Raquel Hoffmann Panatieri

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO
MONOCLONAL α DEC205 ACOPLADO A PROTEÍNA
MSP-1₍₁₉₎ DE *Plasmodium chabaudi***

Dissertação apresentada ao Departamento de
Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2011

Raquel Hoffmann Panatieri

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL
 α DEC205 ACOPLADO A PROTEÍNA MSP-1₍₁₉₎ DE *Plasmodium chabaudi***

Dissertação apresentada ao Departamento de
Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia
Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Regina D'Império Lima

SÃO PAULO
2011

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

© reprodução total

Panatieri, Raquel.

Produção e caracterização do anticorpo monoclonal α DEC205 acoplado a proteína MSP-1₍₁₉₎ de *Plasmodium chabaudi* / Raquel Panatieri. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Maria Regina D'Império Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia da malária.

Versão do título para o inglês: Production and characterization of a monoclonal antibody α DEC205 Coupled to MSP-1₍₁₉₎ protein from *Plasmodium chabaudi*

Descritores: 1. Malária 2. *Plasmodium chabaudi* 3. MSP-1₍₁₉₎
4. Células dendríticas 5. DEC205 6. Anticorpo híbridos I. Lima, Maria Regina D'Império II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB056/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Raquel Panatieri.

Título da Dissertação: Produção e caracterização do anticorpo monoclonal α DEC205 acoplado a proteína MSP-1₍₁₉₎ de *Plasmodium chabaudi*.

Orientador(a): Maria Regina D'Império Lima.

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia das Parasitoses, no Departamento de Imunologia, e no Laboratório de Direcionamento de Antígenos para Células Dendríticas no Departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), projeto nº 2008/51290-0.

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438 e-mail : cepebio@usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	---

Decl. CEEA.038.08

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **031/04/CEEA**, datado de 20.04.04 e por solicitação da Profa. Dra. Maria Regina D'Império Lima, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Raquel Hoffmann Panatieri** ao projeto de pesquisa "*Estudo da resposta imune inata e adquirida contra o plasmodium chabaudi*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 13 de agosto de 2008.

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

Aos meus pais, Roni e Lúcia, por acreditarem e apoiarem.

À luz da minha vida, Henrique, por todo amor.

À Prof^a Dr^a Silvia Beatriz Boscardin, por toda paciência e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Roni e Lúcia, e minha irmã, Rosa, por acreditarem e apoiarem, minhas decisões,

Ao amor da minha vida, Henrique, por toda paixão, amizade, companheirismo, sinceridade, presença e apoio,

À Prof^a Dr^a Maria Regina D'Império Lima, pela oportunidade de conhecer, aprender e estudar na USP,

Ao Prof^o Dr^o Marcelo Urbano, do Departamento de Parasitologia, pela possibilidade de conhecer uma realidade diferente, e através disso poder permanecer em São Paulo,

À Prof^a Dr^a Silvia Beatriz Boscardin pelos ensinamentos, co-orientação, dedicação e paciência,

Ao Prof^o Dr^o Sérgio Málaga, pelos conselhos, conversas e aprendizado,

Ao Márcio, Meire e Rogério pelo apoio técnico para realização dos experimentos,

Aos meus grandes amigos Eduardo, Silvia, Érika, por todo apoio dentro e fora do laboratório,

Aos meus grandes amigos Eline, Hugo, Kelly, Renan e Suelen, pela parceria no laboratório, paciência e grande ajuda com os experimentos,

Ao pessoal administrativo do Departamento de Imunologia, Tiago, Eni, Jotelma e Amanda, pela disponibilidade em ajudar sempre,

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho,

Obrigada.

''Toda a nossa ciência comparada à nossa realidade é primitiva e inocente, e, portanto é o que temos de mais valioso. ''

