukins showed a tendency of increase or decrease in opposite directions for BALB/c and C57BL/6 (for IL-4 and INF- γ). TNF α seemed to increase in the control group, while this is less apparent in immunized animals. The statistical analyses was performed with the paired *t* test ($n = 5$, minimal number of animals alive after 15 days of infection), and *p* values close to significant or relevant for discussion are shown in the same color of each genotype.

and that this response may also be boosted by blood stage *P. berghei* infection.

Immunization with Proteoliposomes Can Induce Partial Resistance to *P. berghei* NK 65 Infection Dependent on the Host Background. Two different mouse lineages were immunized with proteoliposomes and then challenged with *P. berghei* NK65. This parasite line of *Plasmodium* causes a prolonged infection and is lethal in both lineages. Also, almost all types of immunization proved inefficient. It was observed that *Plasmodium* infection causes pronounced clonal exhaustion of important subsets of immune cells.²⁶ Further, the vaccine targets PbAMA-1 and PbMSP1₁₉ are only marginally immunogenic in this model.²³ Notwithstanding, the proteoliposome immunization showed a partially effective response in C57BL/6 mice, while BALB/c mice were not protected at all. C57BL/6 mice were somehow able to control parasitemia in lower levels between day 6 to day 14 after challenge (Figure 5A, significant differences when compared to the Alum-proteoliposome group or the proteoliposome group, ANOVA, $p < 0.05$).

From day 15 on, the immune response seemed to cease, and all mice died. However, immunized mice showed an increased survival time of 42% (control group survival post-challenge: 14 days; proteoliposome-immunized group average survival post-challenge, 20 days; Figure 5B). The group that received Alum plus proteoliposomes had their life span increased by 28% (average survival post-challenge: 18 days). Importantly, mice immunized with Alum apparently resisted until 18 day, after which the capacity to control parasitemia was lost. Interestingly, 11% and 20% of the mice treated with proteoliposomes and proteoliposomes plus Alum, respectively, completely eliminated parasites at 18 days post-infection without later recurrence of infection. In these survivor mice, the parasitemia was subpatent until day 15, after which they developed a peak parasitemia of around 10–15% followed by the absence of visible parasites (blood smear) on day 18. On the other hand, BALB/c mice did not show any capacity to control or even influence the progression of parasitemia (Figure 5C), and no difference between immunized and control groups was found in terms of survival (Figure 5D). In order to understand the different outcomes, we analyzed the differences in the humoral response

Figure 7. Immunization with proteoliposomes induces anti-PbGPI IgG. C57BL/6 and BALB/c mice (5 each) were immunized with three doses of *P. berghei* GPI-anchored protein loaded liposomes as described. Eight days after the last dose, sera were retrieved and tested in ELISA against GPI anchors. As a control, the sera of empty liposome-immunized mice were tested in parallel (2 BALB/c and 2 C57BL/6; due to the similarity of values, these are shown together). The ELISA absorbance values are given (y-axis) for each point of a serial sera dilution, and mean OD_{450 nm} values and their standard deviations are shown.

against PbSE. Probably, any protective effect observed in C57BL/6 mice cannot be associated with antibody titers since both BALB/c and C57BL/6 showed similar results upon immunization and also 15 days after challenge (see Figure 4). However, the isotypes produced by each genetic background were different (Supplementary Figure 3). In C57BL/6 mice, the prevalent isotype was IgG2b followed by IgG1. In BALB/c mice, the most abundant IgG were of the IgG1 subclass followed by IgG2a in the proteoliposome group without Alum, while in the group immunized with proteoliposomes plus Alum the most abundant IgG class was IgG3 followed by IgG2a. Curiously, 15 days after challenge both BALB/c mice groups presented IgG3 as the most abundant isotype followed by IgG2a (Supplementary Figure 5B and D). We then evaluated the IgG3/IgG2a and the IgG2b/IgG1 ratio to define the humoral response profile. The magnitude of this ratio increases equally between day 0 until day 15 post-infection without change in both models (Figure 5E and F). The response against PbSE or rPbMSP1₁₉ did not differ between both mouse lineages between day 0 and day 15 post-infection (Figure 4A and B). We hypothesize that the cytophilic profile exhibited by C57BL/6 mice may be responsible for the partial protection, understood as the control of parasitemia, and also substantial reduction in mice that were protected from death.

In order to evaluate if levels of specific cytokines are associated with the partial resistance in C57BL/6 mice, we analyzed the CBA profile from each mouse on day 0 and day 15 after challenge. No significant changes in IL-6, IL-10 (data not shown), and IL-2 production were observed (Figure 6C).

For TNF- α , we expected a decrease in immunized mice similar to what was shown in previous *in vitro* experiments when sera of proteoliposome-immunized mice were able to decrease RAW cell activation upon stimulation of these cells with schizont extract.¹¹ In accordance with this, the unprotected control group showed clearly increased TNF- α levels (Figure 6B), probably as a consequence of the augmented presence of parasite antigens. Immunized mice showed a disperse pattern of response (Figure 6A) with no discernible difference compared to that of control mice (Figure 6B). A slight, yet insignificant increase of IFN- γ and IL-4 could be observed in surviving mice (Figure 6D and E). In BALB/c mice, we found an opposite effect: immunized animals showed lower levels of IFN- γ and IL-4 at day 15 of infection compared to prechallenge (Figure 6D and E, red lines). We conclude that the immunization at least influenced cytokine production and

in some cases may have led to a beneficial effect by limiting TNF- α in some of the immunized mice after *in vivo* challenge in the *P. berghei* model of infection. Finally, we tested if *P. berghei* proteoliposome immunization also induced antibodies against the GPI moiety of the plasmodial proteins present on liposomes. As shown in Figure 7, BALB/c and also C57BL/6 mice had higher quantities of antiGPI antibodies than mock-immunized mice after immunization (prechallenge).

DISCUSSION

Liposomes are an effective means to deliver cargo to live cells but also to function as immunogenic particles with tunable properties.²⁷ Starting from the observation that *P. falciparum* merozoite GPI protein-loaded liposomes were quite effective in generating invasion- and inflammation-inhibiting antibodies in mice,¹¹ we show herein that liposomes can also be loaded with *P. yoelii* and *P. berghei* merozoite-derived GPI-anchored proteins. All immunized animals developed specific antibodies against native merozoite proteins of both *Plasmodium* species. Further, *P. yoelii* proteoliposome-immunized mice were protected against blood stage infection, while *P. berghei* proteoliposome-immunized mice showed a lower degree of protection or no protection at all. The immunogenic effect of the liposomal immunization is probably due to the costimulating GPI-anchors which are known ligands of TLR2 and TLR4²⁸ and maybe residual genomic DNA complexed to trace amounts of hemozoin.²⁹ It is also possible that the increased surface concentration of antigens displayed on proteoliposomes leads to increased immune responses.³⁰

Being the invasive forms of blood stage *Plasmodium*, merozoites are believed to contain numerous vaccine targets, and it is probable that at least a part of these (specifically GPI anchored proteins or complexes with GPI-anchored components) are displayed on proteoliposomes. The exact nature of proteins and their stoichiometry contained on proteoliposomes is still elusive and currently the subject of mass spectrometry analysis. From a previous study, it was known that the GPI-anchored 19 kDa C-terminal of MSP1 was represented on proteoliposomes.¹¹ By the use of an antibody against the N-terminus of PbMSP1, we could even detect the full length form of this protein. Accordingly, we were able to detect antibodies against the *P. yoelii* and to a much lower degree, against the *P. berghei* version of this protein. Of note, due to immunogenic properties and the sometimes strong inhibitory effect of antibodies against this domain, MSP1₁₉ is considered an

important component of an antileishmanial stage vaccine (reviewed in ref 31). In the previous study, the invasion-linked antigen PfrH5 was also detected on Pf-proteoliposomes. If a similar, yet undetected complex such as PfrH5-RIPR-CyRPA exists on *P. yoelii* merozoites, antibodies against this complex may probably also be involved in blocking reinvasion and preventing higher parasitemias *in vivo*. Similar to what was previously shown for *P. falciparum* merozoite GPI-anchored protein-loaded liposomes, a number of different proteins with sizes ranging from ~17–250 kDa were recognized in extracts from merozoites of either species after immunization with proteoliposomes. While most of the recognized species may represent proteolytic fragments of MSP1 (due to its abundance on merozoites), other proteins, perhaps important for the observed protective effect, are possibly also detected.

