Wesley Luzetti Fotoran

Avaliação do potencial vacinal de nanopartículas carregadas com componentes de merozoítas e esquizontes no modelo murino da infecção com ***Plasmodium***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

Wesley Luzetti Fotoran

Avaliação do potencial vacinal de nanopartículas carregadas com componentes de merozoítas e esquizontes no modelo murino da infecção com ***Plasmodium***

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Gerhard Wunderlich

Versão original

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Fotoran, Wesley Luzetti.

Avaliação do potencial vacinal de nanopartículas carregadas com componentes de merozoítas e esquizontes no modelo murino da infecção com *Plasmodium* / Wesley Luzetti Fotoran. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Gerhard Wunderlich.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Variação antigênica e citoaderência em *Plasmodium falciparum*.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the vaccine potential of nanoparticles loaded with components of merozoites and schizonts in the murine model of infection with *Plasmodium*.

1. *Plasmodium* 2. Nps 3. Proteolipossomos 4. GPI 5. Interleucinas 6. Vacinas I. Wunderlich, Prof. Dr. Gerhard II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0190/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Wesley Luzetti Fotoran.

Título da Dissertação: Avaliação do potencial vacinal de nanopartículas carregadas com componentes de merozoítas e esquizontes no modelo murino da infecção com *Plasmodium*.

Orientador(a): Prof. Dr. Gerhard Wunderlich.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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 **111** nas fls. **92** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Gerhard Wunderlich, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Avaliação do potencial vacinal de nanopartículas carregadas com componentes de merozoítas e esquizontes no modelo murino da infecção com plasmodium berghei** do qual participam o(s) alunos **Wesley Luzetti Fotoran**, 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 **06.10.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 07 de outubro de 2010.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que fizeram parte de tudo isso. Em especial minha família que me apoiou sempre que precisei e meu orientador Gerhard Wunderlich.

Creio ter que agradecer uma amizade que me deu forças em todos os momentos, a Alessandra meus mais sinceros sentimentos de amor/izade.

A todas as outras pessoas que buscarem seus nomes nesta página, eu tenho um recado: Se você leu isso e buscou seu nome, ele deveria estar aqui, mas não acredito que faria justiça se escolhesse nomes e os colocasse aqui, eventualmente eu esqueceria pessoas cruciais nessa fase da minha vida, por isso decido agradecer a qualquer um que acredite merecer seu nome nesta página, faço do anonimato de meus agradecimentos um agradecimento a todos que merecem, muito obrigado a você, que você esteja sempre a meu lado e se eu eventualmente não gostar de você, obrigado por tudo que tivemos em comum.

Grato, muito grato e sempre grato a você que merece ser citado aqui, obrigado caro leitor.

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

"Nada em biologia faz sentido senão sob a luz da evolução"
 Theodosius Dobzhansky (1900-1975)

RESUMO

Fotoran WL. Avaliação do potencial vacinal de nanopartículas carregadas com componentes de merozoítas e esquizontes no modelo murino da infecção com *Plasmodium*. [dissertação (Mestrado de Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium* que causa um milhão de mortes anualmente. Quase 3 bilhões de pessoas vivem em áreas tropicais de risco de infecção com uma das 5 espécies evidenciando um problema mundial carente de solução imediata. Esse parasita apresenta um potencial para o rápido desenvolvimento de resistências contra os fármacos utilizados em seu tratamento, por isso uma das soluções preconizadas pela Organização Mundial de Saúde é o desenvolvimento de vacinas eficazes para seu controle. O objetivo desse trabalho foca-se no aperfeiçoamento de uma metodologia mais efetiva para a formulação de vacinas contra malária. Inicialmente no modelo roedor, foi utilizado o método de carregamento em nanopartículas lipossomais, com proteínas oriundas de merozoítos do gênero *Plasmodium*. Além da avaliação do potencial vacinal das nanopartículas (sobrevivência/morbidade), avaliamos o efeito da vacina contra toxinas (por exemplo, domínios GPI). Concluímos de maneira concisa que proteolipossomos gerados com proteínas GPI ancoradas do gênero *Plasmodium* possuem efeitos notáveis em relação a controle de crescimento parasitológico, mostrando-se efetivo também em desafios de letalidade *in vivo*. No que diz respeito a aspectos que afetam humanos, os soros gerados contra proteínas do parasita são capazes de diminuir interleucinas relacionadas com sintomas graves e parecem ter grandes efeitos antiparasitários que se correlacionam diretamente com o perfil genético do hospedeiro imunizado em ensaios *in vitro*.

Palavras-chave: *Plasmodium*. Nps. Proteolipossomos. GPI. Interleucinas. Th1. Th2. Vacinas.

ABSTRACT

Fotoran WL. Evaluation of the vaccine potential of nanoparticles loaded with components of merozoites and schizonts in the murine model of infection with *Plasmodium*. [master thesis (Parasitology)] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Malaria is a tropical disease caused by species of the protozoan *Plasmodium* and around one million people die of the disease each year, while 3 billion individuals live at risk to acquire infection with one of the five species known to infect humans. Due to the parasite's looming resistance against most of the antimalarial compounds used in therapy, the WHO preconizes the development of effective vaccine as an important goal. The purpose of this work was to evaluate the potential of a new method of vaccine formulation against malaria. Initially tested in the rodent model, we loaded liposomal nanostructures with merozoite-derived GPI-anchored proteins. We then monitored parameters such as survival and morbidity after challenge and measured the effect against parasite derived toxins. We observed significant effects in terms of control of parasitemy and in one model complete survival of mice. We also detected the generation of antiGPI antibodies which showed to be functional in decreasing TNF- α production in an *in vitro* model, however, we detected that this function was dependent on the genetic background of the antibody producing immunized animal.

Keywords: *Plasmodium*. Nps. Proteoliposomes. GPI. Interleukines. Th1. Th2. Vaccines.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tamanho de lipossomos antes e após incubação com proteínas GPI.	48
Tabela 2- Recuperação de tamanho e polidispersidade após liofilização de proteolipossomos.....	90

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Mapa de risco de infecção por <i>P.falciparum</i> .	17
Figura 2- Merozoito do gênero Plasmodium.	19
Figura 3- Ciclo de vida de Plasmodium em humanos.	20
Figura 4- Efeitos de citoadesão e perpetuação de inflamação em malária.	24
Figura 5- Processamento da proteína MSP1.	28
Figura 6- Desenho experimental da geração de Proteolipossomos.	30
Figura 7- Proteínas recombinantes de <i>P.berghei</i> e <i>P.yoelii</i> .	38
Figura 8- Purificação de merozoitos.	45
Figura 9- Imunofluorescência da fração de merozoitos de <i>P. yoelii</i> .	46
Figura 10- Imunofluorescência de merozoitos fracionados de <i>P.falciparum</i> .	47
Figura 11- Aumento no tamanho dos lipossomos após incorporação de proteínas GPI ancoradas.	48
Figura 12- Ensaio de retenção de antígenos na produção de proteolipossomos da cepa 3D7.	49
Figura 13- Western Blot evidenciando a presença da proteína PfMSP119 em proteolipossomos.	50
Figura 14- Gel de retenção de antígenos referente ao parasita <i>P. berghei</i> NK65.	51
Figura 15- Ensaio de retenção de antígenos em proteolipossomos referente ao parasita <i>P. yoelii</i> .	52
Figura 16- Cinética de aquisição de anticorpos por imunização de proteolipossomos.	54
Figura 17- Titulação de anticorpos contra proteolipossomos feitos a partir de merozoitos de <i>P.falciparum</i> 3D7.	55
Figura 18- Titulação contra PfMSP2.	56
Figura 19- Título de anticorpos contra extrato de merozoitos e MSP1 ₁₉ de <i>P. yoelii</i> .	57
Figura 20- Titulação de soro de animais imunizados com proteolipossomos de <i>P. berghei</i> pré-desafio e pós-desafio contra MSP1 ₁₉ de <i>P. berghei</i> .	58
Figura 21- Titulação de soro de animais imunizados com proteolipossomos de <i>P. berghei</i> pré-desafio e pós-desafio contra extratos de merozoito.	59
Figura 22- Imunofluorescência de soro imune com proteolipossomo de <i>P.falciparum</i> , cepa 3D7.	60
Figura 23- Imunofluorescência de soro imune com Proteolipossomo de <i>P. berghei</i> , cepa NK65.	61
Figura 24- Reconhecimento de proteínas no processamento na maturação de formas maduras de formas sanguíneas.	62
Figura 25- Western Blot contra merozoitos de 3D7.	63
Figura 26- Western Blot contra merozoitos de <i>P. yoelii</i> XL.	64
Figura 27- Western Blot contra merozoitos de <i>P. berghei</i> NK65.	65
Figura 28- Citometria de células RAW.	67

Figura 29- Ensaio de liberação de TNF- α em dose/resposta por estímulos de esquizontes sonicados.	67
Figura 30- Estimulo de células RAW por Extratos de Esquizontes de <i>P.falciparum</i>	68
Figura 31- Efeito protetor dos anticorpos pré-imunização e pós-estimulação.	68
Figura 32- Porcentagem de células RAW ativadas sob diferentes tratamentos e média de fluorescência.	69
Figura 33- Redução em da produção de TNF- α por ação de anticorpos.....	69
Figura 34- Ensaio de valor inibitório na liberação de TNF- α por ação de anticorpos.....	70
Figura 35- Inibição de reinvasão dos soros pós-imune contra <i>P.falciparum</i>	71
Figura 36- Sorotipagem das subclasses de IgG presentes em animais Balb/C.	73
Figura 37- Sorotipagem das subclasses de IgG presentes em animais C57BL/6.	73
Figura 38- Curvas de parasitemia desenvolvidas pelo fundo C57BL/6.	74
Figura 39- Curvas de parasitemia desenvolvidas pelo fundo Balb/C.	75
Figura 40- Sobrevida de camundongos Balb/C após desafio com <i>P. berghei</i> NK65.	77
Figura 41- Curvas de parasitemia nos desafios com <i>P. yoelii</i>	79
Figura 42- Sobrevida de animais vacinados com proteolipossomos de <i>P. yoelii</i>	80
Figura 43- Sorotipagem das subclasses de IgG presentes em animais Balb/C imunizados com proteolipossomos de <i>P. yoelii</i>	81
Figura 44- Sorotipagem das subclasses de IgG presentes em animais Balb/C imunizados com proteolipossomos de <i>P. berghei</i>	82
Figura 45- Sorotipagem das subclasses de IgG presentes em animais C57BL/6.	83
Figura 46- Crescimento das IgGs preponderantes no decorrer da infecção em animais imunizados por proteolipossomos de <i>P. berghei</i>	84
Figura 47- CBA dos soros pré e 15 dias após infecção.....	86
Figura 48- Detalhe das tendências de IL-2,TNF- α , IL-4 e IFN- γ	88
Figura 49- Tnf- α no grupo controle.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CSA	<i>CHONDROITIN SULFATE A</i>
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO
EDTA	ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO
FACS	<i>FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTED</i>
FCS	SORO FETAL BOVINO (<i>FETAL CALF SERUM</i>)
g	ACELERAÇÃO DA GRAVIDADE ($9,8 \text{ m/s}^2$)
gDNA	DNA GENÔMICO
ICAM1	<i>INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE 1</i>
IgG	IMUNOGLOBULINA
IL	INTERLEUCINAS
OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE
PBS	<i>PHOSPHATE-BUFFERED SALINE</i>
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>)
PfEMP1	<i>PLASMODIUM FALCIPARUM ERYTHROCYTE MEMBRANE PROTEIN 1</i>
RNA	ÁCIDO RIBONUCLEÍCO
RPMI	<i>ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE</i> (MEIO DE CULTIVO)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
IFN-γ	Interferon- γ
NKT	Natural Killer T cell
Th	Célula T Helper
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
Col	Cholesterol
LipA	Lípido A
RAW	Macrófagos murinos RAW 264.7
CBA	Cytometric Beads Array

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Distribuição geográfica, ciclo de vida e relações evolutivas.....	17
1.2	Sintomatologia da doença e vacinas antimaláricas	20
1.3	Imunopatologia associada à malária.	21
1.4	Bioengenharia de compostos nanoestruturados, uma nova promessa na vacinologia	27
1.5	Nanoestruturas com proteínas GPI ancoradas	29
2	OBJETIVO GERAL.....	31
2.1	Objetivos específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Animais	34
3.2	Parasitas e doses infectivas usadas.....	34
3.3	Cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i>	34
3.4	Crescimento <i>in vivo</i> das cepas <i>P.berghei</i> NK65 e <i>P. yoelii</i> para obtenção de massa antigênica.	35
3.5	Obtenção de merozoítos de <i>Plasmodium falciparum</i>	36
3.6	Extração de proteínas GPI ancoradas	36
3.7	Remoção de Triton X-114 das amostras	36
3.8	Quantificação de proteínas.....	37
3.9	Geração de lipossomos	37
3.10	Geração de proteolipossomos de proteínas GPI de merozoítas de <i>Plasmodium</i>	37
3.11	Geração de proteínas recombinantes de <i>P.yoelii</i> e <i>P.berghei</i>	38
3.12	Imunizações com proteolipossomos vacinais, Alum e lipídeo A.....	39
3.13	Coleta de sangue e obtenção de amostras sanguíneas para monitoramento da parasitemia	39
3.14	Western Blot, Immunoblot e coloração por prata.....	40
3.15	Imunofluorescência.....	40
3.16	Elisa	41
3.17	Dosagem de interleucinas séricas.....	42
3.18	Ensaio de liberação de TNF- α por células RAW.....	42

3.19 Ensaio de liberação de TNF- α frente anticorpos provenientes de animais imunizados com proteolipossomos de <i>P.falciparum</i>	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Purificação de Merozoitos.	45
4.2 Geração de lipossomos feitos de DPPC-Colesterol.....	47
4.3 Carregamento de antígenos GPI ancorados em proteolipossomos vacinais.....	48
4.4 Titulação de soros de animais imunizados com proteolipossomos com proteínas de <i>P. berghei</i> , <i>P. yoelii</i> e <i>P.falciparum</i>	52
4.5 Padrão de reconhecimento dos soros imunes contra proteínas nativas em merozoitos.....	59
4.6 Anticorpos gerados por imunização com proteolipossomos reconhecem proteínas de parasitas por imunoblot	62
4.7 Propriedades dos anticorpos analisados	65
4.8 Capacidade inibitória de reinvasão <i>in vitro</i> de anticorpos obtidos por imunizações com proteolipossomos	70
4.9 Sorotipagem de anticorpos contra MSP119 de <i>P.falciparum</i>	71
4.10Desafios <i>in vivo</i> para validação do sistema em modelos de infecção <i>in vivo</i> com o parasita <i>P. berghei</i> NK65.....	74
4.11 Desafios <i>in vivo</i> para validação do sistema em modelos de infecção <i>in vivo</i> com o parasita <i>P. yoelii</i> XL.....	78
4.12 Sorotipagem dos anticorpos produzidos por cada método de imunização em modelo de infecção murino	80
4.13 CBA do soro de Animais após 15 dias de infecção sob diferentes tratamentos.	85
4.14 Estabilidade de proteolipossomos após liofilização.	89
5 DISCUSSÃO	91
6 CONCLUSÕES.....	101
REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Distribuição geográfica, ciclo de vida e relações evolutivas

Durante milhares de anos a população mundial tem sido acometido por parasitas do gênero *Plasmodium*. Infectando atualmente cerca de (1) 500 milhões de pessoas anualmente e colocando sob risco de infecção outros 3 bilhões de pessoas, a parasitose tropical conhecida como malária afeta a região tropical do globo e é a maior causa de mortes em crianças de até cinco anos, sendo o maior causador desse fenômeno o parasita conhecido como *P.falciparum* (2).

Doenças parasitárias de vários tipos, tal como a malária, seguem um modelo de co-evolução característico denominado "Red Queen" por Leigh Van Valen em 1973 (3), esse modelo prevê a existência de seleções evolutivas que afetam tanto fatores de virulência presentes nos parasitas quanto fatores protetores contra esse parasitismo no hospedeiro, fenômeno que se reflete nos índices epidemiológicos citados acima. Além disso, essas pressões levam a uma corrida sem fim em busca de um estado onde o hospedeiro desenvolve mecanismos evolutivos para resistir às infecções, o parasita em contrapartida desenvolve mecanismos evolutivos que aumentam sua capacidade infectiva no hospedeiro, burlando qualquer adaptação do hospedeiro.

Figura 1- Mapa de risco de infecção por *P.falciparum*.

Divisão em 3 classes: Cinza claro, sem risco; Cinza médio, risco instável (PfAPI – *P.falciparum* Incidência Parasitária Anual < 0,1/1000 pessoas); E cinza escuro, risco estável PfAPI – *P.falciparum* Incidência Parasitária Anual > 0,1/1000 pessoas) em 2007. Na figura PfPR= *P.falciparum* parasite rate.

Fonte:(4)

Dentro desse contexto os parasitas do gênero *Plasmodium* evoluíram de forma complexa. Após a picada do mosquito fêmea infectado, do gênero *Anopheles*, os esporozoítos móveis são inoculados na derme e atingem a corrente sanguínea do indivíduo (5). Estes esporozoítos são levados rapidamente para o fígado e lá invadem os hepatócitos, iniciando a fase hepática do ciclo do parasita. Após múltiplas mitoses (esquizogonia) e diferenciação, os esquizontes hepáticos liberam os merozoítas na corrente sanguínea. A duração desta fase é espécie dependente; 6 dias no caso de *P.falciparum* e 8 dias no caso de *P. vivax*.

No caso de *P. vivax* e de *P. ovale*, podem ocorrer recaídas meses depois do primeiro ataque da doença, ou mesmo depois de tratamento eficaz com remédios contra formas sanguíneas. Estas recaídas se devem à presença das formas hipnozoítas, que permanecem latentes nas células do fígado (6).

Os merozoítas são liberados por um processo complexo que permite a saída silenciosa dos merozoítas pela camada das células Kupffer ao fluxo sanguíneo hepático (7). Isso envolve, ao menos em modelo murino, formas contidas em estruturas membranosas oriundas da célula hepática (merossomos). Após liberação no fluxo sanguíneo, os merozoítas formados começam a invadir hemácias. A invasão é um processo extremamente coordenado e consiste em vários passos, uma proteína que recobre a superfície do merozoita denominada MSP1 parece desempenhar um papel importante nesse processo. Essa proteína parece estar associada à aproximação de merozoítos à eritrócitos através da ligação de MSP1 à Banda 3 (8) uma proteína transmembrana de hemácias. Após sucessivas clivagens apenas uma pequena parte (denominada MSP1₁₉) permanece na superfície do merozoito invasor, e anticorpos contra esse domínio tem sido alvo na busca por vacinas, uma vez que existem evidências que associam presença de anticorpos contra MSP1₁₉ com proteção de novas reinvasões quando esses anticorpos estão presentes (9). O processo de invasão envolve além de MSPs proteínas da rópria e das micronemas e foi revisado por Cowman e Crabb (8).