Albert Einstein

RESUMO

Panatieri RH. Produção e caracterização do anticorpo monoclonal α DEC205 acoplado à proteína MSP-1₍₁₉₎ de *Plasmodium chabaudi* [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Apesar da forte ativação do sistema imune que ocorre durante a infecção pelo Plasmodium, a memória imunológica à infecção é restrita a pacientes residentes em áreas endêmicas. Dessa forma, uma linha de pesquisa importante é a que visa à geração de métodos que promovam a geração de uma resposta imune eficaz e duradoura contra o parasito. Uma das alternativas mais promissoras no desenvolvimento de vacinas é o direcionamento de antígenos específicos para células com funções centrais dentro do sistema imune utilizando anticorpos capazes de reconhecer receptores na superfície dessas células. Produzimos e caracterizamos um anticorpo híbrido específico para a molécula DEC205, um receptor endocítico presente nas células dendríticas, acoplado à proteína MSP-1₍₁₉₎ de *Plasmodium chabaudi*, para fins de imunização e análise da resposta imune celular e humoral. Estudos anteriores demonstraram a capacidade desse receptor, expresso em diversos subtipos de células dendríticas, em induzir respostas imunes celular e humoral. Em testes de caracterização do anticorpo α DEC205/MSP-1₍₁₉₎, observamos a capacidade de ligação de forma específica e dose-dependente às células CHO expressando receptor DEC205 de camundongo. Ensaios *ex vivo*, demonstraram a capacidade do anticorpo híbrido em reconhecer células com fenótipo MHCII⁺CD11c⁺CD8⁺ presentes em linfonodos drenantes e no baço, mas não seu controle isotípico. Em ensaios de imunização, observou-se a indução de uma resposta humoral mais proeminente em camundongos imunizados com controle isotípico, caracterizada pela produção de anticorpo IgG1, IgG2a e IgM. Testes de ELISPOT demonstraram a capacidade dos anticorpos híbridos em ativar resposta celular específica para MSP-1₍₁₉₎, medida pela produção de IFN- γ . Nossos resultados prévios indicam que tal estratégia para imunização foi efetiva no direcionamento do antígeno para DCs *in vivo*, abrindo a possibilidade de, juntamente com outras estratégias de imunizações adicionais, levarem a uma ativação da resposta imune grande e específica ao parasita.

Palavras-chave: Malária. *P.chabaudi*. MSP-1₍₁₉₎. Células dendríticas. DEC205.

ABSTRACT

Panatieri RH. Production and characterization of a monoclonal antibody α DEC205 coupled to MSP-1₍₁₉₎ protein from *Plasmodium chabaudi* [Master thesis (Imunology)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Despite the strong activation of the immune system during infection by *Plasmodium*, the immunological memory to infection is restricted to patients residing in endemic areas. An important line of research is in the generation of methods that promote an effective and durable immune response against the parasite. One of the most promising alternatives for vaccine development is targeting antigens to cells with central functions in the immune system using antibodies that recognize membrane receptors on the surface of these cells. We produce and characterize an antibody that recognize DEC205, an endocytic receptor present on dendritic cells, coupled to protein MSP-1₍₁₉₎ of *Plasmodium chabaudi*, for immunization and analysis of cellular and humoral immune responses. DEC205 receptor expressed by several subsets of DC has been shown in previous studies to be an efficient endocytic receptor for inducing both humoral and cellular immune responses. After characterizing the hybrid antibodies, we observed specific binding capacity in cells expressing the murine DEC205 receptor. *Ex vivo* tests demonstrated the capacity of antibody to recognize cells with phenotype MHCII+CD11c+CD8+ from lymph nodes and spleen, but not its isotype control. In immunization studies, we observed the induction of generation of humoral response in mice immunized with isotype control, with production of antibodies IgG1, IgG2a and IgM. ELISPOT demonstrated the capacity to targeting in activate specific cellular response to MSP-1(19), measured by IFN- γ production. Our results indicated that this immunization strategy was effective in targeting antigen to DCs *in vivo*, opening the possibility, along with other strategies for additional immunizations, to induce a large activation of the immune response and specific to the parasite.