The decisive step in the test of vaccine formulations is their testing in experimental infections. When *P. yoelii* proteoliposome-immunized mice were challenged with *P. yoelii* XL, we found very effective protection not only protecting mice from death but also from exacerbated parasitemias. The degree of protection is comparable to what was observed when immunizing recombinant RON2L-AMA1³² and better than a MAEBL-based vaccine,²¹ indicating that proteoliposomes indeed contained vaccine-relevant antigens. Adjuvants are important modulators of the immune response generated by vaccines. Therefore, we were interested in the question if the inclusion of two FDA-approved adjuvants were able to enhance the immunogenic effect of proteoliposomes. In one case, proteoliposomes with 100 nm were absorbed on Alum most probably creating a depot effect with the release of proteoliposomes evoking an increase of a Th2 type response.³³ However, the use of Alum did not further increment the maximum antibody titer, and its use had similar effects in BALB/c and C57BL/6 mice. On the other hand, the immune responses against PyMSP1₁₉ could be improved 10-fold by the inclusion of MPLA in immunizations with proteoliposomes from *P. yoelii*. Of note, this adjuvant enhances Th1 and Th2 type responses.³⁴ Using this adjuvant, we also observed significantly lower parasitemias after a lethal challenge with *P. yoelii* XL. However, there also seemed to occur an overshooting response, killing animals after a few days of contact with blood stage *P. yoelii*. The low parasitemias in the animals that died after immunization and challenge were probably not responsible for the death of the animals. We hypothesize that an appropriate modulation of the immune response may be possible by testing the ideal quantity of MPLA and proteoliposomes. Other studies have shown an increase of allergenic cytokines upon MPLA use.³⁵ The herein used quantity of MPLA seems adequate for formulations with protein loaded liposomes, but no such dramatic effect as that documented here was observed before,²² although no data exist on the admixture of MPLA to proteoliposomes followed by challenge. In another model using visceral leishmaniasis, Mazumder and colleagues formulated a liposome based, modified-MPLA vaccine using recombinant gp63 as immunogen delivered via the subcutaneous route. These authors observed a strong enhancement of the Th1 response, namely, a strong expansion of interferon- γ T cells.³⁶ It is possible that the adverse reaction observed in our study is caused by the overshooting of a pro-inflammatory response, given the fact that a number of different antigens was used instead of only one type of recombinant polypeptide. Additionally, it is possible that the strong reaction was induced by the immunization route

(i.p.) which may not be adequate in this kind of trial. Moon and colleagues used MPLA in subcutaneous formulations of liposomes coupled with one vaccine candidate protein.²²

The IgG isotypes generated by vaccines indicate which subset of the humoral immune response was stimulated (for example, see ref 37). Accordingly, we observed alterations in IgG antibody isotypes depending on which adjuvant was administered with proteoliposomes. As shown above, the intensity of the humoral response did not increase with Alum, but a slight change in the IgG isotype profile to higher portions of IgG1 (Th2 type response) was seen when using *P. berghei* protein-loaded liposomes. Interestingly, in some cases the infection changed the vaccine-induced IgG isotype profile. In the susceptible model of *P. berghei* infection of BALB/c mice, a higher relative quantity of cytophilic IgG2a antibodies was observed before challenge. Under infection, apparently only IgG3 was efficiently boosted since the other isotypes remained unchanged. IgG3 normally functions to react with carbohydrate-linked molecules.³⁸ These data suggest that a predominant effect is caused by infection itself once that all animals showed an IgG3 increase at day 15 post-infection. Apparently, an existing type of response profile is modified by infection. A similar effect was already observed by Kumar and colleagues.³⁹ Additionally, the origin of antigens is able to modify immune responses and IgG isotypes, as shown for worm/*Plasmodium* coinfections.⁴⁰

We also tried to characterize the cytokine production and its modulation through immunization with proteoliposomes, delivered with adjuvant or not. Although none of the observed differences was statistically significant, in some instances borderline results were obtained. Specifically, the increase of IL-4 together with Interferon- γ is apparently necessary for protection in C57BL/6 mice infected with *P. berghei*. The increase of both enhances a mixed Th1/Th2 (noted by the subclasses of produced IgGs) response which then drives the effective control of parasitemia. The similar effect was observed also in BALB/c mice during *P. yoelii* infections. On the other hand, BALB/c mice that do not increase these cytokines produce dominant subclasses for a Th2 response and toxic molecules (IgG3) which are not effective in the control of the parasitemia, as observed in the infection trials with *P. berghei*. The explanation of the different outcomes of infection is not trivial and involves the infecting species (*P. yoelii* versus *P. berghei*), and their pathogenic^{41,42} and antigenic properties correlated with the genetic background of mice.⁴³

Besides the particularity of each infection, one biotechnological aspect of our vaccine formulations is the enhancement of the humoral response in all mice tested. On the basis of previous results,^{11,22,44} the use of GPI proteins in vaccines is quite effective to elicit a strong humoral response, with higher titers of antibodies. The most probable reason for this may be found in the fact that antigens included by coinfection appear on the outside of particles and become accessible to recognition by B-cells⁴⁵ and accessory cells such as follicular dendritic cells.^{22,46} Additionally, the plasmodial GPI moieties may not be efficient costimulating molecules, but antibodies against them may also help control a deleterious overshooting of the immune response during higher parasitemias.

In summary, the herein applied system is very effective in eliciting and boosting a humoral response specifically when lipid-anchored structures are to be targeted. When target proteins of interest are available in a purified GPI- or other lipid-anchored form, these may be used to produce defined-

678 cargo liposomes for a broad range of applications such as
679 neuropathology studies⁴⁷ or vaccine studies using recombinant
680 proteins such as those shown by Moon and colleagues.²²

681 ■ CONCLUSIONS

682 In this work, we produced a vaccine based on GPI-proteins
683 from two murine *Plasmodium* species loaded on liposomes.
684 Proteoliposome immunization completely saved highly suscep-
685 tible BALB/c animals from death against *P. yoelii*, and a number
686 of C57BL/6 mice were protected from death after infection
687 with *P. berghei* NK65, eliminating circulating parasites. Different
688 adjuvants modified the profile of the response, which is
689 important since the partial resistance observed in C57BL/6
690 appears to be correlated with cytophilic IgG isotypes and the
691 increase of specific interleukins. Proteoliposome vaccination,
692 perhaps as an adjuvant with equilibrated amounts of MPLA,
693 may prove successful in situations where conventional vaccines
694 show low efficacy.

695 ■ ASSOCIATED CONTENT

696 ● Supporting Information

697 The Supporting Information is available free of charge on the
698 ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsbiomater-
699 ials.6b00492.

700 Characterization of *P. yoelii* proteoliposomes, immuno-
701 fluorescence images using generated antisera for the
702 detection of live or fixed parasites, and the detected IgG
703 isotypes before and after infection with *P. yoelii* or *P.*
704 *berghei* (PDF)

705 ■ AUTHOR INFORMATION

706 Corresponding Author

707 *Phone: +55 11 30917265. Fax: +55 11 30917417. E-mail:
708 gwunder@usp.br.

709 Notes

710 The authors declare no competing financial interest.

711 ■ ACKNOWLEDGMENTS

712 We thank FAPESP (projects 2012/23306-5 and 2015/17174-7
713 to G.W.; FAPESP doctoral fellowship no. 2012/18617-1 to
714 W.L.F.) and CAPES (project NANOCAPEs to R.G.S., P.C.,
715 and G.W.). G.W., P.C., and R.G.S. are CNPq Research Fellows.

716 ■ REFERENCES

- 717 (1) WHO. *World Malaria Report 2013*; WHO: Geneva, Switzerland,
718 2013.
- 719 (2) Jambou, R.; Legrand, E.; Niang, M.; Khim, N.; Lim, P.; Volney,
720 B.; Ekala, M. T.; Bouchier, C.; Esterre, P.; Fandeur, T.; et al. Resistance
721 of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and
722 point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* **2005**, 366
723 (9501), 1960–1963.
- 724 (3) Dondorp, A. M.; Nosten, F.; Yi, P.; Das, D.; Phyto, A. P.; Tarning,
725 J.; Lwin, K. M.; Ariey, F.; Hanpithakpong, W.; Lee, S. J.; et al.
726 Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J.*
727 *Med.* **2009**, 361 (5), 455–467.
- 728 (4) Mullard, A. EMA approves first ever malaria vaccine. *Nat. Rev.*
729 *Drug Discovery* **2015**, 14 (9), 593.
- 730 (5) Moorthy, V. S.; Okwo-Bele, J.-M. Final results from a pivotal
731 phase 3 malaria vaccine trial. *Lancet* **2015**, 386 (9988), 5–7.
- 732 (6) Douglas, A. D.; Williams, A. R.; Illingworth, J. J.; Kamuyu, G.;
733 Biswas, S.; Goodman, A. L.; Wyllie, D. H.; Crosnier, C.; Miura, K.;
734 Wright, G. J.; et al. The blood-stage malaria antigen PfPR5 is

- susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody. *Nat.*
735 *Commun.* **2011**, 2, 601.
- (7) Reddy, K. S.; Amlabu, E.; Pandey, A. K.; Mitra, P.; Chauhan, V.
737 S.; Gaur, D. Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA
738 with PfRH5 and PfRipr is crucial for *Plasmodium falciparum*
739 erythrocyte invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, 112 (4), 1179.
- (8) Cohen, S.; McGregor, I. A.; Carrington, S. Gamma-globulin and
741 acquired immunity to human malaria. *Nature* **1961**, 192, 733–737.
- (9) Beeson, J. G.; Osier, F. H. A.; Engwerda, C. R. Recent insights
743 into humoral and cellular immune responses against malaria. *Trends*
744 *Parasitol.* **2008**, 24 (12), 578–584.
- (10) Schofield, L.; Hewitt, M. C.; Evans, K.; Siomos, M.-A.;
746 Seeberger, P. H. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a
747 model of malaria. *Nature* **2002**, 418 (6899), 785–789.
- (11) Fotoran, W. L.; Santangelo, R. M.; Medeiros, M. M.; Colhone,
749 M.; Ciancaglini, P.; Barboza, R.; Marinho, C. R. F.; Stábili, R. G.;
750 Wunderlich, G. Liposomes loaded with *P. falciparum* merozoite-
751 derived proteins are highly immunogenic and produce invasion-
752 inhibiting and anti-toxin antibodies. *J. Controlled Release* **2015**, 217,
753 121.
- (12) Stoute, J. A.; Slaoui, M.; Heppner, D. G.; Momin, P.; Kester, K.
755 E.; Desmons, P.; Welde, B. T.; Garçon, N.; Krzych, U.; Marchand, M.
756 A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein
757 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria
758 Vaccine Evaluation Group. *N. Engl. J. Med.* **1997**, 336 (2), 86–91.
- (13) Janse, C. J.; Ramesar, J.; Waters, A. P. High-efficiency
760 transfection and drug selection of genetically transformed blood
761 stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat. Protoc.*
762 **2006**, 1 (1), 346–356.
- (14) Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.
764 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*
765 **1951**, 193 (1), 265–275.
- (15) Santos, L. E. R.; Colhone, M. C.; Daghanli, K. R. P.; Stábili,
767 R. G.; Silva-Jardim, I.; Ciancaglini, P. Lipid microspheres loaded with
768 antigenic membrane proteins of the *Leishmania amazonensis* as a
769 potential biotechnology application. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, 340
770 (1), 112–118.
- (16) Moon, J. J.; Suh, H.; Li, A. V.; Ockenhouse, C. F.; Yadava, A.;
772 Irvine, D. J. Enhancing humoral responses to a malaria antigen with
773 nanoparticle vaccines that expand T_H cells and promote germinal
774 center induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, 109 (4), 1080–
775 1085.
- (17) Ljungström, I.; Perlmann, H.; Schlichterle, M.; Scherf, A.;
777 Wahlgren, M. *Methods in Malaria Research*, 5th ed.; Moll, K.,
778 Ljungström, I., Perlmann, H., Scherf, A., Wahlgren, M., Eds.; MR4/
779 ATCC, BioMalPar: Manassas, VA, 2008.
- (18) Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A*
781 *Laboratory Manual*, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press:
782 New York, 1989.
- (19) Medeiros, M. M.; Fotoran, W. L.; Dalla Martha, R. C.;
784 Katsuragawa, T. H.; Pereira da Silva, L. H.; Wunderlich, G. Natural
785 antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens
786 MSP5, MSP9 and EBA175 is associated to clinical protection in the
787 Brazilian Amazon. *BMC Infect. Dis.* **2013**, 13, 608.
- (20) Janse, C. J.; Franke-Fayard, B.; Waters, A. P. Selection by flow-
789 sorting of genetically transformed, GFP-expressing blood stages of the
790 rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *Nat. Protoc.* **2006**, 1 (2),
791 614–623.
- (21) Leite, J. A.; Bargieri, D. Y.; Carvalho, B. O.; Albrecht, L.; Lopes,
793 S. C. P.; Kayano, A. C. A. V.; Farias, A. S.; Chia, W. N.; Claser, C.;
794 Malleret, B.; et al. Immunization with the MAEBL M2 Domain
795 Protects against Lethal *Plasmodium yoelii* Infection. *Infect. Immun.*
796 **2015**, 83 (10), 3781–3792.
- (22) Moon, J. J.; Suh, H.; Polhemus, M. E.; Ockenhouse, C. F.;
798 Yadava, A.; Irvine, D. J. Antigen-displaying lipid-enveloped PLGA
799 nanoparticles as delivery agents for a *Plasmodium vivax* malaria
800 vaccine. *PLoS One* **2012**, 7 (2), e31472.
- (23) Yoshida, S.; Nagumo, H.; Yokomine, T.; Araki, H.; Suzuki, A.;
802 Matsuoka, H. *Plasmodium berghei* circumvents immune responses

- induced by merozoite surface protein 1- and apical membrane antigen 1-based vaccines. *PLoS One* **2010**, *5* (10), e13727.
- (24) Alexander, J.; Satoskar, A. R.; Russell, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J. Cell Sci.* **1999**, *112* (Pt 18), 2993–3002.
- (25) Stout, R. D.; Bottomly, K. Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN- γ producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages. *J. Immunol.* **1989**, *142* (3), 760–765.
- (26) Butler, N. S.; Moebius, J.; Pewe, L. L.; Traore, B.; Doumbo, O. K.; Tygrett, L. T.; Waldschmidt, T. J.; Crompton, P. D.; Harty, J. T. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. *Nat. Immunol.* **2012**, *13* (2), 188–195.
- (27) Simão, A. M. S.; Bolean, M.; Cury, T. A. C.; Stabeli, R. G.; Itri, R.; Ciancaglini, P. Liposomal systems as carriers for bioactive compounds. *Biophys. Rev.* **2015**, *7* (4), 391–397.
- (28) Riley, E. M.; Wahl, S.; Perkins, D. J.; Schofield, L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol.* **2006**, *28* (1–2), 35–49.
- (29) Parroche, P.; Lauw, F. N.; Goutagny, N.; Latz, E.; Monks, B. G.; Visintin, A.; Halmen, K. A.; Lamphier, M.; Olivier, M.; Bartholomeu, D. C.; et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (6), 1919–1924.
- (30) Fehr, T.; Skrastina, D.; Pumpens, P.; Zinkernagel, R. M. T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95* (16), 9477–9481.
- (31) Holder, A. A. The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria. *Parasitology* **2009**, *136* (12), 1445–1456.
- (32) Srinivasan, P.; Ekanem, E.; Diouf, A.; Tonkin, M. L.; Miura, K.; Boulanger, M. J.; Long, C. A.; Narum, D. L.; Miller, L. H. Immunization with a functional protein complex required for erythrocyte invasion protects against lethal malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (28), 10311–10316.
- (33) Lindblad, E. B. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol. Cell Biol.* **2004**, *82* (5), 497–505.
- (34) Hu, X.; Liu, R.; Zhu, N. Enhancement of humoral and cellular immune responses by monophosphoryl lipid A (MPLA) as an adjuvant to the rabies vaccine in BALB/c mice. *Immunobiology* **2013**, *218* (12), 1524–1528.
- (35) Schülke, S.; Vogel, L.; Junker, A.-C.; Hanschmann, K.-M.; Flaczyk, A.; Vieths, S.; Scheurer, S.; Schülke, S.; Vogel, L.; Junker, A.-C.; et al. A Fusion Protein Consisting of the Vaccine Adjuvant Monophosphoryl Lipid A and the Allergen Ovalbumin Boosts Allergen-Specific Th1, Th2, and Th17 Responses in Vitro. *J. Immunol. Res.* **2016**, *2016*, 1–8.
- (36) Mazumder, S.; Maji, M.; Ali, N. Potentiating Effects of MPL on DSPC Bearing Cationic Liposomes Promote Recombinant GP63 Vaccine Efficacy: High Immunogenicity and Protection. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2011**, *5* (12), e1429.
- (37) Bershteyn, A.; Hanson, M. C.; Crespo, M. P.; Moon, J. J.; Li, A. V.; Suh, H.; Irvine, D. J. Robust IgG responses to nanograms of antigen using a biomimetic lipid-coated particle vaccine. *J. Controlled Release* **2012**, *157* (3), 354–365.
- (38) Perlmutter, R. M.; Hansburg, D.; Briles, D. E.; Nicolotti, R. A.; Davie, J. M. Subclass restriction of murine anti-carbohydrate antibodies. *J. Immunol.* **1978**, *121* (2), 566–572.
- (39) Kumar, V.; Rakha, A.; Saroa, R.; Bagai, U. CD4+T Cells Expansion in P. berghei (NK-65) Infected and Immunized BALB/C Mice. *J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *05* (03), 229.
- (40) Fairlie-Clarke, K. J.; Lamb, T. J.; Langhorne, J.; Graham, A. L.; Allen, J. E. Antibody isotype analysis of malaria-nematode co-infection: problems and solutions associated with cross-reactivity. *BMC Immunol.* **2010**, *11*, 6.
- (41) Hafalla, J. C. R.; Claser, C.; Couper, K. N.; Grau, G. E.; Renia, L.; de Souza, J. B.; Riley, E. M. The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Inhibitory Pathways Independently Regulate Host Resistance to Plasmodium-induced Acute Immune Pathology. *PLoS Pathog.* **2012**, *8* (2), e1002504.
- (42) Couper, K. N.; Blount, D. G.; Hafalla, J. C. R.; van Rooijen, N.; de Souza, J. B.; Riley, E. M. Macrophage-Mediated but Gamma Interferon-Independent Innate Immune Responses Control the Primary Wave of Plasmodium yoelii Parasitemia. *Infect. Immun.* **2007**, *75* (12), 5806–5818.
- (43) Vaughan, K.; Blythe, M.; Greenbaum, J.; Zhang, Q.; Peters, B.; Doolan, D. L.; Sette, A. Meta-analysis of immune epitope data for all Plasmodia: overview and applications for malarial immunobiology and vaccine-related issues. *Parasite Immunol.* **2009**, *31* (2), 78–97.
- (44) Colhone, M. C.; Silva-Jardim, I.; Stabeli, R. G.; Ciancaglini, P. Nanobiotechnologic approach to a promising vaccine prototype for immunisation against leishmaniasis: a fast and effective method to incorporate GPI-anchored proteins of Leishmania amazonensis into liposomes. *J. Microencapsulation* **2015**, *32*, 143.
- (45) Wang, J.; Tang, S.; Wan, Z.; Gao, Y.; Cao, Y.; Yi, J.; Si, Y.; Zhang, H.; Liu, L.; Liu, W. Utilization of a photoactivatable antigen system to examine B-cell probing termination and the B-cell receptor sorting mechanisms during B-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (5), E558–E567.
- (46) Heesters, B. A.; Chatterjee, P.; Kim, Y.-A.; Gonzalez, S. F.; Kuligowski, M. P.; Kirchhausen, T.; Carroll, M. C. Endocytosis and recycling of immune complexes by follicular dendritic cells enhances B cell antigen binding and activation. *Immunity* **2013**, *38* (6), 1164–1175.
- (47) Olschewski, D.; Seidel, R.; Miesbauer, M.; Rambold, A. S.; Oesterhelt, D.; Winklhofer, K. F.; Tatzelt, J.; Engelhard, M.; Becker, C. F. W. Semisynthetic murine prion protein equipped with a GPI anchor mimic incorporates into cellular membranes. *Chem. Biol.* **2007**, *14* (9), 994–1006.