Figura 2- Merozoito do gênero *Plasmodium*.

Representação de um merozoito e a localização de suas principais estruturas.
Fonte:(8)

Dentro dos eritrócitos, os parasitas se localizam dentro de um vacúolo parasitóforo, passando pelas etapas de anel (trofozoíta jovem), trofozoíta maduro e esquizonte. Estas etapas de crescimento, diferenciação e multiplicação dão origem a outros 8 a 32 merozoítas.

Com o rompimento da hemácia infectada que também é um processo estritamente regulado e dependente de proteases do parasita (10), estes merozoítas são liberados e invadem novos eritrócitos propagando o ciclo do parasita, e é durante esta etapa do desenvolvimento do parasita que aparecem, no hospedeiro, os sintomas característicos da malária.

Porém, alguns merozoítas seguem um caminho alternativo de desenvolvimento, e formam os gametócitos (gamontos) masculinos e femininos, as formas transmissíveis para o mosquito.

Se ingeridos pelo mosquito susceptível durante o repasto sanguíneo, estes gametócitos originarão os gametas e o ciclo sexuado ou esporogônico. Outras abordagens vacinais usam esse ciclo para tentar criar uma vacina que produziria anticorpos no hospedeiro mamífero que impediria a infecção de invertebrados com o parasita interrompendo a transmissão e gerando uma “vacina altruísta” que impediria a propagação do parasita. (11)

Uma figura representativa do ciclo de vida do parasita segue abaixo (Fig. 3).

Figura 3- Ciclo de vida de Plasmodium em humanos.

O ciclo da malária envolve dois hospedeiros. Durante o repasto sanguíneo, o mosquito anofelino fêmea inocula esporozoítos no hospedeiro humano ①. Esporozoítos infectam células hepáticas ② atingem o desenvolvimento de esquizontes ③, que gera ruptura dos hepatócitos liberando merozoítos na corrente sanguínea ④. (Digno de nota, em *P. vivax* e *P. ovale* o estágio dormiente [hipnozoítos] pode persistir no fígado e causar novas liberações de merozoítos na corrente sanguínea semanas, ou mesmo anos depois da primeira infecção). Depois dessa replicação inicial no fígado (esquizogonia exo-eritrocítica A), os parasitas iniciam nova divisão assexuada nos eritrócitos infectados (esquizogonia eritrocítica B). Merozoítos infectam novos eritrócitos ⑤. A forma inicial de anel é seguida por maturação em trofozoítos e esquizontes maduros, que lisam eritrócitos infectados liberando novos merozoítos ⑥. Alguns parasitas diferenciam-se em formas sexuais no estágio (gametócitos) ⑦. O estágio sanguíneo da doença é responsável pelas manifestações clínicas da doença.

Fonte:(12)

1.2 Sintomatologia da doença e vacinas antimaláricas

Nas replicações eritrocíticas se desenvolvem os sintomas mais graves da doença. Após um número de infecções – ao menos com *P.falciparum* - as pessoas adquirem imunidade não esterilizante contra essa doença e proteção considerável contra seus efeitos mais graves (13). Vale ressaltar que na contramão desse pensamento parecem não ocorrer casos de esterilidade parasitológica nessa fase do ciclo (13). Ainda assim, admite-se que uma

vacina possa ser possível a fim de solucionar a enorme mortalidade infantil, bem como prover um menor impacto social e econômico nas regiões afetadas pela doença (14).

A busca por antígenos alvos da resposta tem sido objeto de estudo de muitos grupos. Entretanto o sucesso obtido na utilização de proteínas recombinantes, vacinadas separadamente, obtiveram até o momento um sucesso modesto revisado em (15). Outro problema apresenta-se na identificação de alvos verdadeiramente importantes e não meramente parâmetros da intensidade de exposição e também na especificidade de anticorpos produzidos em indivíduos vacinados ou imunes (13).

Além da vacina RTS/S que tem como alvo a proteína CS (circumsporozoita) do esporozoita infectante e está na fase clínica de testes em vários lugares da África (16), surgem atualmente novos alvos vacinais para o ciclo sanguíneo com resultados promissores, tanto em campo quanto em ensaios laboratoriais (MSP3, PfRH5) (17, 18). Esses antígenos parecem ter função primordial no *docking* e na invasão do parasita nas hemácias.

No entanto, com o atual conhecimento de vacinas e diferentes formulações qualquer alvo bem estabelecido pode e deve ser melhorado para obter-se melhor eficácia em testes vacinais. Exemplos da importância desses estudos foram mostrados em relação à RTS/S quando formulada com QS21 (19). A contribuição desses estudos tem como objetivo gerar imunidade adquirida eficiente entendida como a resposta que torna um indivíduo resistente a replicação sanguínea do parasita (controle do crescimento parasitário) ou haja contra sintomas graves da doença.

1.3 Imunopatologia associada à malária

A malária tem como uma de suas principais características desenvolver em pacientes infectados diversas síndromes. Essas síndromes têm como agentes causadores múltiplos fatores associados à infecção. Um quadro que sumariza a síndrome, causador e sintomas clínicos seguem abaixo:

Quadro 1- Sumário das principais síndromes causadas por infecções com *P.falciparum*.

Síndrome	Desenvolvimento clínico	Mecanismos da doença e possível seqüência de eventos
Malária cerebral	Consciência debilitada, coma, e sequelas a longo prazo	Sequestro parasitário em região cerebral;GPI bioativa;cascata de citocina inflamatória;ativação de células endoteliais;ativação de células NKT;balanço Th1/Th2; produção de quimiocinas;recrutamento de monócitos,macrófago e neutrófilo;deposito de plaquetas e fibrinogênio;envolvimento de TYÖ,T CD4+ e T CD8+;produção de IFN-Y;desarranjo no metabolismo neuronal;possível hipoxia
Malária gestacional	Insuficiência placentária, baixo peso do neonato, parto prematuro e aborto do feto	Ligação de Pfemp-1 em CSA no endotélio e sinciotrofoblasto e Acido hialurônico;produção de citocinas; recrutamento por quimiocinas e infiltração de monócitos;diferenciação de macrófagos
Anemia severa	Palidez, letargia, níveis de hemoglobina de 4-6g por ml	Supressão de eritropoiese por toxinas e citocinas;aumento por destruição de eritrócitos;alteração nos eritrócitos;deposito de imuno-complexos e complemento,fagocitose de eritrócitos;células TCD4+;balanço Th1/Th2(TNF-α e IFN-Y em detrimento à IL-10)
Acidose metabólica	Stress respiratório, respiração pesada (Respiração de Kussmaul), hipovolêmica.	Mecanismos moleculares desconhecidos,possível sequestramento disseminado do parasita; toxinas bioativas; aumento da permeabilidade vascular; redução na perfusão tecidual; anemia; obstrução pulmonar; hipoxia; aumento da glicolise; repressão da glicogênese; sobreposição de sintomas com síndrome similar à choque -tóxico
Síndrome similar a	Choque, mudanças hemodinâmicas, perfusão debilitada de órgãos,	Toxinas bioativas-Citocinas Th1; reagentes de fase aguda

choque-Tóxico
(Inflamação sistêmica
similar a síndrome de
choque-tóxico)

coagulação intravascular
 disseminada

Sumário das principais síndromes causadas por infecções com *P.falciparum* e fatores associados a cada quadro clínico.

Fonte: (20)

Todas as complicações associadas à malária estão associadas a um quadro sistêmico, pois esse é o rumo natural da infecção no ciclo sanguíneo. O combate a doença sistêmica leva, naturalmente, a liberação de agentes pró-inflamatórios de maneira sistêmica. Nesse aspecto é imprescindível uma resposta imune que consiga combinar atenuação dos efeitos pro-inflamatórios (muitas vezes lesivo como nas síndromes similares ao choque tóxico) e efetividade imune no controle da doença. Embora tenha disseminação por todo o sistema vascular a doença pode desenvolver quadros localizados pela adesão do parasita em órgãos específicos.

Sendo a malária cerebral o quadro mais grave da doença quando a doença acomete algum órgão em particular, uma teoria que integre com mais detalhes essa síndrome é necessária e útil no entendimento de nosso trabalho. A versão mais bem aceita dos eventos que culminam em quadros de malária cerebral citam a manutenção de parasitas próximos a barreira hematoencefálica por adesão de proteínas produzidas pela família de genes *var* (codificando PfEMP-1(21, 22)) à ICAM1 e conseqüente quadro inflamatório nesse local, sustentado por moléculas inflamatórias como GPIs(20, 23-25). Após um início de inflamação aguda, células imunológicas e ciclos viciosos de liberação de toxinas como GPI e hemozoina pelos parasitas aderidos culminam no seqüestro de plaquetas e finalmente a ruptura da barreira hemato-encefálica (26). De modo geral, a sustentação da resposta pró-inflamatória no local leva a altos índices de TNF- α , IL-1, IFN- γ e IL-6 em cérebros de pessoas infectadas que estão fortemente associados com essa síndrome, com especial destaque para o papel de TNF- α que é a citocina mais bem relacionada com a síndrome (26-29).

Figura 4- Efeitos de citoadesão e perpetuação de inflamação em malária.

Efeitos de citoadesão e perpetuação de inflamação em malária cerebral relacionando EMP1, GPI e decurso inflamatório.
Fonte: (20).

Sendo assim, seria ideal desenvolver-se algum método que possa impedir o ciclo vicioso de ativação pró-inflamatória (também conhecida como tempestade de citocinas) e que consiga diminuir a quantidade de $\text{TNF-}\alpha$ liberada. Se criado, esse método poderia ser visto como uma alternativa viável para impedir que síndromes mais severas se instaurem em pessoas infectadas.

Nessa linha, Schofield e colaboradores utilizaram moléculas sintéticas do tipo GPI para a geração de anticorpos em animais, após desafios, animais do tipo C57Bl/6 não mais sucumbiram a malária cerebral, no entanto esses

animais foram incapazes de controlar o crescimento parasitário (23). Na busca desses mesmos efeitos em humanos diversos grupos conseguiram correlacionar a existência de anticorpos anti-GPI e menor gravidade de sintomas clínicos (24, 30, 31) .

Porém, uma alternativa que possa unir tanto efeitos anti-sintomas e efetivos contra o parasita ainda não foi validado em modelos vacinais.

Embora a lista seja extensa alguns autores apontam que respostas imunológicas desenvolvidas contra algumas dessas moléculas podem ser cruciais para uma melhor capacidade resistiva contra as síndromes mais severas da doença (14, 23). Em vista desses fatos muitos autores sugerem que o melhor candidato vacinal seria uma formulação que possa gerar determinadas conseqüências imunológicas tais como:

- 1- promover resposta imune robusta contra alvos descritos como protetores (17, 18, 32);
- 2- ser capaz de atenuar sintomas clínicos associados com a doença, e desta forma promover melhor perspectiva na melhora de pacientes que sejam infectados impedindo a instauração de quadros graves da doença. (23, 33);
- 3- ser de fácil manipulação e de fácil estocagem para poder ser manipulada em locais endêmicos da doença com infra-estrutura limitada (34);

Nesse contexto, autores têm proposto um papel central na imunopatologia da doença associado a moléculas denominadas GPI. Os domínios GPIs são porções finais de proteínas altamente glicosiladas e associadas a uma cauda lipídica. Proteínas que sejam GPI ancoradas possuem sua localização em membranas celulares e são conectadas a essas membranas pela porção lipídica.

Dentro da imunopatologia da malária essas moléculas são cruciais no desenvolvimento e perpetuação de quadros inflamatórios que culminam, em

casos mais graves, com a destruição de tecidos epiteliais e síndromes extremamente severas como malária cerebral, sendo em geral um efeito mediado por células T CD4⁺, com possível papel de células NKT, produtoras de IFN- γ que promovem o acúmulo de células T CD8⁺ no local. (20, 35)

Múltiplos estímulos são envolvidos na evolução para malária grave. Desde modo um breve sumário de possíveis participantes nesses quadros complexos segue abaixo.

Quadro 2- Sumário de moléculas bioativas.

Produto parasitário	Receptor e célula responsiva	Patologia e efeitos celulares
Proteína membranar eritrocitária de <i>Plasmodium falciparum</i> – Família PfEMP1-	ICAM1,VCAM1,CD36,E-selectina,CSA,ácido hialurônico, CD31 em células endoteliais e células de trofoblasto;CD36 em DC	Ligação direta do parasita no cérebro, placenta e possivelmente outros ligantes em outros órgãos; CD36 possivelmente suprime ativação de DCs e macrófagos
GPI	TLR2 ,TLR4 e possivelmente ligantes do tipo C em vários tipos celulares, incluindo DC, macrófagos, células endoteliais e adipócitos; CD1 e V α 14-V β 8TCR em células NKT	Indução disseminada da expressão de genes pró-inflamatórios(TNF,IL-1,IL-6,IL12,iNOS,ICAM1,VCAM1);ativação de células NKT;indução Th1 ou Th2e produção de citocinas
Hemozoína	TLR9 em DC	Dados conflitantes-ativação celular Th1 e Th2; induz e inibe DCs; suprime macrófagos; indução de IL-10; amplamente imunossupressiva
Ligantes desconhecidos	NK e NKT por ação em receptores NKC	Ativa células NK, induz produção de IFN- γ ; regula balanço Th1 e Th2 de citocinas produzidas por células NKT
Isopentenil pirofosfato	Y δ TCRs	Ativa células T Y δ ; induz a produção de IFN- γ
Antígenos protéicos	Muitos receptores em células TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺	Ativa células T $\alpha\beta$; induz Th1 e Th2 com produção de citocinas
Açúcares desconhecidos	Lectina ligadora de manose(MBL)	A possível ligação produz proteção; baixos níveis de MBL estão associados com gravidade na doença

Sumário de moléculas bioativas responsáveis por efeitos patogênicos em malária,
Fonte: (20)

1.4 Bioengenharia de compostos nanoestruturados, uma nova promessa na vacinologia

Embora pareça difícil de entender a premissa de uma vacina que possa desencadear mais de um efeito na mesma formulação, o ramo de bioengenharia tem transposto diversos modelos que podem ser capazes de gerar respostas imunológicas satisfatórias contra alvos estabelecidos e na mesma formulação gerar respostas mais complexas que podem afetar sintomas de diversas condições imunológicas (36).

Recentemente, nanopartículas lipossomais tem-se apresentado uma das mais promissoras formulações vacinais que podem cumprir os critérios mencionados. Dentre as capacidades dessas partículas podemos salientar a capacidade de gerar *cross-presentation* (37), geração de altos títulos de anticorpos (38), direcionamento para atingir populações específicas de células (39), geração robusta e perene de anticorpos (38). Além disso eles podem ser liofilizadas sem grande perda de suas estruturas tornando esses compostos de fácil transporte e armazenagem.

Lipossomos como sistemas biomiméticos apresentam a vantagem de ser altamente modificáveis para diferentes fins imunológicos ou como carreadores de drogas (40). O campo de estudos de imunobioengenharia tem utilizado essas formulações de maneira notável para diversos objetivos tanto para gerar respostas pró-inflamatórias a antígenos diversos, quanto para gerar respostas anti-inflamatórias em doenças e condições imunes delicadas, como doenças auto-imunes e condições de transplantes (36-38, 41, 42).

Essas partículas lipossomais possuem *per se* características muito importantes tais como rápida fagocitose pelo sistema imune mononuclear (43), acúmulo em linfonodos de maneira tardia e prolongada (38), e alta estabilidade biológica quando modificada por bioengenharia (44).

Embora tenham capacidades imunes, essas formulações nunca foram testadas contra antígenos do ciclo sanguíneo no gênero *Plasmodium*, onde atualmente existem muitos trabalhos que demonstrem o papel protetor de diversos antígenos, dentre eles a proteína de superfície do merozoita 1 (MSP1). Esta é uma proteína de alto peso molecular, sintetizada no estágio de esquizonte e processada posteriormente em quatro dos antígenos mais

abundantes da superfície do merozoíta (45). Ela tem sido muito estudada principalmente devido ao fato de ser um dos principais candidatos para o desenvolvimento de uma vacina contra a fase assexuada sanguínea de *P.falciparum*. Acredita-se que ela atue como ligante para receptores específicos das hemácias do hospedeiro, sendo sua região carboxiterminal (C-terminal) de particular interesse, uma vez que é a única porção da proteína que permanece no interior da membrana do merozoíta durante a penetração da hemácia. (14) .

Também já foi demonstrado que a região MSP1₁₉ apresenta função conservada entre diferentes espécies de *Plasmodium* (46, 47). Esses estudos demonstraram que parasitas que expressam uma MSP1₁₉ heteróloga invadem e se desenvolvem normalmente e que anticorpos específicos contra essa região da proteína inibem a invasão do parasita, demonstrando assim de forma elegante o efeito protetor dos anticorpos antiMSP1₁₉.

Figura 5- Processamento da proteína MSP1.

Processamento da proteína MSP1 em seus diversos componentes.
Fonte:(47).

Esses dados demonstram a importância desse gene tanto para a sobrevivência do parasita, como na geração de resposta imune protetora por parte do hospedeiro. Embora se mostre eficaz em modelos murinos (48) esse antígeno não foi capaz de proteger humanos ou símios em ensaios

imunológicos (49, 50), porém, segue como um bom marcador de respostas protetoras no ciclo sangüíneo do gênero *Plasmodium*.

A MSP1₁₉ é uma proteína estruturalmente associada à membrana do parasita por uma porção lipídica e domínio GPI. De modo concomitante, pressupomos que a imunização adequada com proteínas que possuam o domínio GPI como antígenos de MSP1₁₉, poderiam atenuar a sintomatologia e gravidade da doença provavelmente impedindo o reconhecimento desse domínio por receptores do tipo Toll Like 4 e Toll Like 2. (31, 51)

MSP1 não é a única proteína presente na superfície dos merozoítos que são ancoradas por domínio GPI, outras proteínas como MSP2 (também tida como candidato vacinal), MSP4, MSP9 e MSP10 também possuem esse domínio. São responsabilizados a MSP1 e MSP2 cerca de 60% das proteínas na superfície do merozoito do gênero *Plasmodium* (51).

Agrupando todos esses fatores, nossa hipótese é a de que respostas imunológicas contra proteínas do tipo GPI ancoradas podem desenvolver tanto controle parasitário quanto um efeito anti-sintomatológico quando imunizadas de maneira satisfatória.

1.5 Nanoestruturas com proteínas GPI ancoradas

Utilizamos nesse trabalho sistemas lipossomais para gerar um modelo que pudesse biomimetizar membranas lipídicas com antígenos do gênero *Plasmodium* e realizar medições em relação à resposta imune produzida. Nosso modelo experimental baseia-se num misto do conhecimento imune desencadeado pelo gênero *Plasmodium* e antígenos conhecidos como potenciais alvos vacinais.