Key-words: Malária. *P.chabaudi*. MSP-1₍₁₉₎. Dendritic cells. DEC205. Hybrid antibodies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo vital do Plasmodium sp	23
Figura 2: Mapa que mostra a distribuição da infecção pela malária causada por <i>P. falciparum</i>	24
Figura 3: Processamento da proteína precursora da MSP-1₍₁₉₎ (Adaptado de Pasteur Institute)	28
Figura 4: Vetores de clonagem e sub-clonagem	41
Figura 5: Produção de anticorpos híbridos	49
Figura 6: Representação esquemática do ensaio de determinação da viabilidade dos anticorpos dos anticorpos híbridos	53
Figura 7: Amplificação da porção codificante da MSP-1₍₁₉₎	59
Figura 8: Anticorpos Híbridos	60
Figura 9: Representação esquemática da sequência codificante do gene da MSP-1₍₁₉₎ sub-clonada em vetor que carrega a cadeia pesada do anticorpo monoclonal αDEC205	61
Figura 10: Sub-clonagem da porção codificante da MSP-1₍₁₉₎ no vetor de expressão em eucariotos pET28a	63
Figura 11: Sub-clonagem da porção codificante da MSP-1₍₁₉₎ em vetor que expressa a cadeia pesada do anticorpo monoclonal e seu controle isotípico	64
Figura 12: Expressão e solubilidade da proteína MSP-1₍₁₉₎r	66
Figura 13: Purificação da proteína MSP-1₍₁₉₎r	68
Figura 14: Caracterização dos anticorpos híbridos	70
Figura 15: Ensaio de viabilidade e especificidade da ligação dos anticorpos híbridos	72
Figura 16: Ensaio de direcionamento dos anticorpos para DCs do baço	74
Figura 17: Ensaio de direcionamento dos anticorpos para DCs de baço	76
Figura 18: Ensaio de direcionamento dos anticorpos para DCs de LN drenantes	77
Figura 19: Esquema de imunização com 5 μg dos anticorpos híbridos	78
Figura 20: Análise dos níveis séricos de anticorpos contra MSP-1₍₁₉₎	79
Figura 21: Ensaio para determinação da produção de IFN-γ por esplenócitos totais de camundongos imunizados com 5 μg	80
Figura 22: Esquema de imunização com 50 μg dos anticorpos híbridos	81
Figura 23: Ensaio para determinação da produção de IFN-γ por esplenócitos totais de camundongos imunizados com 50 μg	82

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Descrição das linhagens de Escherichia coli utilizadas.</i>	40
<i>Tabela 2 - Descrição das características dos vetores.</i>	42
<i>Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para sub-clonagem.</i>	42
<i>Tabela 4 - Reação para amplificação da porção codificante da MSP-1₍₁₉₎ por PCR.</i>	43
<i>Tabela 5 - Reação para ligação.</i>	43
<i>Tabela 6 - Análise por enzima de restrição.</i>	44
<i>Tabela 7 - Enzimas utilizadas nas análises de restrição.</i>	44
<i>Tabela 8 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de sequenciamento</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS

Bam HI	<i>Endonuclease de restrição I de Bacillus amyloliquefaciens H</i>
CD205	<i>Grupo de diferenciação 205 (do inglês ‘Cluster of differentiation’)</i>
CD80	<i>Grupo de diferenciação 80 (do inglês ‘Cluster of differentiation’)</i>
CD86	<i>Grupo de diferenciação 86 (do inglês ‘Cluster of differentiation’)</i>
CHO	<i>Linhagem celular derivada de células de ovário de hamster chinês</i>
DAB	<i>3,3’-Diaminobenzidine</i>
DC	<i>Células dendríticas</i>
DCIR2	<i>‘dendritic cell inhibitory receptor 2’</i>
DMEM	<i>do inglês Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium</i>
DNAse	<i>desoxirribonuclease</i>
DO	<i>densidade óptica</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
Eco RI	<i>Endonuclease de restrição de Escherichia coli RY13</i>
EDTA	<i>ácido etilenodiamino tetra-acético</i>
EP	<i>eritrócitos parasitados</i>
GM-CSF	<i>do inglês Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPI	<i>Glicosilfosfatidilinositol</i>
HEK	<i>células derivadas de rim de embrião humano</i>
HEPES	<i>ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfônico</i>
His 6	<i>códons codificantes de seis histidinas</i>
HRP	<i>enzyme horseradish peroxidase</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IgM	<i>Imunoglobulina</i>
IKDC	<i>Interferon-producing killer dendritic cells</i>
IL	<i>Interleucina</i>
IMC	<i>do inglês ‘inner molecule complex’</i>
Ip	<i>Intraperitoneal</i>
IPTG	<i>isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside</i>