Figure 1: Effective encapsulation of plasmids into liposomes. **A:** Cryoelectron microscopic picture of liposomes after the plasmid loading step. In **B**, results for the titration of encapsulating lipids versus DNA are shown. Murine melanoma cells (B16-F10) were transfected with different lipid/pcDNA3-luc formulations (experiments in duplicates, three independent experiments) and relative light units were measured two days after exposure of lipid/DNA complexes to cells. In **C**, overnight DNase1 digests were conducted to elucidate the packaging efficiency in dependence of lipid/DNA ratios of the formulations tested in **B**. The experiment was conducted using lipid/DNA formulations starting with initially 25 μg DNA packaged in the given lipid amounts, divided in three tubes and digested with DNase1. Afterwards, lipid/DNA formulations were chloroform-extracted as described and the aqueous fraction was loaded on 1% EtBr-stained agarose gels. Below the gel, the relative density values of three gels measured by densitometry against the control lane which contained 1 μg pcDNA3-Luc DNA (100% equals approx. 8,3 ug) are shown. Note that formulation with 8 nM lipids per μg DNA resulted in almost complete DNase protection of packaged DNA.

Figure 2: High efficiency of transfection using plasmid loaded liposomes compared to a commercial kit. In **A**, 5×10^5 HEK293T cells were seeded in 6well plates and transfected 24 h later with pcDNA3-GFP using either JetPei reagent or DNA loaded liposomes. Green fluorescence was observed 48 h after transfection, using cytometry. Mock-transfected cells did not show any GFP fluorescence (data not shown). In **B**, the plasmid pcDNA3-luc was transfected in a similar way in CHO-K1 cells, using additionally cells transfected with uncomplexed (naked) DNA. 48 h after transfection, the relative light units were measured and normalized to the quantity of protein used in the luciferase assay. Mock-transfected cells did not produce any discernible luciferase activity under these conditions (data not shown).

Figure 3: Liposome mediated DNA immunization results in antibodies against the fused protein but less against HBsAg. In **A**, endpoint titers of antiGFP, antiPvCS and antiPvMSP1₁₉ were measured. Individual sera of 4 (GFP) or 5 immunized mice were tested in endpoint dilutions and the dilution factor where the sera still showed positive signals above background are shown. For ELISA plate coating, recombinant GST-GFP, -CS, and -PvMSP1₁₉ were used. In **B**, endpoint dilution titers against recombinant HBsAg are shown. Sera were from mice immunized with pcDNA3HBs alone or pcDNA3-PfRH5-HBs. Significantly different values (Student's T test) are indicated by "***" ($p = 0.019$ in all comparisons). N.S. means not significant.

Figure 4: Sera from pcDNA3-PfRH5-HBsAg immunized mice recognize native PfRH5 in *P. falciparum* NF54 schizont extracts (lane 1) and also recombinant recombinant GST-PfRH5 (lane 2, **A**). In **B**, the endpoint dilution ELISA showed antibody titers against GST-PfRH5 comparable to those obtained against PvCS and PvMSP1₁₉. No significant titers against PfRH5 were found in pre-immune sera (data not shown). In **C**, immunofluorescence microscopy shows that pooled immune sera (1:20) also recognize PfRH5 in native late stage schizonts.

Figure 5: *P. falciparum* blood stage invasion blocking activity of purified IgGs from pcDNA3-PfRH5-HBs liposome-encapsulated immunized mice. In **A**, the percentage of growth inhibition of parasite proliferation (measured by flow cytometry) is shown for three dilutions of purified IgG. The shown values were calculated comparing to parasitemias in parallel cultures supplemented with 600 µg/ml non-related IgG (= 0% growth inhibition). In **B**, the dose-dependency is demonstrated by plotting the content of antiPfRH5-specific titers against the growth inhibitory/blocking effect of IgG. Correlation coefficients were $r=0.5$ at 180 µg/ml, $r=0.65$ at 300 µg/ml, $r=0.5$ at 600 µg/ml.

Figure 7: Inguinal lymphocytes from DNA-loaded liposome-immunized Balb/c mice are stimulated by specific antigens. Lymphocytes from spleen or inguinal lymphnodes were removed from immunized mice and exposed to different stimuli *in vitro*. Proliferation assays took place 60 days after the last immunization with either liposome-packaged pcDNA3A-PfRH5-HBs or pcDNA3A-HBs. 5×10^5 cells were labeled with 100 ng of CFSE. Cells were then challenged by exposure to DNA-liposome formulations (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of DNA per 5×10^5 cells) that were used in the immunizations (plasmids pcDNA3-PfRH5-HBs and pcDNA3-HBs). As a control, a non-specific reporter plasmid (pcDNA3-Luc) was used. After three days, luminescence levels in cells were analyzed by flow cytometry. In **A**, the CFSE decay from lymphocytes stained with CFSE and stimulated with Concanavalin A (blue), pcDNA3-PfRH5-Hbs from Lymph node (red) and pcDNA3-HBs from Spleen is shown. In **B**, the proliferation rate from inguinal lymph node cells stimulated with pcDNA3-PfRH5-Hbs and the respective control made with a plasmid encoding the non related protein luciferase is shown. Statistic analysis were performed using a paired T-test with $n=4$ animals. In **C**, the proliferation rate from spleen cells stimulated with pcDNA3-PfRh5-HBs and pcDNA3-HBs and the respective control with pcDNA3-luc loaded liposomes is shown. Statistic tests were done as in **B** ($n=4$ animals).

DNA-loaded cationic liposomes efficiently function as a vaccine against malarial proteins

Rachele Santangelo^{1#}, Wesley L. Fotoran^{1#} and Gerhard Wunderlich^{1,*}

Abstract

The delivery of antigens as DNA vaccines is an efficient alternative to induce immune responses against antigens which are difficult to produce in recombinant form. However, the delivery of naked DNA is ineffective or relies on sophisticated ballistic devices. Here we show a combination of liposome application and naked DNA vaccine which successfully overcomes these problems. Upon entrapment of plasmids encoding different antigens in cationic particles, transfection efficiencies similar to commercial kits were achieved in *in vitro* cell cultures. The liposome-based approach provided strong humoral responses against three malarial antigens, namely CSP and MSP1₁₉ from *Plasmodium vivax* (titers 10⁴ or 10³-10⁴, respectively) and PfRH5 from *Plasmodium falciparum* (titers 10³-10⁴). When employed in *P. falciparum* growth inhibition assays, antibodies showed consistent reinvasion blocking activities which were dose-dependent. Liposome-formulated DNA vaccines may prove useful when targets cannot be produced as recombinant proteins and when conformation-dependent and highly specific antibodies are mandatory.

1: Department of Parasitology, Institute for Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo - SP, 05508000, Brazil

these authors contributed equally to the work

*to whom correspondence should be sent: gwunder@usp.br, Phone +551130917265

Introduction

Gene therapy has developed into an important application for many applications¹. One of these is the use of genes in DNA vaccines². The perhaps most important advantage is the facilitated production of DNA in GMP quality instead of the often cumbersome production of correctly folded recombinant antigen or its production in modified virus³. In the case of malaria vaccines, one example is the blood stage antigen PfRH5 which is hard to produce in recombinant form, but seems extremely promising in preliminary immunization tests⁴. The most successful immunization was achieved in delivering the antigen via modified Adenovirus⁴. DNA vaccines and recombinant virus have different problems for application as vaccines. For example, the amount of DNA to be used in naked DNA vaccines normally exceeds the quantity of recombinant protein that would be used for the same purpose. Also, the number of effectively loaded cells which then initiate the production of the vaccine antigen is quite low², leading to a modest immune response. Although highly effective and immunogenic, recombinant viruses cause an immune response against themselves which then hampers effective boosting against the vaccine antigen⁵. The latter effect can be partially overcome using prime-boost protocols using different virus platforms or prime boost protocols using recombinant virus priming followed by a recombinant protein or recombinant virus boost (see for example⁶). Both issues are important points to consider when planning vaccines^{5,6}.