Nosso desenho experimental compreende a idéia de retirar proteínas GPI ancoradas da superfície de três cepas distintas do gênero *Plasmodium* com seus domínios GPI intactos, especificamente *P.falciparum*, *P. berghei* NK65 e *P. yoelii* XL, e reestruturá-las em partículas lipossomais.

A extração de proteínas com domínios GPI foi caracterizado primeiramente em *Leishmania* (52) e em associação com o grupo do Dr. Pietro Ciancaglini, que detém domínio de técnicas de extração de proteínas de

Leishmania e posterior incorporação em membranas lipídicas, adaptamos os mesmos métodos usados em *Leishmania* (53, 54) ao gênero *Plasmodium* para extração de proteínas com predomínio de proteínas GPI ancoradas.

Após essa extração, essas proteínas foram incorporadas à nanopartículas lipossomais compostas de lipídios artificiais DPPC(Dipalmitoylphosphatidylcholine)/Colesterol e usados na presença e ausência de adjuvantes para caracterizar os efeitos imunológicos dessas partículas e seus efeitos desencadeados no decorrer da infecção em camundongos de dois fundos genéticos distintos (Balb/C e C57BL/6).

Figura 6- Desenho experimental da geração de Proteolipossomos.

Em A temos as proteínas GPI ancoradas(GPI é o motivo vermelho) purificadas,em B temos o modelo esférico de DPPC/Colesterol e em C o produto da incubação de proteínas GPI ancoradas e vesículas lipídicas.

Diferentes fundos genéticos e diferentes linhagens podem determinar cursos completamente diferentes nos estudos de vacinas (55). Desse modo ao utilizarmos duas linhagens distintas de animais com desenvolvimento de respostas imunológicas adaptativas distintas, pretendemos analisar o real efeito destas formulações em contextos genéticos/imunológicos diversos.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial protetor de estruturas nanoparticuladas de diferentes formas de *P. berghei* NK65, *P. yoelii* XL e *P. falciparum* em modelo murino de infecção e caracterizar o perfil da resposta imune gerada.

2.1 Objetivos específicos

- 1- Analisar os efeitos imunológicos dessas partículas em relação ao perfil protetor humoral que possa explicar uma proteção no ciclo eritrocitário no modelo murino para infecções com *P. berghei* NK65 e *P. yoelii*.
- 2- Analisar os efeitos imunológicos dessas partículas em relação ao perfil protetor humoral que possa explicar efeitos anti-parasitários *in vitro* para o gênero *P. falciparum*.
- 3- Caracterizar o conteúdo de preparações de nanopartículas por western blot e quando possível validar a incorporação desses antígenos em nanopartículas por imuno-blot.
- 4- Validar se essas formulações podem ter seus efeitos imunológicos alterados pela adição de adjuvantes.
- 5- Analisar sob dois fundos genéticos distintos as mesmas formas de imunizações e validar a importância dos perfis Th1 e Th2 nos resultados obtidos.
- 6- Avaliar se o modelo biomimético apresentado pode gerar anticorpos protetores na resposta contra o parasita e se as mesmas formulações podem gerar anticorpos que atenuem os sintomas característicos da doença.
- 7- Caracterizar, através de um painel de interleucinas, o caráter da resposta desencadeada por imunização previa de nanopartículas com proteínas GPI ancoradas de *P. berghei* NK65.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os camundongos utilizados nesse estudo foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas. Todos os procedimentos foram submetidos ao Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas e foram aprovados sob o número de registro do CEUA 111. Todos os animais usados possuíam idade de 1 a 3 meses e foram mantidos sob condições nutricionais, ambientais e higiênicas controladas pelo biotério do Departamento de Parasitologia.

3.2 Parasitas e doses infectivas usadas

Para obtermos uma uniformidade no desafio dos animais, animais C57bl/6 foram infectados com a cepa *P. berghei* NK65 GFP (gentilmente cedido pelo ProFig. Claudio Marinho) e com a cepa *P. yoelii* XL em diferentes cargas parasitárias. Apenas animais infectados I.P. a partir de 5×10^6 parasitas apresentaram 100% de infectividade. 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 em tampão Alseviere (Tampão PBS contendo glicerol a 40% (ref deste tampão)) e estocados para uniformidade nos estudos futuros. O mesmo processo foi feito com parasitas do tipo **P.yoellii** XL, porém as alíquotas foram feitas em quantidade de 1×10^7 . Uma vez caracterizada essa dose de desafio, cada animal desafiado com *P.berghei* NK65 recebeu doses de desafio iguais a 5×10^6 e animais desafiados com *P. yoelii* receberam doses de desafio iguais a 1×10^6 hemácias parasitadas.

3.3 Cultivo de *Plasmodium falciparum*

A cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* foi mantida *in vitro* (em sistema *candle jar* adaptado de (56) e cultivados em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de plasma humano A⁺ ou AB⁺.

Eritrócitos O⁻ 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 regularmente sincronizadas através dos métodos de lise por sorbitol (57) e sedimentação por plasmagel (58). Uma cultura controle com hemácias não infectadas foi mantida sob as mesmas condições para controle negativo.

O plasma humano (tipo A⁺ ou O⁺) utilizado na cultura dos parasitas foi gentilmente cedido pelo Hemocentro do Hospital Sírio Libanês de São Paulo ou pelo Hemocentro do Hospital da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Cada lote de plasma foi previamente inativado a 56 °C por 1 hora. A fibrina presente no plasma foi precipitada por centrifugação (3.000 x g, por 15 minutos). As alíquotas de plasma foram armazenadas a -20 °C.

3.4 Crescimento *in vivo* das cepas *P.berghei* NK65 e *P. yoelii* para obtenção de massa antigênica

Animais do tipo C57Bl/6 ou Balb/C foram infectados com doses estipuladas descrito acima e o crescimento parasitário foi acompanhado até as parasitemias nos animais atingirem 50% para *P. berghei* NK65 e 80-85% para *P. yoelii*, neste ponto os animais foram anestesiados com ketamina e xilasina e seu sangue foi drenado por punção cardíaca até morte por hipovolêmica desses animais. O sangue foi então rapidamente lavado e colocado em condições *in vitro* em meio RPMI tamponado para maturação de todas as hemácias parasitadas.

A maturação dos parasitas até o estado de esquizonte leva em média 12-18 horas, após esse período todo e qualquer vestígio de proteínas de hemácias e de soro animal foram removidos com lavagens com PBS 0.1% saponina e centrifugação para obtenção de merozoitos (Ciclos de três, com lavagem e centrifugação alternada em centrífuga Eppendorf à 1480 g). Uma vez que os merozoitos de *P.berghei* e *P.yoelii* não são solubilizados por essa concentração de saponina, essas formas foram separadas por centrifugação em centrífugas Eppendorf à 1480 g, estocadas com inibidor de protease em freezer -80 °C.

3.5 Obtenção de merozoitos de *Plasmodium falciparum*

Culturas de *P.falciparum* foram mantidas e enriquecidas até pelo menos 60% de hemácias infectadas, estarem em estágios de esquizontes. Nesse ponto todo e qualquer vestígio de proteínas de hemácias e de soro animal foram removidos com lavagens com PBS saponina 0.1% (Ciclos de três, com lavagem e centrifugação alternada em centrífuga Eppendorf à 1480 g). Como os merozoitos das espécies murinas, merozoitos de *P.falciparum* não são solubilizados por essa concentração de saponina essas formas foram separadas por centrifugação em centrífugas Eppendorf à 1480 g.

3.6 Extração de proteínas GPI ancoradas

Este protocolo é uma adaptação do inicialmente publicado (54), adaptado para Merozoitos de *P.falciparum*, *P. berghei* e *P. yoelii* foram submetidos a sonicação em tampão Tris HCl 5 mM, pH 7,5 em potencia máxima por 1-30 min e intervalo de mesmo tempo em gelo. Após total disrupção do pellet (em geral 4 à 5 ciclos) a concentração de proteínas foi ajustada a 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 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 a centrifugação em centrífuga Sorvall a 1480 g (esse passo foi critico pois em centrífuga eppendorf o mesmo efeito não foi obtido) para obtenção de três fases- Fase aquosa, fase rica em GPI e fase de pellet de merozoitos. A fase intermediária referente à fase rica em proteínas GPI ancoradas foi separada e armazenada em freezer - 20 °C até seu uso.

3.7 Remoção de Triton X-114 das amostras

O detergente foi removido das amostras pela adição de resina hidrofóbica(Bio-Beads SM Hydrophobic and Polar Interaction Adsorbents) e a fase rica em GPI foi obtida na concentração de 200 mg/ml com duas trocas num intervalo de 2 horas entre elas.

3.8 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita de acordo com método de Hartree (59) em curva de BSA com 1% de Triton-114. Quando não havia influência de detergentes na amostra a quantificação foi feita pelo teste de Bradford com curva de BSA(60).

3.9 Geração de lipossomos

Foram usados nesse trabalho lipossomos feitos com DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholine) e colesterol na proporção molar 4-1. 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 fosfolípides nas paredes do tubo. Esse filme foi então mantido sob vácuo por pelo menos 1 hora para a remoção de qualquer traço de clorofórmio restante. O filme foi então reidratado em tampão Tris HCl 5 mM, pH 7.5 à 60 °C(Temperatura de transição do DPPC) e agitado vigorosamente a cada 10 min por 1 hora. A solução leitosa obtida foi então submetida a sonicação em força máxima até quase completa transparência da solução. Todo o sistema foi então submetido a ultracentrifugação em 100.000 g (Ultracentrifuga Beckman). O sobrenadante contendo vesículas lipídicas unilamelares foi então retirado de qualquer pellet residual e usado na produção de proteolipossomos.

3.10 Geração de proteolipossomos de proteínas GPI de merozoítas de *Plasmodium*

Este protocolo foi adaptado de (54). 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 horas de incubação a solução resultante foi então centrifugada em ultracentrifugas a 180.000 g e o pellet foi reservado. O pellet foi então ressuspensionado em 1 ml de tampão Tris HCl 5 mM, pH7.5 e sua concentração foi medida por métodos de Hartree (59).

3.11 Geração de proteínas recombinantes de *P.yoelii* e *P.berghei*

Foram geradas epitopos de MSP1₁₉ de *P.yoelii* e *P.berghei* para posterior validação de ensaios de ELISA. Para isso gDNA de *P.berghei* foi utilizado para amplificação de epitopos em *P.berghei* e um plasmídio contendo o epitopo de MSP1₁₉ de *P.yoelii* (gentilmente cedido pela professora Silvia Boscardin) foi usado para amplificação por PCR do epitopo de *P.yoelii*. Ambos os epitopos foram amplificados pelos primers F1, Seq1. 5' gcggatccaaacatgtatgtgttgatac 3' , e R3, Seq 2. 5' ccggatcccataaagctggaag 3' e ambos contendo a seqüência de corte para BamH1 flanqueando a seqüência desejada.

Os produtos amplificados foram purificados do gel de agarose, digeridos com a enzima Bamh1 e clonados no vetor de expressão PGEX 2T. Seguiu-se seqüenciamento dos clones até encontrarmos clonagens corretas dos epitopos. Ambas as proteínas foram feitas a partir de protocolos do fabricante (Manual PGEX) adicionando IPTG ao meio de cultura dessas cepas em fase de crescimento logaritimico das bactérias inoculadas, a purificação seguiu método do fabricante para purificação por GST e finalmente as proteínas foram preservadas a -20 °C.

Figura 7- Proteínas recombinantes de *P.berghei* e *P.yoelii*.

Proteínas recombinantes em gel de acrilamida à 7% usadas neste trabalho.

3.12 Imunizações com proteolipossomos vacinais, Alum e lipídeo A

Todos os animais imunizados foram submetidos a imunizações intraperitoneais com quantidades fixas de 25 mg de proteolipossomos. Quando Alum (gentilmente cedido pelo professor Montillo Russo do departamento de Imunologia) foi utilizado como adjuvante o mesmo foi aplicado concomitante com os proteolipossomos em lado oposto do peritônio ao que foi primeiramente aplicada à formulação de proteolipossomos. No caso em que lipídeo A foi usado como adjuvante, o lipídeo A foi co-incubado a 25 ng de lipídeo A para cada 1 ml de proteolipossomos com as formulações por 1 hora a RT e essa solução foi então imunizada intraperitonealmente nos animais tratados.

Os grupos controle receberam exatamente o mesmo tratamento com a diferença de receberem lipossomos no lugar de proteolipossomos.

O protocolo de imunizações seguiu a imunização de 3 imunizações para cada grupo experimental com intervalos de 3 semanas entre as imunizações. 10 dias após a terceira e última imunização foram coletados soros, e quando cabível, os animais foram desafiados com parasitas *P. berghei* ou *P. yoelii* (vide acima).

3.13 Coleta de sangue e obtenção de amostras sanguíneas para monitoramento da parasitemia

As coletas de soro para análises de ELISA, Western Blot e CBA foram coletadas por punção na artéria submandibular dos animais em questão.

As parasitemias foram avaliadas por esfregaço sanguíneo corado com Giemsa e/ou por citometria de fluxo como descrito por Jasen e colaboradores (61). Para uma maior correlação dos dados, amostras contendo o parasita *P. berghei* NK65 foram incubadas em brometo de etídio 10 ng/ml em PBS (Tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline*), peletadas por centrifugação a 1840 g e lavadas com PBS e analisadas por citometria de fluxo.

A expressão do GFP ou a detecção de Syto16 nas diferentes linhagens de plasmódio foi analisada comparando-se os valores de parasitemia obtidos por esfregaço sanguíneo corado com Giemsa e citometria de fluxo, em que se

consideraram infectados os eritrócitos além da linha delimitada pelo controle. Testes de correlação foram realizados com todas as linhagens de parasita GFP para confirmar a semelhança entre os resultados obtidos na citometria com aqueles observados nos esfregaço sanguíneo.

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 transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond-C, GE Healthcare, NJ, EUA), que foram então bloqueadas durante 1 hora 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 hora 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 Imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados utilizando merozoítos de *P.falciparum*, *P. berghei* e *P. yoelii* purificados e soros de animais imunizados com diversos tratamentos ou ainda anticorpos coelho anti-MSP1₁₉ de *P. yoelii* ou cabra anti-MSP1₁₉ *P.falciparum*. Cada análise foi feita em

separado para cada animal imunizado. Os parasitas foram incubados com 40 µg/ml de DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) DAPI aqui (azul) e o anti-corpo primário utilizado foi o plasma de animais imunizados ou anti- MSP1₁₉ de *P. yoelii*/anti-MSP1₁₉ de *P. falciparum* (MR4), em um volume de 100 µl por 1 hora a 37 °C, seguido por incubação com os soros em diluição 1-200, com posterior incubação com anticorpo anti-IgG 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.

3.16 Elisa

A técnica de ELISA indireta foi estabelecida com algumas alterações- inicialmente, as placas de ELISA (Maxsorb, Nunc, Hampton, NH, USA) foram adsorvidas com quatro diferentes antígenos recombinantes- MSP1₁₉ de *P. falciparum*, MSP2 de *P. falciparum*, MSP1₁₉ de *P. berghei*, extrato de merozoito de *P. berghei* e extrato de merozoito de *P. yoelii* nas concentrações de 250 ng, 250 ng, 250 ng, 1 µg e 1 µg/poço respectivamente 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 1X + Tween 20 (0,05%). Após as lavagens, foi realizado bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação, incubando-se com PBS 1X adicionado de 4% leite em pó desnatado por 1 hora 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 1X 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 testadas diluições seriadas entre 1-5000 e 1-7500 do conjugado (HRP Conjugated Goat anti-Mouse IgG Fc (Immunology Consultants Lab) em 100 µl de PBS 1 X adicionado de 2% leite em pó 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) na diluição 1-1150 e 0.3 mg/ml de Orto-fenil-diamina (OPD) (Sigma Aldrich, USA), incubando-se por 15 minutos. Seguido este período a reação foi interrompida com 50 µl de HCl (1 M) e foi realizada a leitura a 490 nm. Todos os soros foram avaliados em duplicata.

3.17 Dosagem de interleucinas séricas

Amostras de soro pré-desafio e pós-desafio de animais imunizados com proteolipossomos de *P. berghei* foram testadas em relação a interleucinas presentes no soro. A dosagem seguiu protocolo do kit CBA BD-Bioscience e foi analisada em citometria de fluxo em aparelho Canto (BD).

3.18 Cultura de células RAW-LC3 Para os ensaios de produção de TNF por células RAW

Foram utilizadas linhagens de células RAW-LC3 (gentilmente cedida por Gustavo Amarante Mendes (Dep. de Imunologia, ICB-USP). A linhagem RAW constitui a cepa imortalizada, a qual expressa naturalmente ligantes imunológicos característicos de células monocíticas do sistema imune de camundongos.

As células foram cultivadas em garrafas de cultivo em meio RPMI-1640 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 .

3.19 Ensaio de liberação de TNF-α por células RAW

Para definir a proporção de TNF-α liberado por células RAW frente a estímulo com extratos de esquizontes de *P.falciparum* um ensaio de liberação com dose resposta a quantidade de antígeno foi padronizado.

Primeiramente, 5x10⁴ células RAW foram colocadas em placas de 96 poços e estimuladas com extratos de esquizontes em quantidades que variaram de 1x10⁴ esquizontes até 5x10⁶ em duplicata. Essas células foram

estimuladas por 8 horas e seu sobrenadante foi congelado em freezer -80 °C até análise e quantificação de TNF- α liberado. A quantificação de TNF- α no sobrenadante da cultura foi feito por Elisa de captura e seguiu as instruções em kit comercial para dosagem de TNF- α da Invitrogen (KMC3011).

3.20 Ensaio de liberação de TNF- α frente anticorpos provenientes de animais imunizados com proteolipossomos de *P.falciparum*

A linhagem celular de macrófagos murinos RAW264.7 (gentilmente cedida pelo professor Gustavo Amarantes do departamento de Imunologia), que secreta TNF na presença de extratos de esquizontes de *P.falciparum* foi usada para os ensaios de neutralização de liberação de TNF (23). Essa linhagem celular foi previamente utilizada para ensaios de neutralização de síndrome de choque tóxico com toxina de choque tóxico 1 (TSS-1) em ensaios *in vitro* (62) e em ensaios do mesmo gênero para toxinas GPI de *P.falciparum* (30). Soros de animais imunizados (2,5 mg/ml) foram incubados com $2,5 \times 10^5$ esquizontes sonicados em duplicata em placas de cultivo estéreis de 96 poços (Nunc) por 1 hora à 37°C com agitação leve. Após a incubação, 5×10^4 RAW264.7 células foram adicionadas a cada poço e incubadas por 24 horas (37 °C, 5% CO₂) o sobrenadante foi então coletado e usado para medir a quantidade de TNF- α liberado por essas células. Soros positivos foram feitos sem soro, e soros negativos foram feitos sem a adição de extrato de esquizontes.