kan	<i>kanamicina</i>
kan^r	<i>gene de resistência a Kanamicina</i>
kDa	<i>kilo Dalton</i>
L	<i>Litro</i>
LB	<i>Meio de cultivo bacteriano Luria-Bertani</i>
LN	<i>Linfonodo</i>
mAb	<i>Anticorpo monoclonal</i>
mDC	<i>células dendríticas mielóides</i>
mg	<i>miligrama</i>
MHC I	<i>complexo principal de histocompatibilidade I</i>
MHC II	<i>complexo principal de histocompatibilidade II</i>
mM	<i>milimolar</i>
MMR	<i>do inglês Macrophage mannose receptor</i>
mRNA	<i>ácido ribonucléico mensageiro</i>
MSP	<i>Proteína de membrana do merozoíto -1</i>
MSP-1(19)r	<i>Proteína de membrana do merozoíto -1 recombinante</i>
N	<i>Normalidade</i>
ng	<i>nanograma</i>
NK	<i>do inglês 'Natural killer'</i>
NKT	<i>do inglês células T Natural Killer</i>
nm	<i>nanômetro</i>
Not I	<i>Endonuclease de restrição de Nocordia otitidis-caviarum</i>
°C	<i>graus Celsius</i>
pDC	<i>células dendríticas plasmocitóides</i>
pb	<i>pares de base</i>
PBS	<i>Solução salina tamponada com fosfato (phosphate buffer saline)</i>
PCR	<i>reação em cadeia polimerase (polymerase chain reaction)</i>
PEI	<i>polietilenoimina</i>
pH	<i>escala de acidez e alcalinidade</i>

RNA	<i>Ácido ribonucléico</i>
RNase	<i>Ribonuclease</i>
RPM	<i>rotações por minuto</i>
s	<i>segundos</i>
SDS	<i>dodecilsulfato de sódio</i>
SDS-PAGE	<i>eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS</i>
T₇	<i>promotor do fago T₇</i>
TA	<i>temperatura ambiente</i>
Taq	<i>enzima polimerase de <i>Thermus aquaticus</i></i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminomethane</i>
Th₁	<i>linfócitos T helper 1</i>
Th₁₇	<i>linfócitos T helper 17</i>
Th₂	<i>linfócitos T helper 2</i>
TLR	<i>do inglês toll-like receptor</i>
TMB	<i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i>
TNF	<i>fator de necrose tumoral (do inglês 'tumor necrosis factor')</i>
Tris	<i>tris(hidroximetil)aminometano</i>
Xho I	<i>endonuclease de restrição I de <i>Xanthomonas holcicola</i></i>
YFP	<i>proteína amarela fluoresecnte (do inglês 'yellow fluorescent protein')</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	<i>mi</i> ('micro')
α	<i>alfa</i>
β	<i>beta</i>
γ	<i>gama</i>
δ	<i>delta</i>
κ	<i>kappa</i>

LISTA DE FÓRMULAS

CO_2	<i>dióxido de carbono</i>
H_2SO_4	<i>ácido sulfúrico</i>
HCl	<i>ácido clorídrico</i>
$NaOH$	<i>hidróxido de sódio</i>
NO	<i>óxido nítrico</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.2	<i>EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA</i>	24
1.3	<i>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E TRATAMENTOS</i>	25
1.4	<i>RESPOSTA IMUNE</i>	25
1.5	<i>VACINAS E ANTÍGENOS</i>	27
1.6	<i>DIRECIONAMENTO DE ANTÍGENOS PARA CÉLULAS DENDRÍTICAS</i>	29
2	OBJETIVOS	33
3	METODOLOGIA	35
3.1	<i>SOLUÇÕES E REAGENTES</i>	36
3.1.1	<i>Preparação de Bactérias Competentes</i>	36
3.1.2	<i>Eletroforese em Gel de Agarose</i>	36
3.1.3	<i>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida</i>	36
3.1.4	<i>Western Blot</i>	37
3.1.5	<i>ELISA</i>	37
3.1.6	<i>ELISPOT</i>	37
3.1.7	<i>Cromatografia de Afinidade</i>	38
3.1.8	<i>Transfecção</i>	38
3.1.9	<i>Extração de DNA Plasmidial</i>	38
3.2	<i>CEPAS BACTERIANAS</i>	39
3.2.1	<i>Meios de Cultura</i>	39
3.2.2	<i>Linhagens Bacterianas</i>	39
3.2.3	<i>Preparo das Bactérias Competentes</i>	40
3.2.4	<i>Transformação de Bactérias Competentes</i>	40
3.3	<i>VETORES</i>	41
3.3.1	<i>Amplificação do Inserto</i>	42
3.3.2	<i>Clonagem da Porção Codificante</i>	44
3.3.3	<i>Sub-clonagem da Porção Codificante</i>	44
3.4	<i>Procedimentos Comuns às Etapas de Clonagem e Sub-clonagem</i>	45
3.4.1	<i>Seleção dos Clones Recombinantes</i>	45
3.4.2	<i>Extração de DNA Plasmidial</i>	46
3.4.3	<i>Sequenciamento de DNA</i>	46
3.5	<i>EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS</i>	47
3.5.1	<i>Expressão da Proteína MSP-1₍₁₉₎ em Escherichia coli</i>	47
3.5.2	<i>Expressão dos Anticorpos Híbridos em Células HEK293T</i>	48
3.5.3	<i>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	51
3.6	<i>PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS</i>	51