Another important point is the design of a DNA vaccine vector to enhance immunological responses⁷. Targets without strong T helper cell epitopes may be tagged to universal T cell epitopes such as PADRE⁸. A further approach is the fusion of the target antigen to a particle-forming peptide which then presents the target on virus like particles or virosomes (reviewed in⁹). In this context, we designed a model based on the actual and approved vaccine against malaria, RTS/S¹⁰. We fused several vaccine-relevant antigen encoding genes to the gene encoding the small hepatitis B surface protein which itself forms empty virosomes. In order to enhance the potential of DNA vaccination without the use of sophisticated technology such as ballistic devices or microneedles, we loaded the recombinant plasmid DNAs in fusogenic liposomes. The total amount of vaccine DNA used here is about 10 times less than what is used in conventional, needle delivered naked DNA vaccines¹¹. As a proof of principle, we use the antisera against the PfRH5 antigen produced in mice to obtain intense *Plasmodium* reinvasion inhibition, comparable to what was achieved with adenoviral vectors.

Material and Methods

Liposome preparation and entrapment of plasmid DNA

Liposomes were prepared using DDAB (Dimethyl-di-octadecyl-ammonium), cholesterol (molar ratio 4:1) and DSPE+PEG2000 (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000, 5% of total lipids used). Initially both DDAB, cholesterol and DSPE-PEG2000 were dissolved in 1 ml of chloroform and were then left under a constant N₂ flow for evaporation of chloroform and the formation of a phospholipid film on the tube walls. This film was then maintained under vacuum for at least 1 hour to remove any remaining chloroform. The film was rehydrated in 5 mM Tris HCl, pH7.5 at 60°C (DDAB transition temperature) during 1 hour and vigorously stirred every 10 minutes. The obtained opaque solution was then subjected to sonication at high energy until the solution became almost completely transparent. Then, the solution was centrifuged for one hour at 100.000 *g*. Any residual pellet was discarded and the supernatant containing unilamellar lipid vesicles were used for preparation of the liposomal formulation.

The cationic liposomal nanoparticles were loaded with target DNA using different amounts of plasmid per nmol of lipid (from 1 nM to 8 nM DDAB lipids per µg plasmid). Then, seven alternating cycles of freezing in liquid nitrogen for 1 min and thawing in a water bath of 60°C for 1 min were applied. Following this, the formulation was passed through polystyrene membranes with pore sizes of 0.1 µm for at least seven times (extrusion). All plasmid DNA constructs used herein are shown in Supplementary Figure 1.

Retention test

In order to test retention in liposomes, plasmids were encapsulated in liposomes in different lipid to plasmid quantity ratios as described. After entrapment, DNase I was added to each formulation including a control without cationic liposomes. The product of this digestion was extracted by phenol/chloroform, centrifuged and ethanol and Na-acetate (pH 5.2, 0.3 M final) was added for precipitation on ice for 1 hour. After centrifugation at 10000 *g* the extraction product was submitted to electrophoresis in the presence of ethidium bromide in a conventional TAE agarose gel of 1%. As additional control, liposomal DNA vaccines without phenol extraction and plasmid alone without any manipulation were used as a standard to visualize plasmids that could be protected from DNase treatment.

Immunization

Five groups of five male BALB/c mice were immunized intraperitoneally in accordance with national animal welfare regulations. We used 4 doses of 10 µg DNA

vaccine/cationic particles to immunize animals every 15 days. In order to enhance immune reaction, the last dose was performed in the presence of a pcDNA3-based plasmid expressing murine interferon-gamma¹². This plasmid was used in a ratio of 1:100 relative to the antigen-encoding plasmid. to obtain the serum of animals Blood was collected on days 0 (pre-immune serum), 14, 28, 42 and after 66 days.

ELISA/ Western Blot

Each 96–well ELISA medium binding plates were coated with the antigen at 200 ng/well at 4°C overnight. On the next day, plates were washed with PBS/Tween 0.05% (PBS/T) and blocked with 2% milk/PBS for 1 hr at room temperature. Plates were washed and incubated with antisera generated in mice immunized with pcDNA3-PfRH5-HBs and antibodies generated in mice immunized with pcDNA3A-HBs for plates coated with purified GMP-grade HBsAg (a gift from Butantan Institute, São Paulo, Brazil), antisera generated in mice immunized with pcDNA3-PvCS-HBs using the repeat region of the circumsporozoite gene of *P. vivax* (Salvador variant), animal sera immunized with pcDNA3-PvMSP1₁₉-HBs¹³ for coating with PvMSP1₁₉. Finally, antisera from mice immunized with the control plasmid pcDNA3-GFP were analyzed using plates coated with GFP (see Supplementary Figure 1 for a map of all plasmids used). Antisera were endpoint-diluted and incubated for 2 hours at room temperature. After four washing steps with PBS/T, an anti-murine-IgG coupled to horeseradish peroxydase (KPL) was applied for one hour at room temperature (1:2000). After repeated washings, all wells were developed with TMB substrate (Pierce), stopped after 5 min with 1 M HCl and the result of the colorimetric reaction was analyzed in a BioTek plate reader at 450nm/595nm.

For westerns blot, 5 µg HBsAg were electrophoresed under non-reducing conditions in SDS-polyacrylamide gels (10%). Afterwards, proteins in gels were transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond C, GE Healthcare) and these were blocked with 2% milk in PBS/T during 1 hr at room temperature. After two washing steps with PBS/T, primary antibodies (serum pool of plasmid-liposome immunized animals) were incubated for one hour at room temperature at a dilution of 1: 500 in 1% milk PBS/T. After five washes with PBS/T membranes were incubated with HRP-conjugated anti-mouse secondary antibody diluted 1: 2000 for one hour at room temperature. After 5 washes with PBS/T, the membranes were briefly soaked in ECL reagent (GE Healthcare) and chemiluminescence was documented on Hypermax X-ray films (Kodak) or photographed using a GE Image Quant 3000 apparatus.

Transfection efficiency test *in vitro*

To test the transfection efficiency of cationic liposomal nanoparticles loaded with DNA, a test plasmid expressing *Photinus* luciferase under the control of the immediate early CMV promoter was used (pcDNA3-luc). For this, CHO cells were grown to

semiconfluency and exposed to either 5 µg naked, non-complexed plasmid or 5 µg of pcDNA3-luc complexed to the transfection agent JetPei or 5 µg pcDNA3-Luc encapsulated in cationic liposomes. 48 h after transfection, cells were washed, lysed and the luciferase activity was measured using BioRad luciferase reagents. Relative light units were measured in a Berthold Lumat LB9 luminometer. The data were normalized for total protein against RLU. Experiments were conducted in triplicate.

Cell proliferation assay

Proliferation assays took place 60 days after the last immunization when spleens and inguinal lymph nodes of immunized mice were removed from animals which had been inoculated with either pcDNA3A-PfRH5-HBs or pcDNA3A-HBs. 5×10^5 cells were washed and cultured in RPMI medium supplemented with bicarbonate and 5% fetal calf serum and subsequently labeled with 100 ng of CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester). The cells were then challenged by exposure to liposome formulations that were used in the immunizations, this is, nanoparticles containing plasmids pcDNA3-PfRH5-HBs and pcDNA3-HBs. As a control we used a non-specific reporter plasmid (pcDNA3-Luc) in the same liposome construction. After three days luminescence levels in cells were analyzed by flow cytometry.

P. falciparum culture and invasion inhibition assays

The NF54 strain of *P. falciparum* was maintained in human B+ red blood cells (hematocrit 5%) in RPMI medium supplemented with 10% human B plasma or 0.5% Albumax 1 (Invitrogen). Cultures were kept in candle jars in an incubator at 37° C with daily medium exchange¹⁴. The parasitemy was monitored by thin blood smears stained with modified Giemsa stain (Panótico Quick kit) and microscopy. Cultures were synchronized by intermittent plasmagel flotation¹⁵ followed by sorbitol lysis¹⁶ and plated in 96 well plates at an initial parasitemy of 1%. Protein A-purified IgG fractions from immunized mice were added at different concentrations (0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml and 5 µg/ml) and volumes were matched with RPMI medium. Measurements were taken after 24 h and 48 h hours. In order to measure the parasitemy, aliquots were removed from wells and stained with ethidium bromide and analyzed by flow cytometry (Guava easycyte) as described before¹⁷.

Immunofluorescence

Live parasite immunofluorescence assays were conducted with trophozoite/schizont enriched *P. falciparum*. Detecting IgG were from mice that were immunized with DNA vaccine/cationic liposomes. For visualization, parasites were incubated with 40 µg/mL of 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in 100 µL RPMI/1% bovine serum albumin for 60 min at 37°C, followed by primary antibodies (dilution 1:250) and an Alexa Fluor 488 labelled anti-mouse-IgG or anti-rabbit antibody (Molecular Probes, 1:500 dilution).

Between each incubation step, the material was washed three times with RPMI pH 7.2. Immunofluorescence was visualized on a Zeiss Imager M2 fluorescence microscope.

Cryoelectron microscopy

Liposomes were prepared as described above and analyzed by cryoelectron microscopy as previously published¹⁸. For this, 3 μ l DNA loaded liposomes were spotted to a holey carbon-film grid (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Germany), previously pretreated with Gatan Solarus 950 plasma cleaner. Specimen-coated grids were plunge-frozen in liquid ethane using a Gatan Cryoplunge 3 (Gatan Inc, Pleasanton, CA, USA). Low dose imaging of the frozen, hydrated specimen kept in liquid nitrogen with a Gatan 626 single tilt cryoholder was performed on a JEM2100 electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan, operating at 200 kV). A Gatan Ultrascan 4000 CCD camera was used to record images (~40,000 $\times$ magnification).