A neutralização de TNF foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: % de neutralização = $100 - [(A/B) \times 100]$, onde A é a quantidade específica de TNF liberado pelos soros preincubação com IgG [(media de TNF liberado na presença de soro e extrato de esquizonte)-(TNF liberado com células incubadas somente com soros sem extrato de esquizonte)], e B é a liberação de TNF liberada pelos controles positivos [(media das células incubadas na presença de extrato de esquizonte)-(media de TNF incubada somente com meio)], o mesmo método foi validado para ensaio em humanos em trabalho que haviam a mesma finalidade (30).

4 RESULTADOS

4.1 Purificação de Merozoitos

A extração de proteínas oriundas da superfície de merozoitos foi feita a partir de formas maduras e de merozoitos livres das cepas estudadas nesse trabalho (*P. falciparum*, *P. berghei* e *P. yoelii*). Para certificação de formas puras obtidas em cultura dessas cepas, foi feito esfregaço de merozoitos puros, e quando possível foi feito um ensaio de imunofluorescência contra MSP1₁₉ para validar os estágios tardios do desenvolvimento de merozoitos. A FIG..8 mostra esfregaços das linhagens *P. falciparum* 3D7 e *P. berghei* NK65.

Figura 8- Purificação de merozoitos.

Merozoitos livres obtidos em cultura de 3D7(a) e sangue retirado de animais infectados com *P. berghei* e posteriormente purificados por coluna magnética(B) foram lavados com 0.1% saponina em PBS, para completa remoção de membranas eritrocíticas infectadas, e coradas com Panótico.

Para uma verificação mais apurada sobre a maturidade das formas obtidas, seguiu-se uma imunofluorescência contra merozoitos livres para validação da existência do antígeno MSP1₁₉ nas formas oriundas de *P. yoelii* e *P. falciparum*, esses experimentos foram feitos de rotina sempre que foi necessário a produção de mais amostras de merozoitos livres para obtenção de proteínas nesse estudo. Como demonstrado nas figuras 9 e 10, obtivemos uma preparação adequada de merozoitas que foi utilizada posteriormente para purificação de proteínas GPI-ancoradas.

Figura 9- Imunofluorescência da fração de merozoítas de *P. yoelii*.

Merozoitos livres de *P. yoelii* lavados com PBS saponina à 0.1% para limpeza de membranas eritrocitárias e foram incubados com anticorpo anti-MSP1₁₉ de *P. yoelii* feito em coelho e DAPI(40 µg/ml), essa incubação foi lavada 3 vezes e incubada com anticorpo anti-coelho conjugado com Alexa 488, o pellet foi lavado novamente por três vezes e as amostras foram finalmente analisadas em microscópio de fluorescência. Essas análises foram feitas com parasitas que não expressassem GFP. A-Branco, B-Merge=DAPI+primário anti-PyMSP1₁₉ + Secundário Alexa 488, C- primário anti-PyMSP1₁₉ + anti-IgG coelho Alexa 488 e D-DAPI.

Figura 10- Imunofluorescência de merozoítas fracionados de *P.falciparum*.

Merozoítos livres de *P.falciparum*, linhagem 3D7, foram lavados com PBS saponina à 0.1% para remoção de membranas eritrocitárias e depois incubados com anticorpo anti-MSP1₁₉ de *P.falciparum* feito em coelho e DAPI(40 µg/ml), essa incubação foi lavada 3 vezes e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 488, o pellet foi lavado novamente por três vezes e as amostras foram finalmente analisadas em microscópio de fluorescência. A- Branco, B-Merge=DAPI+primário anti-PfMSP1₁₉ + anti-IgG coelho Alexa 488, C- primário anti-PfMSP1₁₉ + anti-IgG coelho Alexa 488 e D-DAPI.

4.2 Geração de lipossomos feitos de DPPC-Colesterol.

Através do método apresentado nesse trabalho (Seção 3.9), foi possível construir lipossomos com DPPC-Colesterol na razão molar de 4-1. Esses lipossomos foram extensivamente analisados durante todas as repetições de experimentos e sempre apresentaram tamanhos aproximados de 70nm, após a incorporação de proteínas GPI ancoradas o tamanho desses lipossomos aumenta consideravelmente até o tamanho aproximado de 200 nm. A FIG.11 demonstra a diferença de tamanho nesses lipossomos antes e pós-incubação com proteínas GPI ancoradas. A Tab. 1 demonstra os tamanhos relativos das amostras pré e pós-incubação para cada cepa usada nesse trabalho e seus índices respectivos de polidispersidade (Quando maior esse índice menor a uniformidade das amostras).

Tabela 1- Tamanho de lipossomos antes e após incubação com proteínas GPI.

Formulação lipídica	Tamanho	Polidispersidade
Lipossomos	77,7533±18,8557	0,2013±0,00808
Proteolipossomos de <i>P. falciparum</i> (3D7)	197,666±61,6549	0,54±0,0529
Proteolipossomos de <i>P. berghei</i> NK65	177,9±73,8065	0,65±0,0300
Proteolipossomos de <i>P. yoelii</i> XL	200,3333±93,28	0,6466±0,0351

Os dados representados na tabela foram feitos de maneira rotineira para cada preparação vacinal formulada. Os dados na tabela contam com resultados representativos de 3 preparações.

Figura 11- Aumento no tamanho dos lipossomos após incorporação de proteínas GPI ancoradas.

Em A, temos dispersão normal dos lipossomos em nanômetros pela sua porcentagem nas amostras analisadas, em A1 temos os lipossomos pré-incubação e em A2 após a incubação com proteínas GPI ancoradas oriundas dos parasitas *P. berghei* NK65.

4.3 Carregamento de antígenos GPI ancorados em proteolipossomos vacinais

A fim de caracterizar se a expansão no tamanho das formulações vacinais foi causa pela incorporação de antígenos, um gel de retenção de proteínas foi feito comparando proteínas presentes no extrato de proteínas GPI ancoradas purificado e enriquecido, em comparação com proteínas presentes nos proteolipossomos. Além dessa comparação foram adicionados extratos de

merozoitos livres de cada cepa, o sobrenadante de cada incubação de lipossomos e extratos de proteínas GPI.

Quando possível cada poço do gel de SDS Page recebeu quantidades equivalentes de proteínas, o único caso onde as proteínas ficaram em valores inferiores foi o do sobrenadante da incubação lipossomos + extrato de GPI purificados. Nesse caso o sobrenadante possuía valores baixos de proteínas, e em função do volume de cada poço, não foi possível colocar quantidade equivalente de proteínas mesmo usando toda a capacidade volumétrica dos poços. A FIG.12 mostra comparativamente as proteínas retidas em cada fase da fabricação das partículas vacinais referentes à cepa 3D7.

Figura 12 - Ensaio de retenção de antígenos na produção de proteolipossomos da cepa 3D7.

Em 1 as proteínas referentes a merozoitos livres de *P.falciparum*, em 2 proteínas presentes no extrato concentrado de proteínas GPI ancoradas, em 3 as proteínas presentes nos proteolipossomos de 3D7 e em 4 o sobrenadante da incubação de proteínas GPI e lipossomos. Gel de 7,5% de acrilamida.

Através desse ensaio é possível observar a retenção de proteínas nos proteolipossomos variando de 135 kDa até 17 kDa, isso sugere a possibilidade de retenção de proteínas de 19 kDa e uma banda mostra-se mais forte na altura de aproximadamente 80 KDa. Uma vez que o gel apresenta proteínas

com enorme variação de peso é sugestivo a possibilidade de retenção, de fases diferentes do processamento da proteína MSP1 em seus estágios, bem como diversos outros antígenos.

Para averiguar se existiria nos proteolipossomos a proteína MSP1, mais especificamente seu fragmento de 19 kDa, as mesmas fases foram submetidas a um Western Blot feito com anticorpos específicos a esse antígeno. A figura FIG.13 mostra a aparição de bandas referentes ao peso entre 26 e 17 kDa nas proteínas equivalentes ao gel de prata presente na FIG.12.

Figura 13 - Western Blot evidenciando a presença da proteína PfMSP119 em proteolipossomos.

Em C temos o painel de retenção de MSP119Pf em cada etapa de produção dos proteolipossomos de *P.falciparum*, em C1 temos o poço referente a merozoítos livres de 3D7, em C2 temos a banda referente a proteínas GPI ancoradas, em C3 o poço referente a proteolipossomos e em C4 temos o poço referente ao sobrenadante da incubação de lipossomos + extratos de proteínas GPI enriquecido.

Uma vez mostrado a retenção e incorporação de proteínas GPI ancoradas, A cerca desses fatos mostra-se claro a retenção de proteínas GPI, mais especificamente MSP1₁₉ nos modelos vacinais. O mesmo processo foi feito com extratos e fases das cepas *P. berghei* NK65 e *P. yoelii* XL. A FIG.14 demonstra a retenção de proteínas referente à cepa *P. berghei* e na FIG.15 temos o mesmo ensaio referente ao parasita *P. yoelii*.

Nesses ensaios foi possível observar características curiosas e importantes para as conclusões posteriores deste trabalho. Referente ao parasita *P. berghei* NK65 a banda mais proeminente de proteínas retidas tem peso entre 26 e 17 KDa, porém em ensaios posteriores a linhagem de animais

C57Bl/6 não foi capaz de nenhum reconhecimento imune desse antígeno em sua forma nativa em merozoítos (Western Blot contra merozoítos FIG.27).

Figura 14 - Gel de retenção de antígenos referente ao parasita *P. berghei* NK65.

Em 1 temos bandas referentes a merozoítos livres, em 2 bandas referentes a pellet de merozoítos sonificados para extração da fase rica em proteínas GPI, em 3 bandas referentes a proteínas GPI concentradas, em 4 bandas de proteínas retidas em proteolipossomos e em 5 proteínas restantes da incubação lipossomo + proteínas GPI enriquecidas. Gel a 7,5 % de acrilamida.

Figura 15 - Ensaio de retenção de antígenos em proteolipossomos referente ao parasita *P. yoelii*.

Em 1, bandas referentes a proteínas presentes nos merozoitos livres de *P. yoelii*, em 2, proteínas presentes na fase enriquecida com proteínas GPI ancoradas, em 3 proteínas retidas em proteolipossomos ,tendo em destaque no círculo azul proteolipossomos resistentes a solubilização por SDS e em 4 proteínas referentes ao sobrenadante da incubação de lipossomos e proteínas GPI enriquecidas. Gel gradiente variando entre 4% até 12%.

4.4 Titulação de soros de animais imunizados com proteolipossomos com proteínas de *P. berghei*, *P. yoelii* e *P.falciparum*.

Os dados apresentados até o momento sugerem a retenção de antígenos e alvos vacinais estabelecidos pela literatura, como a MSP1₁₉ nas formulações proteolipossomais. A fim de verificar se essas formulações possuem capacidades vacinais imunizamos animais das linhagens C57BL/6 e

Balb/C para averiguar títulos de anticorpos sendo gerados contra proteínas encontradas na superfície do merozoita.

Para elucidar em paralelo se essas partículas poderiam ter seus efeitos vacinais modulados pela adição de adjuvantes decidimos incluir grupos adicionais que receberam tanto as nanopartículas lipossomais como adjuvantes de dois tipos, Alum e Lipídio A. Uma vez que um desses adjuvantes tem forte tendência a modular a resposta imune para um viés do tipo Th2 (Alum, 100 µl por dose) e o outro do tipo Th1 (Lipido A 25 ng por dose).

O desenho experimental para imunizações seguiu o seguinte protocolo- Animais foram imunizados com lipossomos mais adjuvante, proteolipossomos (25 µg por dose) com proteínas oriundas de *P.falciparum* (cepa 3D7), *P. berghei* (Cepa NK65) e *P. yoelii* (cepa XL) e proteolipossomos mais adjuvantes quando conveniente ao grupo experimental. Cada animal recebeu 3 doses (25 µg das formulações citadas sendo o intervalo entre as imunizações de 21 dias, após a última imunizações cada animal foi sangrado por veia mandibular após 10 dias seguidos da última imunização. Nos casos onde o desafio experimental foi possível, os animais foram desafiados nesse dia.

Após a coleta dos soros os plasmas foram titulados por diluição crescente partindo de 1:300 em reação imunoenzimática de captura (ELISA) e foram considerados positivos os soros que obtiveram absorbância acima dos soros pré imunes mais duas vezes o desvio padrão dos mesmos. Como antígenos na placa foram utilizados merozoitos sonificados de cada cepa infectando animais e, quando disponível, proteínas recombinantes. As proteínas recombinantes utilizadas foram MSP1₁₉, MSP2, MSP4, MSP5, e MSP10 de *P.falciparum* e a escolha dessas proteínas foi feita por todas serem GPI ancoradas. Em relação às cepas murinas foram feitas recombinantes de MSP1₁₉ de *P. berghei* e MSP1₁₉ de *P. yoelii*.

Uma vez que também era de interesse avaliar a capacidade imunogênica de cada partícula, realizamos nos animais Balb/C imunizados com proteolipossomos de 3D7, a retirada de plasma antes de cada dose. Desse modo foi anotada uma cinética do incremento nos anticorpos produzidos por cada dose de imunização. A FIG.16 demonstra a titulação relativa de cada animal após primeira, segunda e terceira dose com proteolipossomos.

Figura 16 - Cinética de aquisição de anticorpos por imunização de proteolipossomos.

A1-A5 representam cada animal usado nas imunizações com proteolipossomos dotados de proteínas gpi ancoradas de merozoítas de *P.falciparum* 3D7, neste caso os animais foram imunizados com proteolipossomos sem a adição de nenhum adjuvante. As colunas terminam no nível final de cada titulação e os ELISAs feitos foram feitos com placas sensibilizadas com 125 ng por poço de proteína recombinante PfMSP1₁₉.

Ao invés de simplesmente replicarmos os mesmos grupos experimentais e aumentarmos o número de animais sem adicionar qualquer informação relevante decidimos observar como nossas formulações vacinais comportam-se frente a diferentes fundos genéticos. Nesse contexto a repetição das imunizações foi feita em animais C57BL/6. A FIG.17 demonstra o título máximo obtido nas imunizações em animais C57BL/6 e Balb/C em 3 imunizações com proteolipossomos de 3D7.

Figura 17 - Titulação de anticorpos contra proteolipossomos feitos a partir de merozoítas de *P.falciparum* 3D7.

Os dados na figura mostram a titulação máxima de anticorpos 10 dias transcorridos após a terceira imunização com proteolipossomos de 3D7 em dois fundos genéticos distintos C57BL/6 e Balb/C.

Uma vez que nossas formulações foram compostas por vários antígenos averiguamos a existência de anticorpos contra outras proteínas recombinantes representando antígenos também GPI ancorados (vide acima). Somente o antígeno MSP2 teve algum reconhecimento relevante representado na FIG.18. Do grupo composto por animais Balb/C todos responderam com baixos títulos para MSP2 recombinante, porém somente um animal C57BL/6 respondeu com títulos de 1:300.

Figura 18 - Titulação contra PfMSP2.

Os soros de animais imunizados com proteolipossomos foram testados contra MSP2 recombinante como descrito.

Nos animais imunizados com proteolipossomos de cepas murinas os soros foram testados contra extrato totais de proteínas de merozoítos e contra MSP1₁₉ de cada cepa. Enquanto animais imunizados com *P. yoelii* XL tenham apresentado reconhecimento forte de PyMSP1₁₉, os animais imunizados com proteolipossomos de *P. berghei* obtiveram altos títulos contra extratos de merozoítos mas títulos inexistentes ou muito baixos para PbMSP1₁₉. Uma vez que MSP1.19 de *P. yoelii* e MSP1₁₉ de *P. berghei* tem similaridade de 92% em sua composição protéica (Dados provenientes de um blast desses dois epitopos protéicos) os soros de animais imunizados com proteolipossomos de *P. berghei* foram testados contra MSP1₁₉ de *P. yoelii* e também não revelaram nenhuma reatividade. A FIG.20 demonstra os grupos e a titulação dos soros contra o antígeno MSP1₁₉ de *P. berghei*.

A FIG.19 resume os dados para *P. yoelii* e apresenta os títulos de anticorpos de dois grupos de Balb/C imunizados com proteolipossomos(Proteo) e proteolipossomos mais lipídio A (LipA+Proteo).

Figura 19 - Título de anticorpos contra extrato de merozoítos e MSP1₁₉ de *P. yoelii*.

Cinco animais Balb/C foram imunizados com proteolipossomos e cinco animais receberam proteolipossomos com a adição de Lipídeo A. Extrato total significa que os títulos referem-se a extratos de merozoítos(625ng/poço). MSP1₁₉ significa que os títulos referem-se somente a MSP1₁₉ recombinante de *P. yoelii*(125ng/poço). Os grupos definem-se como imunizados com proteolipossomos (Proteo) e imunizados com proteolipossomos +Lipídeo A(LipA+Proteo). O * refere-se a valores estatísticos com $p < 0.05$.

Os animais imunizados com proteolipossomos de *P. berghei* NK65 foram imunizados com proteolipossomos e como adjuvante foi utilizado Alum. Essas imunizações foram feitas em dois fundos genéticos distintos C57BL/6 e Balb/C. A FIG.21 resume o resultado de todas as imunizações nesses animais, ao final das imunizações com proteolipossomos esses animais foram desafiados com *P. berghei* NK65 e tiveram seus soros coletados após 15 dias uma vez que os soros após 15 dias também foram testados contra extratos totais e MSP1₁₉ de *P. berghei* a capacidade de reconhecimento desses soros também foi colocado no gráfico.

Observamos que em ambos os modelos, *P. berghei* e *P. yoelii*, não existe diferença em relação ao título máximo de anticorpos contra extrato de merozoítas e que a adição de adjuvantes não foi capaz de aumentar a imunogenicidade dos proteolipossomos (já bem altas e relevantes frente aos grupos controles). Outro aspecto importante é que independente do fundo genético/ou cepa adotadas a imunogenicidade dos proteolipossomos tende a manter-se relevante e alta o quê evidencia que nanopartículas

proteolipossomais são muito antigênicos e podem ser exploradas como vacina no que diz respeito a altos índices de respostas humorais. Cabe ressaltar que a infecção com *P. berghei* aumenta a apenas marginalmente o título de anticorpos contra PbMSP1₁₉.

Figura 20 - Titulação de soro de animais imunizados com proteolipossomos de *P. berghei* pré-desafio e pós-desafio contra MSP1₁₉ de *P. berghei*.

Os soros aqui testados referem-se ao décimo dia após a terceira imunização com proteolipossomos ou proteolipossomos +Alum em dois fundos genéticos distintos, o nome de cada grupo é auto explicativo e a ausência da notação "15 Dias" refere-se ao soro imediatamente pré-desafio dos animais com 1×10^5 formas sanguíneas do tipo *P. berghei* NK65. A notação "15 dias" Refere-se ao soro obtido após 15 dias de infecção com parasitas *P. berghei* NK65.