3.6.1	<i>Procedimentos Comuns às Cromatografias de Afinidade</i>	51
3.6.1.1	<i>Preparação da Coluna</i>	51
3.6.1.2	<i>Parâmetros da Cromatografia de Afinidade</i>	51
3.6.1.3	<i>Monitoramento da Cromatografia</i>	52
3.6.1.4	<i>Limpeza da Coluna após Purificação</i>	52
3.6.2	<i>Cromatografia de Afinidade a Cauda de Histidina</i>	52
3.6.3	<i>Cromatografia de Afinidade a Proteína G</i>	53
3.6.4	<i>Análise das Proteínas Purificadas</i>	53
3.6.5	<i>Proteína MSP-1₍₁₉₎ Recombinante</i>	53
3.6.6	<i>Anticorpos Híbridos DEC205-MSP-1₍₁₉₎ e ISO-MSP-1₍₁₉₎</i>	54
3.7	<i>ENSAIOS IMUNOLÓGICOS (ELISA e western blot)</i>	55
3.7.1	<i>Reconhecimento de proteínas por 'western blot'</i>	55
3.7.2	<i>Quantificação dos níveis séricos de anticorpos por 'ELISA'</i>	55
3.7.3	<i>ELISPOT</i>	56
3.7.4	<i>Análise Estatística</i>	57
3.8	<i>ENSAIOS DE VIABILIDADE DOS ANTICORPOS</i>	57
4	<i>RESULTADOS</i>	59
4.1	<i>CLONAGEM E SUB-CLONAGEM</i>	60
4.2	<i>EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MSP-1₍₁₉₎r</i>	66
4.3	<i>PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE</i>	68
4.4	<i>EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS HÍBRIDOS</i>	69
4.5	<i>CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS HÍBRIDOS</i>	72
4.6	<i>ANÁLISE DA RESPOSTA HUMORAL</i>	79
5	<i>DISCUSSÃO</i>	84
6	<i>CONCLUSÕES</i>	89
	<i>REFERÊNCIAS</i>	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Plasmodium sp.*

O filo *Apicomplexa* inclui protozoários unicelulares eucariotos, como os representantes do gênero *Plasmodium*, responsáveis por causar uma das mais preocupantes protozoonoses: a malária (1). A maioria dos parasitos desse gênero explora o meio intracelular, invadindo células de vertebrados terrestres como parte do seu ciclo de vida. Isso permite seu desenvolvimento, crescimento e multiplicação dentro do hospedeiro, em um ambiente rico em nutrientes, sem a vigilância constante do sistema imune (1).

A principal forma de transmissão do parasito ocorre pela picada do mosquito *Anopheles* infectado que, durante a hematofagia, injeta através da derme uma pequena quantidade de esporozoítos. Esses por sua vez entram na corrente sanguínea e chegam ao fígado, onde invadem e se replicam dentro de hepatócitos, diferenciando-se em merozoítos, que acessam, novamente, a corrente sanguínea, infectando eritrócitos. Nessa fase do desenvolvimento se estabelece um ciclo de invasão, replicação e ruptura, quando os merozoitos se multiplicam dentro das hemácias, que se rompem, liberando no sangue, parasitos que infectam novas hemácias (Figura 1).

A invasão das células pelos merozoítos ocorre através de invaginações na membrana celular, formando uma vesícula que se fecha envolvendo o parasito em um compartimento citoplasmático (2). Para tal, existem estruturas especializadas compostas por proteínas de adesão, cobrindo a superfície do merozoito, três compartimentos de organelas secretoras, uma pequena porção de citoesqueleto e uma estrutura denominada de 'IMC' (do inglês 'inner molecule complex'), importante para a mobilidade do parasito (1).