Results

Cationic liposomes entrap plasmids and transfect *in vitro* at an efficiency similar to commercial transfection reagents

Different expression plasmids were cloned (Supplementary Figure 1) and grown out to maxipreparations¹⁹. The dynamics of plasmid association to liposomes is shown in Figure 1. After co-incubation with plasmid, a high percentage of plasmids associated to liposomes and were DNase1 protected. As expected, no signal was observed when unpackaged plasmids were digested in parallel with DNase1 (data not shown). Also, when DNA loaded, non-extracted liposomes were loaded directly on agarose gels, no staining could be observed, indicating that confined plasmids are completely protected from the external environment and that DNA-intercalating reagents do not pass the liposome coat used herein (not shown). The final size and appearance of DNA-loaded particles is shown in Figure 1. The sizes obtained by Cryo-Stem differed slightly from those obtained by light scattering measurement (Table 1). In order to estimate transfection efficiencies of DNA loaded particles in different cell lines, we first produced particles loaded with pcDNA3-luc and exposed the B16/H2 tumor cell line to formulations with the increasing lipid/plasmid coefficients. As shown in Figure 1, strong luciferase production was observed using either 1 nM lipids per μ g DNA or 8 nM lipids per μ g plasmid, while 2 and 4 nM/ μ g were less efficient formulations. This test was done in triplicates and repeated once. Next, we compared the transfection efficiency with a commercial transfection reagent (JetPEI) in two other frequently used cell lines. As shown in Figure 2, similar amounts of luciferase activity were observed in DNA-loaded nanoparticle transfected and conventionally transfected CHO K1 cells

(Figure 2). Importantly, no specific steps such as medium change, centrifugation, washing steps or other were applied during the liposome transfection procedure. These are often necessary using commercial kits or classical methods such as CaPO₄ or DEAE-Dextran transfection. In another experiment, we also transfected the human cell line HEK 293T with similar constructs using GFP instead of luciferase. After two days, almost sixty per cent of the cells presented green fluorescence in both loaded liposome or JetPEI-transfected HEK293T cells (Figure 2). This shows that DNA-loaded liposomes show transfection efficiencies comparable to commercial kits in a number of different eukaryotic cells.

Immunizations with DNA loaded cationic liposomes can induce antibodies against *Plasmodium vivax* CSP and MSP1₁₉

Since the herein used lipids are non-toxic, we asked if DNA-loaded liposomes could be used to induce a humoral response against a number of different antigens. For this we used coding regions of the vaccine candidates *P. vivax* CSP (repeat region) and PvMSP1₁₉. In order to enhance the immunogenicity of the corresponding proteins, gene fragments were cloned in frame with the gene for the small Hepatitis B virus antigen (HBsAg). Importantly, the PvCS-HBsAg fusion is reminiscent of the RTS/S construct, integral part of the only human Malaria vaccine allowed for use in humans²⁰.

As controls, vectors encoding HBsAg alone and GFP without secretion signal were used. The DNA vaccine plasmids were entrapped in cationic liposomes at 8 nM lipids/μg and administered intraperitoneally in a quantity of 10 μg (before encapsulation) per animal. After four doses, the animals were bled and the sera tested for antibodies against PvCS, PvMSP1₁₉ and HBsAg. Additionally, the content of antiHBs was tested in Western blots using vaccine quality recombinant HBsAg as target protein (Supplementary Figure 2). After ELISA assays, we observed significant titers against recombinant PvCSP and PvMSP1₁₉ with average values of 1:19.200 and 1:3.520, respectively. Lower titers were observed for GFP specific antibodies (1:450)(Figure 3).

Although antiHBsAg was detected in mice which only received the HBsAg encoding vector, only low titers could be measured against this antigen. Of note, low antiHBs titers are a frequent problem in HBV vaccinees²¹. On the other hand and in accordance to previous studies, these results show that the inclusion of HBsAg can greatly enhance the immune response against antigens that do not include T helper cell epitopes¹³ such as PvMSP1₁₉.

Cationic liposome-encapsulated plasmid DNA can produce antibodies against PfRH5 with minor recognition of HBsAg

In the next step, we asked if the fusion of one of the most promising malaria vaccine candidates to date, PfRH5, to HBsAg would also result in the production of antibodies

against the corresponding protein. Using a plasmid encoding PfRH5 fused with HBsAg, we first tested if the PfRH5-HBsAg construct administered as an encapsulated DNA vaccine produced antibodies which recognized native forms of PfRH5 in live parasites. As shown in Figure 4, immune sera prepared as before were able to recognize merozoites in immunofluorescence assays. Pooled sera of immunized mice were also able to recognize a bacterially produced fusion protein with GST and also PfRH5 in merozoite protein extracts. Again, very low antiHBs titers were observed in mice immunized with PfRH5-HBsAg encoding plasmids. The observed titers against GST-PfRH5 were in the order of 10^4 (Figure 4) and only 10^2 for antiHBs (not shown).

Antibodies against PfRH5 can block *Plasmodium falciparum* reinvasion *in vitro* in a dose depended manner

An important landmark in the quality of anti-malarial antibodies generated through vaccination is their inhibitory effect in growth- or reinvasion assays. For this, the IgG fractions of immune sera were purified and added in different concentrations to *P. falciparum in vitro* cultures. As shown in Figure 5, purified IgGs were able to inhibit parasite growth in a dose dependent manner. As expected, the sera showed a titer dependent relation with their blocking activity (Figure 6, $r=0.5$ at $180\mu\text{g/ml}$, $r=0.65$ at $300\mu\text{g/ml}$, $r=0.5$ at $600\mu\text{g/ml}$). This shows that the PfRH5-HBsAg encapsulated DNA vaccine formulation is efficient in inducing functional antibodies with an affinity sufficiently high to act in the PfRH5-Basigin interaction and interfere with red blood cell invasion.

Encapsulated DNA immunization induces a specific cellular response

The delivery of DNA vaccines into cells causes the production of proteins and subsequent presentation in MHC1 complexes which then stimulate T cell responses. In order to test if this was the case in the herein used application of DNA delivered in liposomes, Balb/c mice were immunized with three doses of pcDNA3-PfRH5-HBs and had their lymphocytes removed from either inguinal lymph nodes or the spleen. Then, these lymphocytes were stimulated with liposomes packaged with either pcDNA3-Luciferase, pcDNA3-PfRH5-HBs or pcDNA3-HBs. Afterwards, cell proliferation was monitored by CFSE assays. As a result, baseline signals were observed when lymphocytes were stimulated with pcDNA3-Luciferase which leads to the production of the unrelated Luciferase protein (Figure 6). In contrast, significant stimulation was observed when inguinal lymphocytes were stimulated with pcDNA3-HBs-PfRH5. A proliferative response was also seen in splenocytes, however, the difference in proliferation between pcDNA3-luc and pcDNA3-HBs or pcDNA3-PfRH5-HBs was not statistically significant. This shows that the immunization with plasmid DNA entrapped in liposomes is able to create a cellular immune response, probably including reactive T-cells, T and B-memory cells and others. The inclusion of a murine γ -Interferon expressing vector may have enhanced this response. The fact that significant responses were only observed in inguinal lymphnodes points to the hypothesis that

PfRH5-expressing lymphocytes are drained preferentially to these and that the immune response is initiated there.

Discussion

Recently, the European health agency endorsed the use of the first malaria vaccine RTS/S²⁰. Although the vaccine helps to save lives and decreases significantly the incidence of childhood malaria and the number of severe malaria episodes in vaccinees²², it still does not achieve protection rates observed for common antiviral vaccines such as Influenza or HBV vaccines. Other malaria vaccine approaches to date were less successful and still did not provide sufficient protection (for a review, see ²³). On the other hand, recently discovered structures such as PfRH5⁴ or the proteins RIPR e CYRPA with which it forms a complex²⁴ are very promising but difficult to produce in recombinant form. While approaches exist that use native antigens as effective immunogens²⁵, these are difficult to be scaled up for a broader use. For this reason, we envisioned that the immunization of promising, hard-to-produce vaccine targets may be viable when administered as a DNA vaccine. However, the delivery as a DNA vaccine still poses the problem of low efficiency. This disadvantage can be overcome when using DNA encapsulated in fusogenic liposomes of nanometric size using microneedle devices in the example of an HBV²⁶ or HIV²⁷ immunization and/or proper formulation of encapsulating lipids²⁸.

Herein, we formulated cationic liposomes made from three biocompatible lipids and encapsulated plasmid vectors expressing three well-studied malaria vaccine targets as well as reporter genes eGFP and luciferase. When measuring the transfection efficiency of plasmid-loaded liposomes in *in vitro* experiments, we observed the successful transfection of more than 50% of the Plasmid-liposome exposed cells, similar to the efficiency of a commercial reagent tested in parallel. This value is much higher than the transfection rate achieved using another system of DNA-loaded liposomes made from archae-membrane lipids (archaeosomes²⁹). Given the biocompatibility of the herein used lipids, we asked if the plasmid-loaded liposomes would also induce the production of proteins in whole organisms such as Balb/c mice.