Figura 21- Titulação de soro de animais imunizados com proteolipossomos de *P. berghei* pré-desafio e pós-desafio contra extratos de merozoito.

Os soros aqui testados referem-se ao décimo dia após a terceira imunização com proteolipossomos ou proteolipossomos +Alum em dois fundos genéticos distintos, o nome de cada grupo é auto explicativo e a ausência da notação "15 dias" refere-se ao soro imediatamente pré-desafio dos animais com 1×10^5 trofozoítas do tipo *P. berghei* NK65. A notação "15 dias" refere-se ao soro obtido após 15 dias de infecção com parasitas *P. berghei* NK65. O * refere-se a valores estatísticos com $p < 0.05$.

4.5 Padrão de reconhecimento dos soros imunes contra proteínas nativas em merozoitos

Uma vez que as proteínas utilizadas na geração de proteolipossomos são extensivamente manipuladas até sua purificação para carregamento em lipossomos, decidimos analisar se os soros obtidos seriam capazes de reconhecer proteínas nativas em merozoitos desses animais. Dessa forma seguiu-se imunofluorescência desses soros contra merozoitos de cada uma das espécies utilizadas nesse estudo. Todos os soros foram analisados individualmente e todos os soros, sem nenhuma exceção, foram capazes de reconhecer com alta intensidade merozoitos livres das cepas estudadas, sejam elas infectivas a murinos ou a humanos. As FIG.22 e FIG.23 demonstram um exemplo de parasitas utilizados nesse estudo. Isso demonstra entre outros

aspectos que independente dos fundos genéticos analisados, os anticorpos são funcionais em reconhecerem formas maduras e infectivas do ciclo sanguíneo.

Figura 22 - Imunofluorescência de soro imune com proteolipossomo de *P.falciparum*, cepa 3D7.

Em A temos merozoitos livres, em B a sobreposição da fluorescência de DAPI com o antisoro primário murino imune e secundário de anti IgG murino de coelho conjugado a Alexa 488, em C imagem de DAPI e em D primário murino imune e secundário anti IgG murino de coelho conjugado a Alexa 488. Todos os soros seja em fundo Balb/C ou C57BL/6 foram capazes de reconhecer de forma similar os merozoitos livres, e a figura representa um padrão típico encontrado em todos os soros.

Figura 23 - Imunofluorescência de soro imune com Proteolipossomo de *P. berghei*, cepa NK65.

Em A temos merozoitos livres, em B merge da fluorescência de DAPI+ primário murino imune e secundário de coelho conjugado a Alexa 594, em C imagem de DAPI e em D primário murino imune e secundário de coelho conjugado a Alexa 594. Todos os soros seja em fundo Balb/C ou C57BL/6 foram capazes de reconhecimento similar a merozoitos livres, a figura aqui segue representando todos os soros.

Se houver a geração de resposta contra múltiplos antígenos e/ou antígenos processados na maturação de merozoitos esperamos o reconhecimento no processo final de maturação das formas infectivas do ciclo sanguíneo, conseguimos observar reconhecimento de proteínas no vacúolo parasitoforo de formas em estágio avançado de maturação nos soros de animais imunizados com proteolipossomos com *P. yoelii*. Esses seriam inclusive os modos de proteção gerados por anticorpos que reconheçam epitopos pré-processamento, no caso ilustrado com maior clareza em estudos ao epitopo MSP 1₄₂ (32). Esses anticorpos poderiam impedir o processamento de antígenos importantes na evasão das hemácias e perpetuação do ciclo sanguíneo. A FIG.24 representa o reconhecimento visto em animais imunizados com proteolipossomos com *P. yoelii*, tal efeito no entanto não foi possível de ser observado em todos os soros e parece ser uma particularidade de poucos plasmas de animais imunes.

Figura 24 - Reconhecimento de proteínas no processamento na maturação de formas maduras de formas sanguíneas.

Alguns soros de animais imunizados além de demonstrarem reconhecimento de merozoitos livres foram capazes de reconhecer o citoplasma de eritrócitos infectados e possivelmente sua superfície em formas avançadas de desenvolvimento. Em A temos merozoitos livres, em B merge da fluorescência de DAPI+ primário murino imune e secundário de coelho conjugado a Alexa 594, em C imagem de DAPI e em D primário murino imune e secundário de coelho conjugado a Alexa 594.

4.6 Anticorpos gerados por imunização com proteolipossomos reconhecem proteínas de parasitas por imunoblot

Uma vez que foi possível constatar a presença de anticorpos funcionais contra merozoitos livres tentamos ilustrar a diversidade de antígenos reconhecidos nos extratos de formas maduras das cepas testadas. Para isso o extrato de formas maduras das cepas foi separado em gel de SDS-PAGE e transferido para uma membrana de celulose e posteriormente incubada com pool de soros obtidos a partir de animais imunizados, esses anticorpos foram posteriormente incubados com anticorpos secundários conjugados a peroxidase e finalmente revelados mediante substrato quimioluminescência. As figuras FIG.25, FIG.26 e FIG.27 revelam o padrão de bandas reconhecido pelo pool de soros.

Figura 25 - Western Blot contra merozoítos de 3D7.

Houve uma etapa de bloqueio com leite a 4% e os soros usados na incubação foram de animais imunizados diluídos 1-1000 e os anticorpos secundários foram anti-camundongos 1-2000. Na legenda vemos os fundos genéticos analisados e na lateral esquerda a marcação relativa a cada peso definido pelo padrão molecular.

É possível reconhecer um padrão de múltiplas bandas evidenciadas em cada Western. Curiosamente, animais imunizados somente com proteolipossomos demonstraram reconhecer um padrão de bandas maiores em animais imunizados com proteolipossomos de *P. berghei*, e mesmo em *P. yoelii* o reconhecimento de bandas na altura de 40 KDa e 19 KDa parece ter sido mais intenso.

Figura 26 - Western Blot contra merozoítos de *P. yoelii* XL.

Houve uma etapa de bloqueio com leite a 4% e os soros usados na incubação foram de animais imunizados diluídos 1-1000 e os anticorpos secundários foram anti-camundongo 1-2000. Na legenda vemos os grupos analisados imunizados com proteolipossomos mais lipídio A (Proteo+LipA) e somente imunizados com proteolipossomos (proteo). Na lateral direita a marcação relativa a cada peso definido pelo padrão molecular. Os soros negativos não demonstraram nenhuma reatividade.

Figura 27 - Western Blot contra merozoítos de *P. berghei* NK65.

Houve uma etapa de bloqueio com leite a 4% e os soros usados na incubação foram de animais imunizados diluídos 1-1000 e os anticorpos secundários foram anti-camundongos 1-2000. Na legenda vemos os fundos genéticos analisados e o tratamento recebido por cada grupo, seno o tratamento definido como Proteo+ Alum para os que receberam proteolipossomos mais Alum e Proteo para animais imunizados samente com proteolipossomos. Na lateral direita a marcação relativa a cada peso definido pelo padrão molecular.

Em todos os casos, independente do fundo genético, foi possível observar intenso reconhecimento de bandas e confirmando dados anteriores é possível observar em *P. falciparum* e *P. yoelii* reconhecimento característico de bandas na altura de 19 kDa o que sugere reconhecimento de MSP1₁₉. Sempre múltiplas bandas são reconhecidas no Western, o que demonstra a capacidade pluripotente dos proteolipossomos vacinais em gerar amplo espectro de anticorpos em modelos vacinais.

4.7 Propriedades dos anticorpos analisados

De posse da certeza de termos gerado anticorpos contra merozoítos de cada cepa testada, decidimos caracterizar a proteção gerada por esses anticorpos. Uma das nossas premissas iniciais seria a capacidade de gerar anticorpos anti-sintomas que levassem a diminuição de células imunológicas ativadas e diminuição de níveis de TNF- α por essas células. Utilizando ensaios

de toxicidade descritos na literatura descritos em relação a estímulos dos domínios GPI decidimos testar a capacidade dos soros pós-imunização de inibir tanto a ativação de células RAW e conseqüente liberação de TNF- α por essas células.

Células RAW fazem parte de uma linhagem imortalizada do sistema imune que compõe as células mononucleares. Essas células quando ativadas por estímulos imunológicos como PAMPs(Pathogen-associated molecular patterns são moléculas existentes em bactérias e vírus que estimulam a resposta inflamatória após serem identificadas como não sendo do próprio organismo que os reconheceu) diferenciam-se em células similares a macrófago e secretam TNF- α de forma marcante. Se nossa premissa está bem fundamentada os anticorpos após a imunização com proteolipossomos seria capaz de inibir o estímulo e conseqüente liberação de TNF- α . Utilizando o sistema descrito no material e métodos desse trabalho comparamos a capacidade inibitória de ativação dos anticorpos provenientes de animais Balb/C. Essa capacidade inibitória foi expressa na quantidade de células que não apresentaram em sua superfície receptores imunológicos associado a ativação de macrófagos e na quantidade de TNF- α liberado. O receptor escolhido foi uma molécula coestimulatória CD86, essa molécula mostra-se importante na ativação de outras células do arco adaptativo do sistema imune e aumenta após ativação de células apresentadoras de antígeno (63).

Uma vez que esses ensaios foram feitos em citometria de fluxo, decidimos colocar a media de fluorescência (MFI) que pode evidenciar o padrão de intensidade dessas moléculas na superfície dessas células e finalmente relacionamos essa capacidade inibitória de liberar TNF- α em porcentagens que possam indicar como esse efeito poderia funcionar *in vivo*. As FIG.28,FIG.30 e FIG.31 demonstram os parâmetros de citometria que revelam os controles positivos, negativos e de ensaios das células sob análise (histograma representativo dos experimentos).

A figura FIG.29 demonstra a liberação dose resposta de TNF- α por células RAW estimuladas com extratos de esquizontes sonificados.

Figura 28 - Citometria de células RAW.

Representação em *Side Scatter* e *Forward Scatter* dos parâmetros utilizados e o *gate* feito para análise de células RAW.

Figura 29 - Ensaio de liberação de TNF- α em dose/resposta por estímulos de esquizontes sonicados.

Ensaio de liberação de TNF- α por Células RAW

O ensaio foi feito com 1×10^4 células RAW (qual RAW, você tem duas diferentes) por poço estimuladas com a diferentes quantidades de esquizontes por poço, o experimento foi feito em duplicata. (Correlação de Pearson, $r^2 = 0,9022$)

Figura 30 - Estimulo de células RAW por Extratos de Esquizontes de *P.falciparum*.

Em A segue o histograma de células RAW estimuladas (N=10, feito em dois experimentos, medidos em duplicata) com extrato de esquizontes sonicados (O equivalente a $2,5 \times 10^6$ esquizontes por 1×10^4 células RAW por poço, linha rouxa) e células sem estímulo em cultura (1×10^4 células RAW por poço, linha vermelha). Em B temos o mesmo ensaio, mas feito com LPS purificado (1×10^4 células RAW por poço estimuladas com 10000ng de LPS por poço).

Figura 31- Efeito protetor dos anticorpos pré-imunização e pós-estimulação.

Histograma representativo da sobreposição de histogramas de células estimuladas com $2,5 \times 10^6$ esquizontes sonicados (N=5, feito em dois experimentos, medidos em duplicata) somados a incubação de soro pré-imunização (lixo rouxa vazia) e pós-imunização (linha vermelha cheia).

Figura 32- Porcentagem de células RAW ativadas sob diferentes tratamentos e média de fluorescência.

Em A temos a porcentagem de células ativadas após adição de extrato de esquizontes, foi considerada ativada toda a célula que passou do limite determinado pelo grupo controle(sem estímulo) em relação a sua fluorescência para a expressão de CD86. (Estatística teste T pareado, $n=5$ repetido em dois experimentos e medidos em duplicata. $**=0,007$, $***=0,0008$).

Figura 33- Redução em da produção de TNF- α por ação de anticorpos.

Dados medidos por ELISA de captura, advindos do sobrenadante de cultura de células RAW ativadas com extratos de esquizontes e tratados ou não com soro imune. ($N=5$, feito em dois experimentos com medidas em duplicatas. Teste estatístico T pareado $**=0,006$)

Figura 34- Ensaio de valor inibitório na liberação de TNF- α por ação de anticorpos.

Ensaio de inibição da liberação de TNF- α por anticorpos

Grupos imunizados com Proteolipossomos de 3D7

O gráfico acima resume as capacidades inibitórias na produção de TNF- α por ação de anticorpos gerados após imunização de animais com proteolipossomos.

Os dados apresentados apontam para uma intensa capacidade inibitória nos anticorpos gerados em animais Balb/C no que diz respeito à ativação exacerbada de células RAW, derivados de macrófagos. Notavelmente o extrato de esquizonte foi altamente capaz de ativar células imunes em comparação com LPS, isso demonstra que a capacidade de estímulo desses extratos é muito alta e pode desempenhar papel decisivo nos efeitos e sintomas característicos da malária.

4.8 Capacidade inibitória de reinvasão *in vitro* de anticorpos obtidos por imunizações com proteolipossomos

Sabemos até esse ponto que anticorpos feitos a partir de proteolipossomos são capazes de inibir a liberação de TNF- α , mas teriam esses anticorpos capacidade protetora e inibitória na reinvasão *in vitro*? Para respondermos essa questão utilizamos 2,5 μ g/ml de anticorpos contidos em soro de cada animal em ensaios de inibição de reinvasão *in vitro*. Essa concentração de anticorpos corresponde a 5% do volume de cultura utilizado nos ensaios (ensaios do mesmo tipo são feitos a rigor com 10% do volume de cultura(64)).

Nesse caso pudemos observar que o soro de animais do tipo Balb/C teve alta capacidade inibitória (aproximadamente 75% após 48 horas) enquanto o soro proveniente de animais C57BL/6 não teve nenhuma

capacidade inibitória e em alguns casos ate ampliou a reinvasão *in vitro*, mesmo quando colocada em concentrações 5 vezes maiores do que a usada nos ensaios com soro obtido de animais Balb/C (dado não mostrado). Isso demonstra que alguma característica dentre esses anticorpos deve ser muito diferente e tal fato não pode ser atribuído ao título de anticorpos, uma vez que a titulação desses soros revelou limites de detecções muito similares.

A FIG.35 revela os valores obtidos para os dois fundos genéticos em relação as suas capacidades de inibição de reinvasão *in vitro*, entre o período de 24 horas e 48 horas.

Figura 35- Inibição de reinvasão dos soros pós-imune contra *P.falciparum*.

A barra em azul demonstra a capacidade de inibição de reinvasão após 24 horas e a barra verde a capacidade de inibição do soro analisado após 48 horas. Todas as amostras foram analisadas sob as mesmas condições de 2,5µg/ml e todas as porcentagens foram analisadas em relação ao grupo controle (soro pré-imune). (N=5 em dois experimentos ,medidos em duplicata)

4.9 Sorotipagem de anticorpos contra MSP1₁₉ de *P.falciparum*.

Nosso desenho experimental visou gerar anticorpos que pudessem inibir tanto a reinvasão *in vitro* quanto diminuir sensivelmente os níveis de TNF-α circulantes. Encontramos dados conflitantes em relação aos soros gerados no que diz respeito à reinvasão, o que sugere uma diferença nos anticorpos gerados. Uma das possíveis explicações para esses dados seriam a existências de anticorpos associados a respostas Th1 e Th2. Enquanto a

primeira vertente imunológica (Th2) produz anticorpos de característica neutralizante e de baixa afinidade a receptores presentes em células do sistema fagocítico (como neutrófilos e macrófagos) a segunda vertente trabalha em associação a neutrófilos e macrófagos para exercer sua função protetora (Th1).

Ambos os fundos genéticos de Balb/c e C57BL/6 estão fortemente associados a esse tipo de resposta polarizada. Em função disso, analisamos os anticorpos gerados em cada cepa e obtivemos forte polarização Th2 em Balb/C onde basicamente o único tipo de anticorpo gerado pertencia a subclasse IgG1 associada a anticorpos neutralizantes e do arco imune Th2. Em animais C57BL/6 pudemos observar um misto de anticorpos com uma leve prevalência das subclasses IgG2b e IgG2c sendo ambos associados a respostas mediadas por células e do arco Th1.

Em síntese, os anticorpos do tipo IgG1 teriam capacidade de gerar seus efeitos neutralizantes e antiparasitários sem nenhuma assistência de respostas celulares mediadas por neutrófilos e macrófagos, já anticorpos do tipo IgG2b e IgG2c precisam de respostas mediadas por essas células para efetivamente efetuarem o *clearance* dos parasitas. Em concordância com essa hipótese, animais C57BL/6 imunizados com proteolipossomos de *P. berghei* puderam efetivamente desempenhar controle parasitológico quando desafiados com *P. berghei* NK65, e em estudo similar apresentaram fenotipagem de anticorpos similares(FIG.45) aos encontrados em animais C57BL/6 imunizados com proteolipossomos de *P.falciparum* . Desse modo acreditamos que mesmo que não tenha desempenhado efeitos na reinvasão os anticorpos produzidos pela imunização com proteolipossomos de *P.falciparum* sejam eficientes no controle parasitário se associados com outras células imunes.

As FIG.36 e Fig.37 demonstram o fenótipo conseguido para cada uma das linhagens imunizadas. Cabe aqui ressaltar que o arco Th2 tanto em Balb/C quanto em C57BL/6 é em geral descrito pela presença de anticorpos IgG1, e que o arco Th2 é em geral descrito em Balb/C por IgG2a(não presente na linhagem C57BL/C pois possui deleção desse gene) e IgG2b e em animais C57BL/6 é em geral descrito pelas subclasses IgG2b e IgG2c(não presente em animais Balb/C).

Figura 36- Sorotipagem das subclasses de IgG presentes em animais Balb/C.

A sorotipagem foi feita por ELISA com placa sensibilizada com antígenos recombinantes para MSP1₁₉ de *P.falciparum*. Os soros foram diluídos em três diluições crescentes (1:300, 1:600 e 1:1200) e revelados com anticorpos monoclonais peroxidase conjugados, específicos para cada cadeia pesada referente às subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Os anticorpos secundários foram utilizados todos na mesma diluição de 1:2000 e os dados são a representação da média de densidade ótica do grupo de soros analisados (N=5) com seus respectivos desvios padrões.

Figura 37- Sorotipagem das subclasses de IgG presentes em animais C57BL/6.

A sorotipagem foi feita por Elisa com placa sensibilizada com antígenos recombinantes para MSP1₁₉ de *P.falciparum*. Os soros foram diluídos em três diluições crescentes (1:300, 1:600 e 1:1200) e revelados com anticorpos monoclonais peroxidase conjugados, específicos para cada cadeia pesada referente às subclasses IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3. Os anticorpos secundários foram utilizados todos na mesma diluição de 1:2000 e os dados são a representação da média de densidade ótica do grupo de soros analisados (N=5) com seus respectivos desvios padrões.