Figura 1: Ciclo vital do *Plasmodium sp.* Mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectado injeta esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro, durante a hematofagia, que migram para através da corrente sanguínea ao fígado. Durante a fase hepática do desenvolvimento esses esporozoítos se multiplicam. Após diversos ciclos de replicação e maturação são liberados na corrente sanguínea merozoítos, formas infectantes de eritrócitos. Nesse momento inicia-se a fase sanguínea do desenvolvimento, quando ocorre um ciclo de replicação e reinvasão de novos eritrócitos, responsável pelo aparecimento dos sintomas clínicos.

Fonte: Pierce et al. 2010

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

Aproximadamente 250 milhões de pessoas são infectadas pelo *Plasmodium* sp., e cerca de 2 milhões morrem todos os anos, a maioria crianças, em decorrência das complicações causadas pela infecção (3). A malária é considerada endêmica em mais de 90 países, o que representa um risco para 40% da população mundial (Figura 2) (4).

Figura 2: Mapa que mostra a distribuição da infecção pela malária causada por *P. falciparum*. Pode-se observar uma concentração em regiões tropicais e subtropicais.
Fonte: World Malaria Report 2007.

Dentre as quatro espécies que infectam o ser humano, o *P. vivax* e o *P. falciparum* causam, cerca de, 95% das infecções. O *P. vivax* possui uma distribuição ampla entre as regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo, enquanto o *P. falciparum* está presente em uma área mais restrita na região tropical. O *P. malarie* possui uma distribuição esporádica; e o *P. ovale* se restringe a região do centro-oeste africano e a algumas ilhas do pacífico sul (4).

No Brasil, em 2009, a incidência foi de aproximadamente 300 mil casos, concentrados principalmente na região Norte, em especial, no estado do Amazonas (5).

1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E TRATAMENTOS

Três aspectos importantes são determinantes para o surgimento de sintomas e patologia durante a infecção: o crescimento exponencial do parasito, a modificação das hemácias devido às proteínas do parasito expressas na membrana celular e a concomitante resposta imune do hospedeiro contra a infecção (6).

Durante a fase hepática da infecção não ocorrem sintomas clínicos. Na fase eritrocítica um grande número de produtos do parasito é liberado no momento da lise de EP (eritrócitos parasitados), que correlaciona com sintomas clínicos de doença leve, como dores de cabeça, febre, calafrios e letargia. Principalmente em crianças menores de cinco anos, a infecção por *P. falciparum*, pode progredir para doença grave, ocasionando malária cerebral (7), acidose metabólica (8) e anemia grave, podendo levar o indivíduo a óbito. Os sintomas da malária grave, causados por essa espécie de parasito, são associados com o sequestro de eritrócitos infectados no cérebro (7) causando inflamação.

Inseticidas e drogas antimaláricas são apenas parcialmente efetivos no controle da doença a longo prazo, devido, em grande parte, à seleção de vetores e parasitos resistentes. O *P. falciparum* se apresenta suscetível a várias drogas quando dentro do hospedeiro humano, e não existem dúvidas de que a terapia combinada de artemisina é altamente eficaz em reduzir doenças graves (9).

O desenvolvimento de uma vacina que poderia fazer parte do calendário de vacinação, e que proporcionasse o grau de imunidade necessário, impedindo o desenvolvimento da doença nas fases iniciais, ou mesmo gerasse uma resposta capaz de eliminar a infecção e impedisse sua disseminação, tornou-se um importante objetivo em termos de saúde pública.

1.4 RESPOSTA IMUNE

Diferente de outros patógenos, nos quais a exposição ao microrganismo ou às suas toxinas é capaz de conferir uma imunidade de vida longa, a infecção pelo *Plasmodium* pode persistir por meses, e mesmo após esse período, o hospedeiro permanece suscetível a reinfeção. O parasito possui mecanismos que o torna

capaz de evadir do sistema imune permitindo sua permanência no organismo. Por exemplo, durante o estágio sanguíneo do desenvolvimento do *P. falciparum*, ocorre uma rápida variação gênica em genes conhecidos como 'var genes'. Seus produtos são expressos na superfície dos EP, e são essenciais para ligação ao endotélio (7, 10).

Estudos em pacientes com malária grave causada pelo *P. falciparum*, indicam que a ativação do sistema imune inato tem um papel importante na resistência contra a infecção e patogenicidade (11). Células do sistema imune inato, como DCs (células dendríticas), monócitos/macrófagos, células NK (do inglês 'natural killer'), células NKT e células T $\gamma\delta$, são fundamentais para iniciar a resposta imune adaptativa, durante o estágio eritrocítico do desenvolvimento do parasito. Mas toda a resposta imune irá depender da interação patógeno-hospedeiro, e do balanço de citocinas consequente dessa relação.