Considering that a high surface density of proteins is able to enhance their immunogenicity, we genetically fused a number of antigens to the small hepatitis B virus envelope antigen which itself forms the so-called 20 nm particles. The improved immunogenicity of antigens displayed on 20 nm particles was shown for a couple of examples (e.g. the RTS,S vaccine, *P. vivax* MSP1₁₉¹³, and poliovirus envelope proteins³⁰). When directly comparing the obtained antibody titers against PvMSP1₁₉, we did not observe significantly higher titers using the liposomal approach compared to a study using the same construct as a naked, intramuscularly delivered DNA vaccine.

However, the doses used for immunization herein were much smaller and the uniformity in individual antibody titers in mice was much improved³¹. Liposomal DNA vaccination involving HBsAg is supposed to stimulate antigen presentation by primary dendritic cells in both MHC1 and MHC2 receptors³². Although not tested for, it is therefore expected that antigen-specific T and B cells including memory cells are developed and that immune response can be boosted upon contact with the native antigens during infection.

The application of naked DNA vaccines commonly targets skin-resident antigen-presenting cells such as keratinocytes, Langerhans cells and others³³ which explains why the success of this type of vaccine during manual needle-mediated application is sometimes variable. Herein, the intraperitoneal route of immunization was used - which is easy to apply but inefficient when using naked DNA. In support of the hypothesis that injected DNA-loaded liposomes are readily taken up by peritoneal cells, we detected most antigen-reactive lymphocytes in inguinal lymphnodes. In order to avoid unspecific retention and to produce a stronger transfection effect, we did not apply any other adjuvant to the particles, since this seems deleterious when using DNA vaccines³⁴. In one case, we tried to enhance the immune response by co-encapsulating liposomes with a γ -Interferon encoding plasmid. In a related model, this co-administration increased the response against Woodchuck hepatitis B virus core protein delivered as a naked DNA vaccine³⁵.

For the use in vaccine applications, the route of delivery of DNA-loaded liposomes has to be modified. A minimally invasive way of delivery would be via skin patches such as shown for the application of ceramic microneedles³⁶ or via the intranasal route³⁷. Specifically, the intranasal delivery of *Mycobacterium tuberculosis* hsp86 encoding DNA seemed to induce a systemic Th1 type response, which would be desirable in the case of *Plasmodium* sporozoite infection where the effective reduction of infected liver cells would limit the development of blood stage malaria (for a review see ³⁸). Although mucosal immunization is more likely to induce an IgA type of response, a systemic response including CD8+ and CD4+ cells can also be developed (reviewed in ³⁹).

To prove the efficiency of the immunization, we tested if antibodies generated against a very promising vaccine candidate - PfRH5 - were able to reduce reinfection of erythrocytes in *in vitro* growth assays. It was expected that the antibodies which were able to recognize native PfRH5 in Western blots would also exert a reinvasion-blocking activity. As shown above, this was the case and the values for the inhibitory activity were comparable to what was achieved after recombinant Adenovirus-based approaches⁴ or proteoliposome mediated immunization²⁵. Importantly, Adenovirus and plasmid DNA-loaded liposome approaches function on the basis of the fact that the vaccine antigen is ultimately synthesized by the vaccinee's cells.

Taken together, we presented an approach where cationic liposomes were successfully loaded with plasmid DNA and showed that the injection led to a significant and multileveled (antibody and cell mediated) response. Ideally, different plasmids can be deliberately mixed and encapsulated underlining the versatility of this approach. Using simultaneously proteic ligands on the surface of the DNA loaded liposomes, it still may be possible to further influence/enhance the overall effect by directing liposomes to specific cells.

Acknowledgments

We thank Alexander Douglas and Simon Draper for the gift of the codon-optimized PfRH5 gene. We are grateful to the Irvine lab at MIT for help with the electron microscopy, technical support and discussions. RMS received an undergraduate fellowship from CNPq. WLF and GW are funded by FAPESP (2012/18617-1 and 2015/17174-7).

Literature

1. Naldini, L (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature* **526**: 351–60.
2. Saade, F and Petrovsky, N (2012). Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **11**: 189–209.
3. Gopal, GJ and Kumar, A (2013). Strategies for the Production of Recombinant Protein in Escherichia coli. *Protein J.* **32**: 419–425.
4. Douglas, AD, Williams, AR, Illingworth, JJ, Kamuyu, G, Biswas, S, Goodman, AL, *et al.* (2011). The blood-stage malaria antigen PfRH5 is susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody. *Nat. Commun.* **2**: 601.
5. Mingozzi, F and High, KA (2013). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* **122**: 23–36.
6. Dale, CJ, Thomson, S, De Rose, R, Ranasinghe, C, Medveczky, CJ, Pamungkas, J, *et al.* (2006). Prime-boost strategies in DNA vaccines. *Methods Mol. Med.* **127**: 171–97.
7. Villarreal, DO, Talbott, KT, Choo, DK, Shedlock, DJ and Weiner, DB (2013). Synthetic DNA vaccine strategies against persistent viral infections. *Expert Rev. Vaccines* **12**: 537–54.
8. Hung, C-F, Tsai, Y-C, He, L and Wu, T-C (2007). DNA vaccines encoding Ii-PADRE generates potent PADRE-specific CD4⁺ T-cell immune responses and enhances vaccine potency. *Mol. Ther.* **15**: 1211–9.
9. Grgacic, EVL and Anderson, DA (2006). Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* **40**: 60–5.

- 405 10. Stoute, JA, Slaoui, M, Heppner, DG, Momin, P, Kester, KE, Desmons, P, *et al.*
406 (1997). A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein
407 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine
408 Evaluation Group. *N. Engl. J. Med.* **336**: 86–91.
- 409 11. Farris, E, Brown, DM, Ramer-Tait, AE and Pannier, AK (2016). Micro- and
410 nanoparticulates for DNA vaccine delivery. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **241**:
411 919–29.
- 412 12. Wunderlich, G, Moura, IC and del Portillo, HA (2000). Genetic immunization of
413 BALB/c mice with a plasmid bearing the gene coding for a hybrid merozoite
414 surface protein 1-hepatitis B virus surface protein fusion protects mice against
415 lethal *Plasmodium chabaudi chabaudi* PC1 infection. *Infect. Immun.* **68**: 5839–
416 45.
- 417 13. De Oliveira, CI, Wunderlich, G, Levitus, G, Soares, IS, Rodrigues, MM, Tsuji, M, *et*
418 *al.* (1999). Antigenic properties of the merozoite surface protein 1 gene of
419 *Plasmodium vivax*. *Vaccine* **17**: 2959–2968.
- 420 14. Trager, W and Jensen, JB (1976). Human malaria parasites in continuous culture.
421 *Science (80-.)*. **193**: 673–675.
- 422 15. Lelievre, J, Berry, A and Benoit-Vical, F (2005). An alternative method for
423 *Plasmodium* culture synchronization. *Exp Parasitol* **109**: 195–197.
- 424 16. Lambros, C and Vanderberg, JP (1979). Synchronization of *Plasmodium*
425 *falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* **65**: 418–420.
- 426 17. Wilson, DW, Crabb, BS and Beeson, JG (2010). Development of fluorescent
427 *Plasmodium falciparum* for in vitro growth inhibition assays. *Malar. J.* **9**: 152.
- 428 18. Moon, JJ, Suh, H, Li, A V, Ockenhouse, CF, Yadava, A and Irvine, DJ (2012).
429 Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines
430 that expand Tfh cells and promote germinal center induction. *Proc. Natl. Acad.*
431 *Sci. U. S. A.* **109**: 1080–5.
- 432 19. Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T (1989). *Molecular Cloning A Laboratory*
433 *Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 434 20. Kaslow, DC and Biernaux, S (2015). RTS,S: Toward a first landmark on the
435 Malaria Vaccine Technology Roadmap.
436 *Vaccinedoi:10.1016/j.vaccine.2015.09.061*.
- 437 21. Tajiri, K and Shimizu, Y (2015). Unsolved problems and future perspectives of
438 hepatitis B virus vaccination. *World J. Gastroenterol.* **21**: 7074–83.
- 439 22. Agnandji, ST, Lell, B, Soulanoudjingar, SS, Fernandes, JF, Abossolo, BP,
440 Conzelmann, C, *et al.* (2011). First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria
441 vaccine in African children. *N. Engl. J. Med.* **365**: 1863–75.
- 442 23. Birkett, AJ (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for
443 malaria. *Vaccine* **34**: 2915–20.
- 444 24. Reddy, KS, Amlabu, E, Pandey, AK, Mitra, P, Chauhan, VS and Gaur, D (2015).
445 Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr
446 is crucial for *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
447 **112**: 201415466.