4.10 Desafios *in vivo* para validação do sistema em modelos de infecção *in vivo* com o parasita *P. berghei* NK65

Após os altos títulos de anticorpos desenvolvidos contra extrato do parasita e também uma proteína relevante para vacina por um lado e uma alta taxa de inibição da reinvasão *in vitro* por outro lado, decidimos imunizar duas linhagens distintas C57BL/6 e Balb/C com proteolipossomos e desafiá-las com a cepa *P. berghei* NK65. Dessa forma poderíamos analisar se existe algum caráter protetor *in vivo* nessas linhagens. Após desafio conduzido como descrito, observamos as seguintes curvas de sobrevida FIG.40.

Figura 38- Curvas de parasitemia desenvolvidas pelo fundo C57BL/6.

O gráfico demonstra as curvas de parasitemia desenvolvida por cada tipo de tratamento, sendo que camundongos controle (n=10, linha negra) receberam lipossomos +Alum, o grupo tratado com proteolipossomos (linha vermelha) foi imunizado com proteolipossomos de *P. berghei* NK65 e o grupo Proteolipossomos + Alum (linha azul) foi imunizado com proteolipossomos do lado esquerdo do peritoneo e Alum do lado direito simultaneamente. As linhas cinza claro e cinza escuro representam animais dos grupos que receberam os tratamentos proteolipossomos e proteolipossomos + Alum e desenvolveram somente parasitemias subpatentes. As setas indicam ponto de inflexões na curva onde aparentemente o controle parasitário é completamente perdido. Os animais sofreram um único critério de exclusão, quando não foi possível observar parasitas no sangue após os desafios os animais foram excluídos das análises. O símbolo # significa diferença ($p < 0.05$) entre o grupo controle o grupo que recebeu Proteolipossomos +ALum e * significa diferença ($p < 0.05$) entre o grupo controle o grupo que recebeu Proteolipossomos. Não houve diferença entre os grupos tratados no que diz respeito ao controle das parasitemias o teste estatístico aplicado foi ANOVA dois fatores com n=10 por grupo e feito em dois experimentos independentes.

Figura 39- Curvas de parasitemia desenvolvidas pelo fundo Balb/C.

O gráfico demonstra as curvas de parasitemia desenvolvida por cada tipo de tratamento, a saber, controle (linha negra) recebeu lipossomos +Alum, o grupo tratado com proteolipossomos (linha azul claro) foi imunizado com proteolipossomos de *P. berghei* NK65 e o grupo Proteolipossomos + Alum (linha azul escuro) foi imunizado com proteolipossomos do lado esquerdo do peritônio e Alum do lado direito simultaneamente. Os animais sofreram um único critério de exclusão, quando não foi possível observar parasitas no sangue após os desafios os animais foram excluídos das análises. Não houve qualquer diferença estatística entre os animais analisados. O teste usado foi ANOVA dois fatores, n=8 para Balb/C controle, n=5 Balb/C tratados com proteolipossomos, n=8 para Balb/C tratados com Alum+Proteolipossomos, feito em dois experimentos independentes.

Nossos dados apontam fatos interessantes. Embora tenha sido relatado na literatura que a cepa *P. berghei* é capaz de evadir qualquer resposta imune contra as proteínas MSP1₁₉ e AMA (65), fica claro através das imunizações em fundo C57BL/6 que a imunização com proteínas GPI ancoradas em proteolipossomos pôde promover controle parasitológico nos desafios. Entretanto, este efeito se mostra somente nos momentos iniciais em função da morte de animais no decorrer da infecção. Após as mortes, é impossível prosseguir com os testes estatísticos adequados. Mesmo assim, podemos observar um controle da parasitemia tanto de animais imunizados com proteolipossomos e proteolipossomos + Alum, e parece que a adição de Alum paralela a imunização de proteolipossomos promoveu uma maior capacidade de resistência aos animais. Curiosamente, animais Balb/C que tiveram títulos de anticorpos similares ao fundo genético C57BL/6, não foram capazes de

nenhum controle parasitológico, reforçando que o desenvolvimento imune do hospedeiro é tão importante quanto a eficácia das imunizações.

A partir da FIG.38 pode-se observar que no fundo C57BL/6 os animais sofrem uma inversão no controle das parasitemias após aproximadamente 15 dias para animais imunizados com proteolipossomos e 25 dias para animais imunizados junto de Alum (representados no gráfico por duas setas). Essa inversão eleva a parasitemia dos animais a níveis maiores do que seus respectivos controles e demonstram que extensiva resposta imunológica parece ser perdida em pontos diferentes para os grupos, uma vez que Alum foi a única diferença incluída. Isso indica que o atraso nessa inversão de controle é a ele creditada. Outros animais, no entanto apresentaram parasitas no sangue porém não desenvolveram parasitemia a níveis notáveis (parasitemia sub-patente). Esses animais controlaram de forma eficiente a parasitemia e sobreviveram ao desafio sem desenvolver extensas parasitemias. Isso é algo digno de nota, uma vez que o desafio de animais com *P. berghei* invariavelmente gera a morte dos mesmos. A imunidade que permite a sobrevivência de animais é apenas encontrada nesse modelo após infecções naturais tratadas com antimaláricos, e a sobrevivência de animais desafiados com essa cepa em modelos vacinais nunca havia sido vista antes. Cabe ressaltar que os experimentos foram reprodutíveis em dois experimentos distintos.

As curvas de sobrevida dos grupos não revelaram nenhum dado estatisticamente relevante, o que aponta para o fato de que embora as imunizações tenham promovido a sobrevida de pouco animais C57BL/6 tal fato não é determinante quando olhamos a infecção imposta pela espécie *P. berghei*. Isso demonstra que embora a imunização com proteolipossomos possa promover controle parasitológico ela per si não é capaz de alterar o decurso final da doença em uma porcentagem significativa dos animais analisados. Não houve também qualquer diferença entre a sobrevida dos fundos genéticos quando comparados entre si, o que demonstra que controlar a parasitemia por meios imunológicos é uma vantagem limitada, que não muda o destino final da infecção independente do tipo genético analisado.

Figura 40- Sobrevida de camundongos Balb/C após desafio com *P. berghei* NK65.

Em A temos a sobrevida referente a todos os grupos usados nos experimentos desafiados com *P. berghei* NK65, com o fundo genético discriminado na lateral direita. Em B temos os grupos tratados referentes ao fundo genético C57BL/6, sendo que 11% dos animais imunizados obtiveram sobrevida e 20% dos animais tratados com proteolipossomo + Alum também sobreviveram. Em C temos as curvas relativas ao fundo genético Balb/C. As médias de sobrevida aparecem na frente de cada grupo apresentado. (n=10 para grupos controles de C57BL/6, n=9 para C57BL/6 tratados com proteolipossomos, n=10 para C57BL/6 tratados com Alum+Proteolipossomos, n=8 para Balb/C controle, n=5 Balb/C tratados com proteolipossomos, n=8 para Balb/C tratados com Alum+Proteolipossomos)

Visando saber se efeito sobre a sobrevida é restrito a espécie *P. berghei* testamos o mesmo método vacinal num outro modelo murino de infecção letal. Utilizando a cepa *P. yoelii* XL em camundongos Balb/C, testamos o efeito da imunização com proteolipossomos.

4.11 Desafios in vivo para validação do sistema em modelos de infecção in vivo com o parasita *P. yoelii* XL

Visando dados que pudessem fornecer evidências sobre a sobrevida de animais desafiados com o gênero *Plasmodium* decidimos utilizar o modelo que aparentemente desenvolveu a resposta menos eficiente quando imunizados com proteolipossomos (fundo Balb/C que não pode controlar a parasitemia quando desafiado com *P. berghei*).

Uma vez que o fundo genético C57BL/C teve maior controle parasitário quando desafiado com *P. berghei* e creditando esse fenômeno a um possível viés do arco imunológico Th1 decidimos usar nos experimentos com *P. yoelii* um adjuvante que pudesse direcionar a resposta imune para esse arco imune. Desse modo, usamos um grupo adicional que recebeu junto de proteolipossomos vacinais moléculas e Lipídeo A (uma molécula derivada de LPS de bactérias sem domínio tóxico descrita como um adjuvante que aumenta a resposta imune do arco Th1). Os dados anteriormente mostrados em relação a anticorpos são oriundos desses grupos analisados.

Como podemos ver em FIG.41 e FIG.42 tanto a sobrevida quando o controle parasitológico sobre a espécie *P. yoelii* foi possível quando imunizados com proteolipossomos. Curiosamente, os grupos imunizados com proteolipossomos e Lipídeo A responderam tão fortemente a múltiplas proteínas presentes nos proteolipossomos, que quando desafiado, tiveram nesse grupo animais morrendo em decorrência de uma forte resposta imune.

Figura 41- Curvas de parasitemia nos desafios com *P. yoelii*.

Em A temos as curvas de parasitemia individualmente colocadas do grupo controle, em B temos os grupos de animais imunizados com proteolipossomos e em C animais imunizados com proteolipossomos e 25ng por animal de lipídeo A . O símbolo de tóxico(caveira com ossos) significa a morte de animais nos grupos experimentais. O experimento foi conduzido em duplicata, em animais Balb/C.

Figura 42- Sobrevida de animais vacinados com proteolipossomos de *P. yoelii*.

O gráfico mostra a sobrevida dos grupos desafiados com *P. yoelii*, a frente de cada grupo aparem as porcentagens finais de animais sobreviventes. A estatística foi análise de sobrevida não paramétrica com N=5 em cada grupo, o símbolo ** significa $p < 0,002$.

De posse desses dados fica claro a possibilidade do sistema vacinal ser aplicados a modelos em malária e produzirem respostas imunológicas no controle parasitológico e de sobrevida extremamente notáveis, outro ponto a ressaltar é que a ineficácia do fundo Balb/C em controlar a parasitemia quando desafiado com *P. berghei* está mais associado a cepa usada do que ao fundo genético usado, isso fica claro quando usado outra cepa nos desafios.

A fim de elucidar quais fatores imunológicos caracterizam os dois modelos que poderiam elucidar os efeitos observados, medimos as subclasses de anticorpos gerados por cada modelo após as imunizações e quando possível após transcorrido um tempo de desafio.

4.12 Sorotipagem dos anticorpos produzidos por cada método de imunização em modelo de infecção murino

Com a intenção de entender o porquê as respostas contra diferentes infecções é tão divergente entre fundos genéticos e ainda caracterizar se a adição de adjuvantes a imunizações poderia direcionar o perfil imunológico gerado, testamos os fenótipos de cada IgG gerada após as imunizações com proteolipossomos de *P. berghei* e *P. yoelii*. Foi possível nos animais que foram desafiados com *P. berghei* NK65 examinar o mesmo perfil após 15 dias transcorridos o desafio com a espécie *P. berghei* NK65.

As Figs. 43, 44 e 45 demonstram o perfil de anticorpos gerados por animais imunizados com proteolipossomos de *P. yoelii* e *P. berghei*.

Figura 43- Sorotipagem das subclasses de IgG presentes em animais Balb/C imunizados com proteolipossomos de *P. yoelii*.

A sorotipagem foi feita por Elisa com placa sensibilizada com antígenos recombinantes para MSP1₁₉ de *P. yoelii*. Os soros foram diluídos em três diluição crescentes (1:300, 1:600 e 1:1200) e revelados com anticorpos monoclonais peroxidase conjugados, específicos para cada cadeia pesada referente as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Os anticorpos secundários foram utilizados todos na mesma diluição de 1:2000 e os dados são a representação da média de densidade ótica do grupo de soros analisados (N=5) com seus respectivos desvios padrões.

Nossos dados apontam que a imunização com proteolipossomos de *P. yoelii* é capaz de gerar uma resposta mista com leve desequilíbrio pro arco Th1.

Figura 44- Sorotipagem das subclasses de IgG presentes em animais Balb/C imunizados com proteolipossomos de *P. berghei*.

A sorotipagem foi feita por Elisa com placa sensibilizada com extratos de merozoítos de *P. berghei* NK65. Os soros foram diluídos em três diluição crescentes (1:300, 1:600 e 1:1200) e revelados com anticorpos monoclonais peroxidase conjugados, específicos para cada cadeia pesada referente às subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Os anticorpos secundários foram utilizados todos na mesma diluição de 1:2000 e os dados são a representação da média de densidade ótica do grupo de soros analisados (N=7) com seus respectivos desvios padrões.

Figura 45- Sorotipagem das subclasses de IgG presentes em animais C57BL/6.

A sorotipagem foi feita por Elisa com placa sensibilizada com extratos de merozoítos de *P. berghei* NK65. Os soros foram diluídos em três diluição crescentes (1:300, 1:600 e 1:1200) e revelados com anticorpos monoclonais peroxidase conjugados, específicos para cada cadeia pesada referente às subclasses IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3. Os anticorpos secundários foram utilizados todos na mesma diluição de 1:2000 e os dados são a representação da média de densidade ótica do grupo de soros analisados (N=10) com seus respectivos desvios padrões.

Em relação às imunizações com *P. berghei*, notamos que os antígenos associados aos proteolipossomos têm característica similares, no que diz respeito a títulos de anticorpos, aos expressos por *P. yoelii*. O perfil de subclasses é similar quando olhamos para animais imunizados somente com proteolipossomos. No decurso da infecção (15 dias após o desafio), no entanto os isotipos parecem sofrer um rumo diferente que coincide com um aumento considerável de IgG3 sobre as outras subclasses. Levando em conta que os animais foram incapazes de controlar a parasitemia, pode-se especular que esse aumento não mostra-se benéfico ao animal infectado. A subclasse IgG3 tende a aumentar ainda mais quando proteolipossomos foram administrados na presença de Alum, sugerindo que um direcionamento nessa resposta imune (Th2) pelo fundo genético e exacerbado por um adjuvante que aumente ainda mais respostas imunes do tipo Th2 seja um fator que corrobore para o crescimento dessa subclasse.

Já animais que tenham forte fundo genético associado a respostas do tipo Th1 frente à imunização com proteolipossomos de *P. berghei* desenvolveram um aumento claro de IgG2b e 15 dias depois do desafio essa diferença entre IgG2b para as outras subclasses parece ser ainda mais notável. Em sincronia com nossos argumentos a adição de Alum na administração dos proteolipossomos diminuiu esse efeito mas não aboliu por completo a resposta mediada por Ig2b embora os dados percam sua inferência estatística. A FIG.46 abaixo resume esses dados, os índices apresentados são uma simples divisão das densidades óticas obtidas em cada diluição e cada animal em pareamento a razão da esquerda foi feita em relação as duas subclasses mais abundantes em densidades óticas IgG3/IgG2a. (mover para o texto- O valor dessa comparação permite polarizar os dados em função de anticorpos que fixem complemento e resposta mediada pro células do tipo Th1 para animais Balb/C). A razão da direita conta com o mesmo procedimento, porém no grupo de animais C57BL/6 as IgGs preponderantes foram outras IgG2b/IgG. O valor dessa comparação permite polarizar os dados em função de fundos genéticos Th1/Th2 para animais C57BL/6.

Figura 46- Crescimento das IgGs preponderantes no decorrer da infecção em animais imunizados por proteolipossomos de *P. berghei*.

Os testes estatísticos contam com n=10 feitos em dois experimentos independentes e o teste usado foi teste T pareado, não paramétrico Mann-Whitney. Os símbolos *** significam $P < 0.0005$ e ** $P < 0,005$.

Nossos dados apontam que resposta principalmente mediada por IgG3 responsável pela fixação do sistema complemento parece influenciar negativamente uma resposta protetora em animais desafiados.

4.13 CBA do soro de Animais após 15 dias de infecção sob diferentes tratamentos.

Seguimos então com a dosagem de interleucina dos soros de animais infectados antes de desafiados e após transcorridos 15 dias de infecção. Esperavamos desse modo observar as citocinas mais importantes no decurso de uma infecção por *P.berghei* e se possível identificar o porquê após 15 dias animais do tipo C57BL/6 parecem perder completamente a capacidade de controlar a infecção por *P.berghei* NK65.

Nossas análises são extensas e por isso aparecem na FIG.47 de maneiras sobrepostas de modo que as linhas vermelhas representam animais C57BL/6 e as linhas negras animais do tipo Balb/C. É possível observar que no grupo controle ou no grupo que recebeu Alum junto de proteolipossomos os níveis de interleucinas dosadas não parece representar nenhuma variação óbvia. No entanto animais imunizados com proteolipossomos tem uma queda quase que total de interleucinas IL-4(principal interleucina do arco Th2) e $\text{Ifn-}\gamma$ (principal interleucina do arco Th1), isso corrobora nossa observação que no exato décimo quinto dia animais desse grupo parecem perder completamente a capacidade de controlar a parasitemia causada por *P.berghei*.

Outro curioso fato é que os níveis de $\text{TNF-}\alpha$ não parecem ter subido acima de níveis anteriores a infecção, animais do grupo controle obtiveram ligeiro aumento, embora não seja conclusivo isso sugere manutenção de níveis de $\text{TNF-}\alpha$ e podem apontar para um controle constante desses níveis enquanto que o grupo controle parece ter os níveis dessa interleucina aumentados.

Outro fato importante é que os níveis de IL-2 parecem manter-se constante em todos os grupos testados, uma vez que IL-2 é importante para expansão de células do tipo Th1 e Th2 sua queda poderia justificar a perda de IL-4 e $\text{IFN-}\gamma$ observados, uma vez que elas mantem-se constantes, esse não é o caso.

FIG.47 mostra o painel integro de interleucinas testados, as FIG.48 e FIG.49 mostram com maior detalhes os pontos ressaltados aqui.

Figura 47- CBA dos soros pré e 15 dias após infecção.

As linhas vermelhas representam os pontos pareados do dia zero da infecção (D0) e o dia 15 (D15) para os animais C57BL/6. As linhas negras representam os pontos pareados do dia zero da infecção (D0) e o dia 15 (D15) para os animais Balb/C. A primeira coluna refere-se aos grupos controles de ambos os fundos genéticos, a segunda coluna refere-se a os grupos tratados com proteolipossomos e a terceira coluna refere-se a animais tratados com proteolipossomos + Alum. Os testes aplicados foram testes T pareados com p sendo apresentado na cor do fundo genético retratado. As interleucinas são apresentadas na ordem : IL-2, TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-17. Os N variam de 9-7 para os grupos no dia 0 e 8-5 para o dia 15 (n=8 D0 controle C57BL/6, n=7 D15 controle C57BL/6, N=6 D0 C57BL/6 proteolipossomos, n=5 D15 C57BL/C proteolipossomo, n=10 para P+A C57BL/6 D0 e n=7 para P+A C57BL/6 D15, n=8 D0 Balb/C controle, n=7 Balb/C controle d15, N=6 proteolipossomo Balb/c D15, n=6 Proteolipossomo Balb/C D0, n=6 proteolipossomo Balb/C D15, n=6 P+A Balb/C D0, n=8 P+A Balb/C D15).

Figura 48- Detalhe das tendências de IL-2, TNF- α , IL-4 e IFN- γ .

Os dados aqui representados estão em maior detalhe para verificação da tendência de cada grupo em relação a interleucina de cada grupo discutido com maior detalhe.

Figura 49- Tnf- α no grupo controle.

Níveis de TNF- α elevam-se nos grupos tratados com lipossomos +Alum demonstrando uma tendência ao crescimento em relação aos grupos tratados com proteolipossomos. . Os testes aplicados foram testes T pareados com p sendo apresentado na cor do fundo genético retratado. Os N variam de 8 para os grupos no dia 0 e 7 para o dia 15.

4.14 Estabilidade de proteolipossomos após liofilização.

Finalmente testamos a possibilidade de proteolipossomos serem estáveis após liofilização. Esses dados seriam importantes pois demonstrariam que sua estocagem poderia ser facilitada para uso em locais com baixa infraestrutura que necessitassem desse tipo de vacina. A Tab. 2 demonstra os dados obtidos no tamanho e polidispersão das partículas antes da liofilização e após serem reidratadas. Esse experimento é preliminar (n=2) e contou com proteolipossomos de *P.yoelii*.

Após liofilização a polidispersidade das partículas assume valores máximos o que implica numa população muito heterogênea entre si, porém o tamanho dessas partículas permanece adequado para os propósitos de imunização. Não sabemos no entanto se a viabilidade de antígenos induzirem resposta imune após imunização é mantida, experimentos nessa linha não foram conduzidos.

Tabela 2- Recuperação de tamanho e dispersidade após liofilização de proteolipossomos.

Tamanho do Proteolipossomo antes da liofilização.	Tamanho do Proteolipossomo após a liofilização.	Polidispersidade antes da liofilização.	Polidispersidade após a liofilização.
233,6+/-104,08	122,5+/-16,263	0,645+/-0,049	1

Tabela mostrando as medias e os desvios padrões de cada formulação antes e após liofilização.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho buscamos transferir antígenos da forma merozoita de diferentes espécies de *Plasmodium* para lipossomos para fim de gerar tanto uma resposta "anti-sintomas" quanto antiparasitária. Nossos dados evidenciam que a extração de formas merozoíticas de *Plasmodium* é possível tanto em cepas humanas quanto murinas e a separação de proteínas GPI ancoradas mostrou-se viável nos dois modelos de infecção (que afetem humanos e roedores). Assim, a técnica de formulação em proteolipossomos foi expandida de *Leishmania* (53, 66) para um outro protozoário importante.

Avaliamos que a reprodutibilidade desse sistema (extração de proteínas GPI ancoradas e associação com nanopartículas lipossomais) em diferentes modelos demonstra uma grande versatilidade dentro do gênero *Plasmodium*, com potencial de ser reproduzida em qualquer cepa que infecte humanos no globo terrestre. Vários autores demonstraram que variações em alelos de proteínas com potencial vacinal, incluindo proteínas GPI ancoradas no merozoita (como MSP1₁₉ de *P.falciparum*) em isolados de diversas regiões contribuem para perpetuação de infecções do gênero *Plasmodium* (67, 68). Se fosse possível obter suficiente matéria prima (merozoítas de cepas locais), é razoável supor que o mesmo sistema possa ser aplicado para isolados de diversas regiões do mundo. Se o sucesso obtido no âmbito murino pudesse ser repetido em seres humanos, esse sistema poderia ser aplicado a cepas distintas, gerando possíveis vacinas que contemplam a variabilidade gênica de parasitas por conterem epitopos ligados a cepas de regiões geográficas distintas. Essa seria uma aplicação desse sistema, que visaria gerar um sistema vacinal com forte especificidade contra parasitas que se utilizem desse mecanismo de escape imune.

Dentro das características de sistemas biomiméticos pudemos também caracterizar dados de extrema importância relacionados a respostas imunológicas. As formulações criadas nesse projeto demonstram ter tamanhos medianos na escala de 200 nanômetros. Esse é o tamanho máximo de partículas lipossomais que podem ser drenadas pelo sistema linfático e posteriormente atingem órgãos imunes secundários como linfonodos (revisado em (69)). Logo o sistema apresentado nesse projeto pode atingir esses órgãos e outros trabalhos tem demonstrado a correlação de altos títulos humorais com

a característica dessas partículas acumulem-se tardiamente em linfonodos (37). Seguindo essa linha de raciocínio decidimos verificar o tipo e magnitude de respostas imunes geradas por essas partículas dentro de contextos genéticos distintos em relação ao hospedeiro imunizado.

Animais imunizados com proteolipossomos de *P.falciparum* demonstraram diferentes respostas a esses antígenos. Ambos demonstraram robusta geração de anticorpos contra proteínas sabidamente contidas em merozoítas e consideradas por alguns de protetoras como MSP1₁₉ (Títulos em ordens de 10⁵ e 10⁶ para fundos C57BL/6 e Balb/C, respectivamente), e ambos foram capazes de reconhecer as formas infectivas (merozoítos livres) bem como múltiplos antígenos em extratos de merozoítos. Estes títulos são bastante altos considerando que a quantidade absoluta de MSP1₁₉ nos proteolipossomos deve ser pequena. Em comparação, estudos imunizando com vacinas DNA ou vacinas recombinantes alcançaram títulos menores ou equivalentes (48, 70). Em se tratando de capacidade no controle da parasitemia, ambos os fundos tiveram desempenhos distintos. Animais Balb/C conseguiram gerar anticorpos com notável característica inibitória, já os soros de animais C57BL/6 não desenvolveram nenhuma capacidade de neutralizar a reinvasão de parasitas *in vitro*. Afim de elucidar essa diferença seguimos com a fenotipagem dos anticorpos gerados especificamente contra MSP1₁₉ de *P.falciparum*, e encontramos uma resposta extremamente polarizada em animais Balb/C para anticorpos neutralizantes do tipo IgG1 que relaciona-se fortemente com respostas imunes do arco Th2. Este dado é condizente com a literatura onde animais desse fundo genético geram respostas polarizadas desse tipo (71, 72). Já animais C57BL/6 geraram isotipos mistos com leve predominância do tipo IgG2b e IgG2c ligadas a respostas do arco imunológico Th1, dado também condizente com o esperado (73-75). Uma vez que isotipos de IgG1 tem menor afinidade por receptores que ligam-se a cadeias pesadas dos anticorpos e promovem fagocitose, FcγR (sendo sua ligação restrita a receptores do tipo FcγRIII e FcγRII), ligados ao sistema de fagocitose celular, sua ação antiparasitária é menos dependente da presença de receptores de fagocitose (76-78). No caso de anticorpos IgG2b e IgG2c que tem alta afinidade por receptores FC (de vários tipos diferentes FcγRI, FcγRII, FcγRIII e

FcγRIV) a ação de células do sistema fagocitário é indispensável para sua efetividade e possível severidade em sintomas diversos (77, 78), essa relação explica inclusive por que existe grande dispersão de resultados quando soros de pacientes são analisados em estudos do gênero (32). Desse modo a conclusão mais contundente é a de que embora sistemas vacinais com proteolipossomos tenham altas capacidades de estimular o sistema imune humoral, sua capacidade e desdobramento frente a infecções são fortemente ligados ao fundo genético dos hospedeiros, com potencial interferência de respostas imunes prévias do hospedeiro. Poucos estudos vacinais com sistemas lipossomais, têm sido feitos a fim de integrar dados experimentais com fundos genéticos e malária.

Nosso modelo prevê a geração de múltiplas respostas frente a antígenos diferentes. Nossos dados de western blot suportam essa teoria, e a geração de uma quantidade menor, porém existente, contra antígenos recombinantes de MSP2 de *P.falciparum* demonstraram que essa possibilidade pode existir em imunizações que utilizem a estratégia de proteolipossomos como veículo vacinal. Ainda dentro do nosso modelo proposto, utilizamos antígenos do tipo GPI ancorados que se relacionam com a evolução, em geral, para malária grave (23). Respostas humorais contra o domínio GPI são associadas com benefício em relação a síndromes severas (23), bem como com a diminuição de TNF- α (30). Buscamos então se nosso modelo poderia simular efeitos vistos em pacientes acometidos pela doença, que em síntese seriam a geração de anticorpos eficientes em diminuir a liberação de TNF- α . Utilizando um sistema usado em estudos do gênero (vide por exemplo (30)), nosso modelo gerou notável diminuição de TNF- α quando células de origem imunológica são estimuladas com extratos de parasitas destruídos. Esse efeito pode ser visto em animais do tipo Balb/C que possuem anticorpos do tipo IgG1 como forma predominante. Embora não tenhamos submetido os anticorpos provenientes de C57BL/6 ao mesmo ensaio acreditamos que dificilmente o efeito se repetiria nesse modelo. As IgGs produzidas por esse modelo tem alta afinidade por receptores FC e a célula utilizada para estudar a liberação de TNF- α possui esses receptores (células RAW). As células RAW foram originalmente imortalizadas a partir de macrófagos e a ligação de anticorpos a receptores

FCs nessas células pode ativar a liberação de IFN- γ e fagocitose com possível liberação de TNF- α (77, 79), tornando o modelo frágil dentro desse viés. Tomados em conjunto, esses dados demonstram que imunizações com proteolipossomos podem ter ainda efeitos secundários no que diz respeito a sintomas da doença e geração de respostas imunológicas contra antígenos secundários.

Buscamos então respostas em sistemas *in vivo* que pudessem gerar mais dados aos nossos estudos. Desse modo e utilizando os mesmos fundo genéticos, decidimos utilizar a cepa *P. berghei* NK65 para averiguar se o sistema baseado em proteolipossomos poderia gerar proteção nessa cepa quando animais forma desafiados *in vivo*. A escolha por essa cepa se baseou na semelhança sintomatológica de cepa similar com síndromes severas em malária humana, tal como malária cerebral (80). Tendo em vista que anticorpos do tipo IgG1 parecem ter sido superiores em ensaios de reinvasão e anti-sintomas *in vitro*, adicionamos um grupo experimental que recebeu também o adjuvante Alum que poderia direcionar as respostas imunológicas para o isotipo IgG1, esse adjuvante é amplamente utilizado na intenção de aumentar respostas imunológicas do tipo Th2 (81).

Assim, observamos que animais imunizados com proteolipossomos de *P. berghei* foram capazes de gerar forte resposta imunológica contra antígenos múltiplos (extratos de merozoitos), porém quase nenhum efeito contra MSP1₁₉ de *P. berghei*, com uma titulação dos soros em média de 10^5 e 10^2 , respectivamente. Dados novamente condizentes com a literatura que tem demonstrado que *P. berghei* parece evadir qualquer resposta imune contra PbMSP1₁₉ e PbAMA 1 (outro candidato vacinal(82)). Quando desafiados, os animais em fundo C57BL/6 foram capazes de controlar o crescimento parasitário e em raros casos suprimir a expansão a níveis subpatentes de infecção.. Embora a sobrevida dos animais seja baixa e somente 10-20% conseguem sobreviver, esses dados são dificilmente vistos em experimentos que não usem modelos de infecções naturais. Mais curioso ainda é que em animais que desenvolveram parasitemias expressivas, existiu controle parasitário que se perdeu em torno do dia 15 após a infecção para animais

imunizados com proteolipossomos e no dia 25 para animais imunizados com proteolipossomos junto de Alum.

Em animais da linhagem Balb/C não houve controle parasitário, embora esses animais respondessem de maneira similar em titulações de anticorpos a linhagem C57BL/6. Nesse contexto decidimos seguir com análises de sorotipagem que revelaram mudanças significativas nos isotipos de anticorpos gerados por cada linhagem. Animais C57BL/6 tiveram antes do desafio isotipos predominantes do tipo IgG2b e IgG2c em detrimento de IgG1. Isso demonstra que embora possa ter ocorrido resposta imunológica mista existiu leve predominância do arco Th1 em relação ao arco Th2 da resposta imunológica. Após 15 dias os índices de respostas de IgG2a/IgG1 aumentam significativamente em animais imunizados com proteolipossomos e desafiados, o mesmo parece ocorrer em animais que receberam Alum, porém e como esperado seus dados foram mais divergentes o que impediu a inferência estatística.

Já em animais Balb/C os isotipos demonstraram panorama distinto. Embora antes do desafio esses animais tivessem predominância de IgG1, o que seria esperado para seu fundo genético em vista de nossos resultados prévios, após 15 dias as imunoglobulinas predominantes tornam-se IgG3. Curiosamente, IgG3 não faz parte dos arcos Th1/Th2, e esse isotipo é encontrado em imunocomplexos, formação de rosetas, tem também baixa afinidade por receptores de fagocitose (FC somente FcRI) e alta capacidade de ativar o sistema complemento (83, 84). Eles são tidos como anticorpos naturais contra LPS e outras toxinas e parecem ser ativados por moléculas tóxicas de maneira independente de respostas imunológicas adaptativas gerando uma ponte entre resposta imunológica inata e adaptativa (83, 85).

Novamente, estes experimentos validados por repetição e com o mesmo resultado.

Tomados em conjunto nossos resultados reforçam que a resposta imunológica contra proteolipossomos é estreitamente conectada ao fundo genético do hospedeiro imunizado. Esses dados também demonstram que frente a uma resposta previa contra múltiplos antígenos GPI ancorados, a infecção com *P. berghei* tende a ser diferente em fundos genéticos distintos.

Notavelmente, em Balb/C, a resposta imunológica pode ser desviada para geração de anticorpos células T independente que reduziriam a toxicidade de complexos bioativos, mas que em contra partida impediriam um controle parasitológico mais efetivo.

Na tentativa de explicar por que animais do tipo C57BL/6 não conseguiram sustentar uma resposta efetiva após 15 dias, decidimos analisar o soro desses animais transcorridos 15 dias de infecção (e em paralelo o soro de animais Balb/C), em relação à interleucinas dos arcos imunes Th1/Th2 e Th17 e a títulos de anticorpos. Embora não tenha sido estatisticamente relevante os anticorpos de animais C57BL/6 parecem diminuir após 15 dias de infecção enquanto que os de animais Balb/C parecem manter-se inalterados. Em relação às interleucinas testadas os soros de todos os grupos parecem ser muito similares, exceto nos animais imunizados com proteolipossomo. Exatamente no período em que animais imunizados com proteolipossomos perdem a capacidade de controlar a parasitemia as interleucinas IL-4 e IFN- γ caem para níveis mínimos, IL-17 parece manter-se inalterada (IL-4, IFN- γ e IL-17 relacionam-se respectivamente a arcos imunológicos de respostas adaptativas do tipo Th2, Th1 e Th17 respectivamente). Isso sugere que a resposta imunológica por células T CD4 (importantes para sustentação de respostas imunológicas) foi diminuída bruscamente por algum mecanismo. Em contrapartida, em animais Balb/C no mesmo período e sobre o mesmo tratamento, as mesmas interleucinas tiveram aumento. Animais C57BL/6 imunizados junto com proteolipossomos e Alum tem respostas similares a animais Balb/C sobre o mesmo tratamento e puderam controlar a parasitemia por um maior período (até 25 dias em média).

Tomados em conjunto esses dados sugerem que Alum administrado em conjunto com proteolipossomos foi importante para evitar o efeito de perda de interleucinas importantes como IL-4 e IFN- γ . E ainda somando-se a isso o fato de que animais Balb/C, que possuem naturalmente fundo genético potencializado para respostas do tipo Th2, terem respondido no mesmo período, com aumento das mesmas interleucinas perdidas pelo fundo genético de animais C57BL/6, temos um panorama que sugere que respostas Th1 são importante no controle parasitológico. Porém, respostas do tipo Th2 podem

ajudar a sustentar respostas efetivas por mais tempo, evitando ao menos temporariamente a diminuição de interleucinas essenciais para proteção do hospedeiro infectado. Nossos dados são suportados pela literatura que recentemente demonstrou capacidade de parasitas do gênero *Plasmodium* exaurirem respostas imunes permitindo assim manutenção sanguínea de formas infectivas do gênero *Plasmodium* (86). Outros dados também fazem a base desse pensamento, e demonstram que respostas do tipo Th1 são importantes no controle parasitário podendo agravar sinais clínicos característicos da doença (87, 88).

Outras explicações, como a queda de IL-2 e conseqüente diminuição de sinais proliferativos para linfócitos (89), aumento de respostas reguladoras por IL-10 (33) ou mesmo queda acentuada de TNF- α (importante na quantidade adequada para sustentar respostas imunológicas (90)) e que poderiam explicar nossos dados não são suportadas pelas evidências de que IL-2, IL-10 e TNF- α permanecem inalterados em todos os grupos.

Uma vez que esses dados são muito importantes para nossa discussão vale ressaltar que todos foram feitos em reprodução de dois experimentos, com replicatas biológicas de número considerável (número variando de 3 a 5 para cada grupo).

Finalmente, ainda centrando em nosso modelo vacinal, decidimos reproduzir um experimento que pudesse avaliar o potencial do nosso modelo contra outro modelo letal de infecção. Nessa linha, decidimos usar o pior contexto experimental demonstrado por nossos dados até o momento. Utilizamos parasitas *P. yoelii* XL que desencadeiam infecções letais, no fundo genético Balb/C que em sincronia com nossos dados foi incapaz de gerar resposta imunológica protetora contra *P. berghei* NK65. Adicionalmente aos proteolipossomos utilizamos outro adjuvante - Lipídeo A - em um terceiro grupo experimental, que poderia ser importante para aumentar a resposta Th1 previamente tida como protetora (41, 88).

Como de costume todos os animais imunizados responderam fortemente contra extratos de merozoítos e adicionalmente responderam de maneira expressiva contra a MSP1₁₉ de *P. yoelii*, titulação na ordem de 10^5 nos dois casos e independente da adição ou não de lipídeo A. A sorotipagem dos soros

revelou resposta mista Th1/Th2 representadas por IgG1 e IgG2a,IgG2b nos animais imunizados com proteolipossomos e resposta levemente polarizada para Th1 em animais que foram imunizados com lipídeo A. Esses dados são consoantes uma vez que lipossomos podem ser efetivos em privilegiar respostas Th1 (91) e podem ter esse efeito aumentado com a adição de lipídeo A (41), lembrando que o viés Th2 tende a ser prevalente no fundo genético de Balb/C (81).