- 448 25. Fotoran, WL, Santangelo, RM, Medeiros, MM, Colhone, M, Ciancaglini, P,
449 Barboza, R, *et al.* (2015). Liposomes loaded with *P. falciparum* merozoite-
450 derived proteins are highly immunogenic and produce invasion-inhibiting and
451 anti-toxin antibodies. *J. Control. Released* doi:10.1016/j.jconrel.2015.08.045.
- 452 26. Qiu, Y, Guo, L, Zhang, S, Xu, B, Gao, Y, Hu, Y, *et al.* (2015). DNA-based
453 vaccination against hepatitis B virus using dissolving microneedle arrays
454 adjuvanted by cationic liposomes and CpG ODN. *Drug Deliv.*: 1–
455 8doi:10.3109/10717544.2014.992497.
- 456 27. DeMuth, PC, Min, Y, Huang, B, Kramer, JA, Miller, AD, Barouch, DH, *et al.* (2013).
457 Polymer multilayer tattooing for enhanced DNA vaccination. *Nat. Mater.* **12**:
458 367–376.
- 459 28. Du, Z, Munye, MM, Tagalakakis, AD, Manunta, MDI and Hart, SL (2014). The role of
460 the helper lipid on the DNA transfection efficiency of lipopolyplex formulations.
461 *Sci. Rep.* **4**: 7107.
- 462 29. Zavec, AB, Ota, A, Zupancic, T, Komel, R, Ulrih, NP and Liovic, M (2014).
463 Archaeosomes can efficiently deliver different types of cargo into epithelial cells
464 grown in vitro. *J. Biotechnol.* **192**: 130–135.
- 465 30. Delpeyroux, F, Peillon, N, Blondel, B, Crainic, R and Streeck, RE (1988).
466 Presentation and immunogenicity of the hepatitis B surface antigen and a
467 poliovirus neutralization antigen on mixed empty envelope particles. *J. Virol.* **62**:
468 1836–9.
- 469 31. Wunderlich, G and del Portillo, HA (2000). Biochemical and immunological
470 properties of a viral hybrid particle expressing the *Plasmodium vivax* merozoite
471 surface protein 1 C-terminal region. *Mol. Med.* **6**: 238–245.
- 472 32. Moffat, JM, Cheong, W-S, Villadangos, JA, Mintern, JD and Netter, HJ (2013).
473 Hepatitis B virus-like particles access major histocompatibility class I and II
474 antigen presentation pathways in primary dendritic cells. *Vaccine* **31**: 2310–6.
- 475 33. Ita, K (2016). Transdermal delivery of vaccines – Recent progress and critical
476 issues. *Biomed. Pharmacother.* **83**: 1080–1088.
- 477 34. Rose, AH, Hoffmann, FW, Hara, JH, Urschitz, J, Moisyadi, S, Hoffmann, PR, *et al.*
478 (2015). Adjuvants may reduce in vivo transfection levels for DNA vaccination in
479 mice leading to reduced antigen-specific CD8+ T cell responses. *Hum. Vaccin.*
480 *Immunother.* **11**: 2305–2311.
- 481 35. Siegel, F, Lu, M and Roggendorf, M (2001). Coadministration of Gamma
482 Interferon with DNA Vaccine Expressing Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) Core
483 Antigen Enhances the Specific Immune Response and Protects against WHV
484 Infection. *J. Virol.* **75**: 5036–5042.
- 485 36. DeMuth, PC, Li, A V, Abbink, P, Liu, J, Li, H, Stanley, KA, *et al.* (2013). Vaccine
486 delivery with microneedle skin patches in nonhuman primates. *Nat. Biotechnol.*
487 **31**: 1082–1085.
- 488 37. Rosada, RS, Torre, L, Frantz, FG, Trombone, AP, Zárate-Bladés, CR, Fonseca, DM,
489 *et al.* (2008). Protection against tuberculosis by a single intranasal
490 administration of DNA-hsp65 vaccine complexed with cationic liposomes. *BMC*

Immunol. **9**: 38.

38. Hill, A V (2011). Vaccines against malaria. *Philos Trans R Soc L. B Biol Sci* **366**: 2806–2814.

39. Tiwari, S, Agrawal, GP and Vyas, SP (2010). Molecular basis of the mucosal immune system: from fundamental concepts to advances in liposome-based vaccines. *Nanomedicine* **5**: 1617–1640.

Table and Legends to Figures

Table 1

Sizes, polydispersity indices and ζ -potential of liposomes before and after encapsulation of DNA.

Liposome Formulation	Size (nm)	Polydispersity Index	ζ -Potential (mV)
Liposome alone	77 $\pm$ 18.80	0.30 $\pm$ 0.0	-
Liposome +DNA	330 $\pm$ 80	0.80 $\pm$ 0.5	15 $\pm$ 4,6

Legends to Figures

Figure 1: Effective encapsulation of plasmids into liposomes. **A:** Cryoelectron microscopic picture of liposomes after the plasmid loading step. In **B**, results for the titration of encapsulating lipids versus DNA are shown. Murine melanoma cells (B16-F10) were transfected with different lipid/pcDNA3-luc formulations (experiments in duplicates, three independent experiments) and relative light units were measured two days after exposure of lipid/DNA complexes to cells. In **C**, overnight DNase1 digests were conducted to elucidate the packaging efficiency in dependence of lipid/DNA ratios of the formulations tested in **B**. The experiment was conducted using lipid/DNA formulations starting with initially 25 μ g DNA packaged in the given lipid amounts, divided in three tubes and digested with DNase1. Afterwards, lipid/DNA formulations were chloroform-extracted as described and the aqueous fraction was loaded on 1% EtBr-stained agarose gels. Below the gel, the relative density values of three gels measured by densitometry against the control lane which contained 1 μ g pcDNA3-Luc DNA (100% equals approximately 8.3 μ g) are shown. Note that formulation with 8 nM lipids per μ g DNA resulted in almost complete DNase protection of packaged DNA.

Figure 2: High efficiency of transfection using plasmid-loaded liposomes compared to a commercial kit. In **A**, 5*10⁵ HEK293T cells were seeded in 6well plates and transfected 24 h later with pcDNA3-GFP using either JetPei reagent or DNA loaded

liposomes. Green fluorescence was observed 48 h after transfection, using cytometry. Mock-transfected cells did not show any GFP fluorescence (data not shown). In **B**, the plasmid pcDNA3-luc was transfected in a similar way in CHO-K1 cells, using additionally cells transfected with uncomplexed (naked) DNA. 48 h after transfection, the relative light units were measured and normalized to the quantity of protein used in the luciferase assay. Mock-transfected cells did not produce any discernible luciferase activity under these conditions (data not shown).

Figure 3: Liposome mediated DNA immunization results in antibodies against the fused protein but less against HBsAg. In **A**, endpoint titers of antiGFP, antiPvCS and antiPvMSP1₁₉ were measured. Individual sera of 4 (GFP) or 5 immunized mice were tested in endpoint dilutions and the dilution factor where the sera still showed positive signals above background are shown. For ELISA plate coating, recombinant GST-GFP, -CS, and -PvMSP1₁₉ were used. In **B**, endpoint dilution titers against recombinant HBsAg are shown. Significantly different values (Student's T test) are indicated by "*" ($p = 0.019$ in all comparisons). N.S. means not significant.

Figure 4: Sera from pcDNA3-PfRH5-HBsAg immunized mice recognize native PfRH5 in *P. falciparum* NF54 schizont extracts (lane 1) and also recombinant recombinant GST-PfRH5 (lane 2, **A).** In **B**, the endpoint dilution ELISA showed antibody titers against GST-PfRH5 comparable to those obtained against PvCS and PvMSP1₁₉. No significant titers against PfRH5 were found in pre-immune sera (data not shown). In **C**, immunofluorescence microscopy shows that pooled immune sera (1:20) also recognize PfRH5 in native late stage schizonts.

Figure 5: *P. falciparum* blood stage invasion blocking activity of purified IgGs from pcDNA3-PfRH5-HBs liposome-encapsulated immunized mice. In **A**, the percentage of growth inhibition of parasite proliferation (measured by flow cytometry) is shown for three dilutions of purified IgG. The shown values were calculated comparing to parasitemias in parallel cultures supplemented with 600 µg/ml non-related IgG (= 0% growth inhibition). In **B**, the dose-dependency is demonstrated by plotting the content of antiPfRH5-specific titers against the growth inhibitory/blocking effect of IgG. Correlation coefficients were $r=0.5$ at 180 µg/ml, $r=0.65$ at 300 µg/ml, $r=0.5$ at 600 µg/ml.

Figure 6: Inguinal lymphocytes from DNA-loaded liposome-immunized Balb/c mice are stimulated by specific antigens. Lymphocytes from spleen or inguinal lymphnodes were removed from immunized mice and exposed to different stimuli *in vitro*. Proliferation assays took place 60 days after the last immunization with either liposome-packaged pcDNA3A-PfRH5-HBs or pcDNA3A-HBs. 5×10^5 cells were labeled with 100 ng of CFSE. Cells were then challenged by exposure to DNA-liposome formulations (1 µg/ml of DNA per 5×10^5 cells) that were used in the immunizations

(plasmids pcDNA3-PfRH5-HBs and pcDNA3-HBs). As a control, a non-specific reporter plasmid (pcDNA3-Luc) was used. After three days, luminescence levels in cells were analyzed by flow cytometry. In **A**, the CFSE decay from lymphocytes stained with CFSE and stimulated with Concanavalin A (blue), pcDNA3-PfRH5-HBs from lymph nodes (red) and pcDNA3-HBs from spleen is shown. In **B**, the proliferation rate from inguinal lymph node cells stimulated with pcDNA3-PfRH5-Hbs and the respective control made with a plasmid encoding the non related protein luciferase is shown. Statistic analysis were performed using a paired T-test with n=4 animals. In **C**, the proliferation rate from spleen cells stimulated with pcDNA3-PfRh5-HBs and pcDNA3-HBs and the respective control with pcDNA3-luc loaded liposomes is shown. Statistic tests were done as in **B** (n=4 animals).