Quando finalmente desafiados os animais responderam de um modo conciso. Animais controle, que receberam somente lipossomos sem proteínas foram vieram inevitavelmente a morte, enquanto animais imunizados com proteolipossomos demonstram sobrevida de 100%. Em animais que receberam lipídeo A tivemos a sobrevida de apenas 40% do grupo, mas nesse caso maiores explicações são necessárias. Nesse grupo a morte não veio por alta parasitemia como de costume em infecções por *P. yoelii*. Nesse grupo a morte veio dois dias após o desafio dia em que, sem exceção nos animais analisados, a parasitemia encontrava-se em níveis muito baixos. Creditamos a morte desses animais à síndrome similar a choque causado por uma resposta imunológica exacerbada. Três inferências suportam essas conclusões, a primeira é de que o pico de parasitemia dos sobreviventes nesse grupo foi muito mais baixa do que nos animais desafiados e imunizados com proteolipossomos sem lipídeo A. Outro fato importante é o de que os títulos contra MSP1₁₉ nesse grupo são estatisticamente maiores dos que os no grupo com proteolipossomos (dado não mostrado), e por fim, imunoblots de extratos de merozoítos demonstram até 4 bandas sendo reconhecidas, o que sugere grande amplitude no que diz respeito a reconhecimento de antígenos. Cabe ressaltar que poucos estudos alcançaram este patamar de proteção neste modelo de infecção com *P. yoelii* por imunização (92).

Resta saber se durante a infecção por *P. yoelii* os isotipos de anticorpos sofreram mudança em sua composição como o que foi visto em *P. berghei*. Se confirmado uma mudança nos isotipos fica provável que essa mudança é promovida pela infecção em associação com o fundo genético do hospedeiro, e em caso negativo, confirma-se a hipótese de que esse efeito é característico das infecções por *P. berghei* NK 65 sinalizando um novo mecanismo de escape

a toxinas pelo hospedeiro por essa cepa desenvolvida que dentre outras vantagens poderia aumentar a dificuldade de uma respostas imune efetiva . Isso poderia ser um mecanismo que permita a essa linhagem atingir altos índices de parasitemia e aumentando sua permanência no ciclo sanguíneos do hospedeiro. Seja como for ambas as possibilidades tornam-se interessantes do ponto de vista imunopatológico em linhagens do gênero *Plasmodium*.

Finalizando a viabilidade de proteolipossomos como modelo vacinal, decidimos analisar se essas formulações poderiam ser liofilizadas sem perderem suas características iniciais (tamanho e polidispersidade). Desse modo um experimento preliminar foi feito com proteolipossomos de *P. yoelii*, onde após serem gerados como nanopartículas vacinais os mesmos foram liofilizados e reidratados sem perderem, de maneira significativa, as características iniciais de tamanho e polidispersidade. Mesmo que feito de maneira preliminar (N=2), esses dados sugerem que essas formulações podem ser de fácil estocagem e atendem a mais um requisito no que diz respeito a características almejadas na manipulação de vacinas.

6 CONCLUSÕES

Baseamos os experimentos dessa dissertação em um tripé de três parasitas do mesmo gênero *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. berghei* e *P. yoelii*. Utilizamos dois fundos genéticos distintos, para validar os potenciais imunológicos desenvolvidos por um único modelo vacinal composto por um sistema biomimético feito por proteínas GPI e nanopartículas lipossomais. Integramos modelos parasitológicos *in vitro* e *in vivo* que abrangem aplicação em malária humana, controle de possíveis mecanismos patológicos relacionados à malária e correlacionamos esses aspectos em dois pontos importantes da doença como controle parasitológico e letalidade da doença. Como conclusões gerais temos:

- 1-Proteolipossomos são potentes modelos vacinais que desencadeiam fortes respostas humorais;
- 2-a integração de proteolipossomo e o fundo genético do organismo imunizado são de vital importância para a resposta gerada por esse tipo de vacina;
- 3-diferentes parasitas podem desencadear cursos diferentes nas infecções;
- 4-a versatilidade do sistema vacinal pode ser aplicada caso a caso, em infecções de origens diferentes, com potencial aplicação ao gênero *Plasmodium*, dentro do desenvolvimento sanguíneo da doença.

REFERÊNCIAS*

1. World Health Organization. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000;94:1–90.
2. Hay SI, Okiro EA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Guerra CA, et al. Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. *PLoS Medicine.* 2010;7(6):1000290.
3. Van Valen L. A new evolutionary law. *Evolutionary Theory.* 1973;1:1-30.
4. Hay SI, Guerra CA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Noor AM, et al. A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007. *PLoS Medicine.* 2009:1000048.
5. Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz JF, et al. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe.* 2008:88-96.
6. Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, Garnham PC, Cogswell FB, Gwadz RW, et al. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1982;31(6):1291-3.
7. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science.* 2006:1287-90.
8. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell.* 2006:755-66.
9. Wilson DW, Fowkes FJ, Gilson PR, Elliott SR, Tavul L, Michon P, et al. Quantifying the importance of MSP1-19 as a target of growth-inhibitory and protective antibodies against *Plasmodium falciparum* in humans. *PloS One.* 2011:27705.
10. Rosenthal PJ. Proteases of malaria parasites: new targets for chemotherapy. *Emerging Infectious Diseases.* 1998 Jan-Mar;4(1):49-57.
11. Sutherland CJ. Surface antigens of *Plasmodium falciparum* gametocytes - a new class of transmission-blocking vaccine targets? *Mol Biochem Parasitol.* 2009:93-8.
12. Centers for Disease Control and Prevention(CDC). 2012. Available from: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>. [15 Aug 2012].

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [Updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

13. Good MF, Doolan DL. Malaria vaccine design: immunological considerations. *Immunity*. 2010;555-66.
14. Wipasa J, Elliott S, Xu H, Good MF. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. *Immunol Cell Biol*. 2002;401-14.
15. Bruder JT, Angov E, Limbach KJ, Richie TL. Molecular vaccines for malaria. *Hum Vaccin*. 2010;6(1):54-77.
16. Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Dec;120(12):4168-78.
17. Sirima SB, Cousens S, Druilhe P. Protection against malaria by MSP3 candidate vaccine. *The New England Journal of Medicine*. 2011 Sep 15;365(11):1062-4.
18. Douglas AD, Williams AR, Illingworth JJ, Kamuyu G, Biswas S, Goodman AL, et al. The blood-stage malaria antigen PfRH5 is susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody. *Nat Commun. England*; 2011:601.
19. Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, Momin P, Kester KE, Desmons P, et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. *The New England journal of medicine*. 1997;336(2):86-91.
20. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2005:722-35.
21. Leech JH, Barnwell JW, Aikawa M, Miller LH, Howard RJ. *Plasmodium falciparum* malaria: association of knobs on the surface of infected erythrocytes with a histidine-rich protein and the erythrocyte skeleton. *The Journal of Cell Biology*. 1984;98(4):1256-64.
22. Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, et al. Cloning the *P.falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*. 1995:77-87.
23. Schofield L, Hewitt MC, Evans K, Siomos MA, Seeberger PH. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature*. 2002:785-9.
24. Boutlis CS, Riley EM, Anstey NM, de Souza JB. Glycosylphosphatidylinositols in malaria pathogenesis and immunity: potential for therapeutic inhibition and vaccination. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2005;297:145-85.
25. Gowda DC. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol*. 2007:596-604.

26. Wassmer SC, Moxon CA, Taylor T, Grau GE, Molyneux ME, Craig AG. Vascular endothelial cells cultured from patients with cerebral or uncomplicated malaria exhibit differential reactivity to TNF. *Cellular Microbiology*. 2011; 13(2):198-209.
27. Liu TP, Fu Y, Xu WY. [Immunopathological mechanism of cerebral malaria]. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi* = Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases. 2011;29(1):64-7.
28. Engwerda C, Belhoue E, Gruner AC, Renia L. Experimental models of cerebral malaria. *Current topics in Microbiology and Immunology*. 2005;297:103-43.
29. Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*. 1990:1201-4.
30. de Souza JB, Runglall M, Corran PH, Okell LC, Kumar S, Gowda DC, et al. Neutralization of malaria glycosylphosphatidylinositol in vitro by serum IgG from malaria-exposed individuals. *Infection and Immunity*. 2010:3920-9.
31. Naik RS, Branch OH, Woods AS, Vijaykumar M, Perkins DJ, Nahlen BL, et al. Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000 Dec 4;192(11):1563-76.
32. Lyon JA, Angov E, Fay MP, Sullivan JS, Girourd AS, Robinson SJ, et al. Protection induced by *Plasmodium falciparum* MSP1(42) is strain-specific, antigen and adjuvant dependent, and correlates with antibody responses. *PloS One*. 2008;3(7):2830.
33. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*. 2008:5771-7.
34. Oyewumi MO, Kumar A, Cui Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Review of Vaccines*. 2010;9(9):1095-107.
35. Villegas-Mendez A, Greig R, Shaw TN, de Souza JB, Gwyer Findlay E, Stumhofer JS, et al. IFN-gamma-producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *Journal of Immunology*. 2012:968-79.
36. Yoo JW, Irvine DJ, Discher DE, Mitragotri S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2011:521-35.
37. Moon JJ, Suh H, Li AV, Ockenhouse CF, Yadava A, Irvine DJ. Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines that expand Tfh cells and promote germinal center induction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012:1080-5.

38. Moon JJ, Huang B, Irvine DJ. Engineering nano- and microparticles to tune immunity. *Advanced Materials*. 2012;24(28):p.3724-46.
39. Badiiee A, Davies N, McDonald K, Radford K, Michiue H, Hart D, et al. Enhanced delivery of immunoliposomes to human dendritic cells by targeting the multilectin receptor DEC-205. *Vaccine*. Netherlands; 2007. p. 4757-66.
40. Irvine DJ. Drug delivery: One nanoparticle, one kill. *Nat Mater*. 2011: 342-3.
41. Bershteyn A, Hanson MC, Crespo MP, Moon JJ, Li AV, Suh H, et al. Robust IgG responses to nanograms of antigen using a biomimetic lipid-coated particle vaccine. *J Control Release*. 2012:354-65.
42. Stephan MT, Stephan SB, Bak P, Chen J, Irvine DJ. Synapse-directed delivery of immunomodulators using T-cell-conjugated nanoparticles. *Biomaterials*. 2012:5776-87.
43. Parmar MM, Edwards K, Madden TD. Incorporation of bacterial membrane proteins into liposomes: factors influencing protein reconstitution. *Biochim Biophys Acta*. 1999:77-90.
44. Nakamura K, Yamashita K, Itoh Y, Yoshino K, Nozawa S, Kasukawa H. Comparative studies of polyethylene glycol-modified liposomes prepared using different PEG-modification methods. *Biochim Biophys Acta*. 2012:2801-7.
45. Holder AA, Sandhu JS, Hillman Y, Davey LS, Nicholls SC, Cooper H, et al. Processing of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*. 1987;94(Pt 2):199-208.
46. O'Donnell RA, de Koning-Ward TF, Burt RA, Bockarie M, Reeder JC, Cowman AF, et al. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001;193(12):1403-12.
47. de Koning-Ward TF, O'Donnell RA, Drew DR, Thomson R, Speed TP, Crabb BS. A new rodent model to assess blood stage immunity to the *Plasmodium falciparum* antigen merozoite surface protein 119 reveals a protective role for invasion inhibitory antibodies. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003:869-75.
48. Miyata T, Harakuni T, Taira T, Matsuzaki G, Arakawa T. Merozoite surface protein-1 of *Plasmodium yoelii* fused via an oligosaccharide moiety of cholera toxin B subunit glycoprotein expressed in yeast induced protective immunity against lethal malaria infection in mice. *Vaccine*. 2012:948-58.
49. Malkin E, Hu J, Li Z, Chen Z, Bi X, Reed Z, et al. A phase 1 trial of PfCP2.9: an AMA1/MSP1 chimeric recombinant protein vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *Vaccine*. 2008:6864-73.

50. Burghaus PA, Welde BT, Hall T, Richards RL, Egan AF, Riley EM, et al. Immunization of Aotus nancymai with recombinant C terminus of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 in liposomes and alum adjuvant does not induce protection against a challenge infection. *Infection and Immunity*. 1996;64(9):3614-9.
51. Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem*. 2005;8606-16.
52. Bordier C. The promastigote surface protease of Leishmania. *Parasitol Today*. 1987;151-3.
53. Colhone MC, Nobre TM, Zaniquelli ME, Stabeli RG, Ciancaglini P. Incorporation of antigenic GPI-proteins from Leishmania amazonensis to membrane mimetic systems: influence of DPPC/cholesterol ratio. *J Colloid Interface Sci*. 2009;373-9.
54. Santos FR, Ferraz DB, Daghasanli KR, Ramalho-Pinto FJ, Ciancaglini P. Mimetic membrane system to carry multiple antigenic proteins from Leishmania amazonensis. *The Journal of Membrane Biology*. 2006;210(3):173-81.
55. Watson DS, Endsley AN, Huang L. Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine*. 2012;2256-72.
56. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976;193(4254):673-5.
57. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*. 1979;65(3):418-20.
58. Lelievre J, Berry A, Benoit-Vical F. An alternative method for Plasmodium culture synchronization. *Exp Parasitol*. 2005;109(3):195-7.
59. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*. 1972;422-7.
60. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem*. 1996;302-8.
61. Janse CJ, Van Vianen PH. Flow cytometry in malaria detection. *Methods in Cell Biology*. 1994;42 Pt B:295-318.
62. Hirose-Kumagai A, Whipple FH, Ikejima T, Dinarello CA, Gill DM, Ritz HL, et al. A comparison of neutralizing and antigen-binding assays for human antibodies against toxic-shock-syndrome toxin 1. *The Journal of Infectious diseases*. 1984;150(5):788.

63. Gerdes N, Zirlik A. Co-stimulatory molecules in and beyond co-stimulation - tipping the balance in atherosclerosis? *Thromb Haemost.* Germany; 2011. p. 804-13.
64. Parween S, Gupta PK, Chauhan VS. Induction of humoral immune response against PfMSP-1(19) and PvMSP-1(19) using gold nanoparticles along with alum. *Vaccine.* 2011;2451-60.
65. Yoshida S, Nagumo H, Yokomine T, Araki H, Suzuki A, 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):13727.
66. Santos LE, Colhone MC, Daghashtanli KR, Stabeli RG, Silva-Jardim I, Ciancaglini P. Lipid microspheres loaded with antigenic membrane proteins of the *Leishmania amazonensis* as a potential biotechnology application. *J Colloid Interface Sci.* 2009;112-8.
67. Moss DK, Remarque EJ, Faber BW, Cavanagh DR, Arnot DE, Thomas AW, et al. *Plasmodium falciparum* 19-kilodalton merozoite surface protein 1 (MSP1)-specific antibodies that interfere with parasite growth in vitro can inhibit MSP1 processing, merozoite invasion, and intracellular parasite development. *Infection and Immunity.* 2012;1280-7.
68. Lourembam SD, Baruah S. Antibody response to allelic variants of 19kDa fragment of MSP-1: recognition of a variant and protection associated with ethnicity in Assam, India. *Vaccine.* 2012;767-73.
69. Peek LJ, Middaugh CR, Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;915-28.
70. Shuaibu MN, Cherif MS, Kurosaki T, Helegbe GK, Kikuchi M, Yanagi T, et al. Effect of nanoparticle coating on the immunogenicity of plasmid DNA vaccine encoding *P. yoelii* MSP-1 C-terminal. *Vaccine.* 2011;3239-47.
71. Julia V, McSorley SS, Malherbe L, Breittmayer JP, Girard-Pipau F, Beck A, et al. Priming by microbial antigens from the intestinal flora determines the ability of CD4+ T cells to rapidly secrete IL-4 in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Immunology.* 2000;165(10):5637-45.
72. Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of cell science.* 1999;112 Pt 18:2993-3002.
73. Martin RM, Brady JL, Lew AM. The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice. *J Immunol Methods.* 1998;187-92.
74. Klein-Schneegans AS, Kuntz L, Trembleau S, Fonteneau P, Loo F. Serum concentrations of IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 and IgA in C57BL/6 mice and their congenics at the nu(nude)locus. *Thymus.* 1990;16(1):45-54.

75. Klein-Schneegans AS, Kuntz L, Fonteneau P, Loor F. Serum concentrations of IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 and IgA in C57BL/6 mice and their congenics at the *Ipr* (lymphoproliferation) locus. *Journal of Autoimmunity*. 1989; 2(6):869-75.
76. Abuqayyas L, Balthasar JP. Application of knockout mouse models to investigate the influence of FcγR on the tissue distribution and elimination of 8C2, a murine IgG1 monoclonal antibody. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;439(1-2):8-16.
77. Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. FcγR4: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity*. 2005;41:51.
78. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science*. 2005. p. 1510-2.
79. de Saldanha RR, Martins-Papa MC, Sampaio RN, Muniz-Junqueira MI. Meglumine antimonate treatment enhances phagocytosis and TNF-α production by monocytes in human cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012:596-603.
80. Desruisseaux MS, Gulinello M, Smith DN, Lee SC, Tsuji M, Weiss LM, et al. Cognitive dysfunction in mice infected with *Plasmodium berghei* strain ANKA. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008;197(11):1621-7.
81. Serre K, Mohr E, Gaspal F, Lane PJ, Bird R, Cunningham AF, et al. IL-4 directs both CD4 and CD8 T cells to produce Th2 cytokines in vitro, but only CD4 T cells produce these cytokines in response to alum-precipitated protein in vivo. *Mol Immunol*. 2010:1914-22.
82. Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Diallo DA, Kone AK, Guindo AB, et al. Safety and immunogenicity of an AMA-1 malaria vaccine in Malian adults: results of a phase 1 randomized controlled trial. *PloS One*. 2008;3(1):1465.
83. Diaz de Stahl T, Dahlstrom J, Carroll MC, Heyman B. A role for complement in feedback enhancement of antibody responses by IgG3. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003:1183-90.
84. Hjelm F, Carlsson F, Verbeek S, Heyman B. IgG3-mediated enhancement of the antibody response is normal in FcγRI-deficient mice. *Scand J Immunol*. 2005:453-61.
85. Quintana FJ, Solomon A, Cohen IR, Nussbaum G. Induction of IgG3 to LPS via Toll-like receptor 4 co-stimulation. *PloS One*. 2008;3(10):3509.
86. Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traore B, Doumbo OK, Tygrett LT, et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage *Plasmodium* infection. *Nat Immunol*. 2011:188-95.
87. Duffield JS. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clinical Science*. 2003;104(1):27-38.

88. Hirunpetcharat C, Finkelman F, Clark IA, Good MF. Malaria parasite-specific Th1-like T cells simultaneously reduce parasitemia and promote disease. *Parasite Immunol.* 1999;319-29.
89. Cheng G, Yu A, Malek TR. T-cell tolerance and the multi-functional role of IL-2R signaling in T-regulatory cells. *Immunological reviews.* 2011;241(1):63-76.
90. Pasparakis M, Alexopoulou L, Douni E, Kollias G. Tumour necrosis factors in immune regulation: everything that's interesting is...new! *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996:223-9.
91. Landesman-Milo D, Peer D. Altering the immune response with lipid-based nanoparticles. *J Control Release.* 2012:600-8.
92. Eslava I, Payares G, Pernia BM, Holder AA, Spencer LM. Suppressive and additive effects in protection mediated by combinations of monoclonal antibodies specific for merozoite surface protein 1 of *Plasmodium yoelii*. *Malar J England.* 2010:46.