Em camundongos, no início da infecção, quando a parasitemia é baixa, EP interagem diretamente com DCs que maturam e secretam IL-12 e TNF- α (12), que por sua vez, ativam células NK e células T a produzirem IFN- γ . Tais citocinas podem afetar o crescimento do parasito, e ativar a fagocitose de EPs por monócitos e macrófagos, tanto em camundongos (12), quanto em humanos (13). Além disso, essas citocinas podem direcionar a resposta para um perfil Th1 induzindo a produção de IgG2a em camundongos, IgG1 e IgG3 em humanos (14-16). Esses anticorpos são responsáveis pela opsonização de merozoítos e EP facilitando a fagocitose.

Estudos, utilizando o modelo de infecção pelo *P. chabaudi*, apresentaram resultados distintos, mostrando tanto ativação (17-18), quanto à inibição das DCs (19). Experimentos em humanos (20) e camundongos (21), contribuíram para esclarecer alguns resultados, aparentemente contraditórios, demonstrando que o efeito da infecção nas DCs, é dependente de diversos fatores, como a espécie do parasito (20), a subpopulação de DCs, o tempo pós-infecção e a quantidade de parasitos inoculados (21). Linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B participam dos mecanismos de resposta mediados por célula e mediados por anticorpos, podendo resultar no controle da infecção, pela geração de uma potente resposta inflamatória com a produção de IFN- γ e TNF- α (22-23).

No geral, a imunidade protetora contra vários organismos patogênicos depende da geração e manutenção do repertório de linfócitos T de memória, e com a sobrevivência dessas células por um longo período de tempo após o contato inicial com patógenos.

Dentro do sistema imune algumas células têm papel fundamental na indução e geração de uma resposta imune efetora e de longa duração. Dentre elas estão as células dendríticas, com um papel fundamental na regulação das respostas imunes inata e adaptativa (24). Além de processarem e apresentarem antígenos para os linfócitos T não ativados, também controlam a natureza da resposta celular desencadeada. Por exemplo, a expressão diferencial de receptores TLRs, ativada por produtos microbianos, pode ser correlacionada com a indução de diferentes padrões da resposta imune adaptativa (25), com perfis Th1, Th2 (26) ou Th17 (25).

Além desses, as DCs possuem outros receptores de reconhecimento de padrões, como as lectinas do Tipo C, que reconhecem padrões de glicosilação na superfície dos patógenos, induzindo a sua internalização, processamento e apresentação de antígenos provenientes desses microorganismos (25).

1.5 VACINAS E ANTÍGENOS

Em parte, a questão sobre o desenvolvimento de uma vacina para malária permanece devido à observação de que, apesar do sistema imune não conseguir prevenir, a resistência à infecção pode ser, eventualmente, adquirida através da contínua exposição natural ao parasito. Em estudos recentes observou-se que são necessários ao menos cinco anos de exposição a picadas de mosquitos infectados (27), além disso, adultos que vivem em áreas endêmicas podem permanecer infectados e assintomáticos, e raramente desenvolvem a doença, permanecendo como reservatórios de parasitos.

Vacinas podem desenvolver proteção duradoura contra infecção através de mecanismos que não possuem um papel dominante na imunidade adquirida naturalmente. Por exemplo, a imunidade natural não é adquirida contra o estágio pré-eritrocítico de infecção pelo *P. falciparum* (28), no entanto um dos candidatos à

vacina, RTS,S/SA02A, em desenvolvimento na indústria farmacêutica Glaxo-SmithKline, tem como alvo principal a fase pré-eritrocítica do desenvolvimento do parasito, proporcionando o desenvolvimento de imunidade de longa duração, evitando a propagação natural da infecção no organismo hospedeiro (29).

Por outro lado, a utilização de antígenos de membrana da fase eritrocítica do desenvolvimento do parasito, como alvos vacinais, parece ser da mesma forma, uma boa alternativa, visto que o *Plasmodium* utiliza algumas dessas estruturas como suporte e ancoragem na membrana do eritrócito para realizar a infecção de novas células, como é o caso do antígeno 175 do *P. falciparum*, receptor para glicoproteína A em eritrócitos (30).

Alguns antígenos de membrana, com funções não muito bem definidas, como é o caso da AMA-1 (31-32) e MSP-1 (33-34), têm sido testados como alvos vacinais potenciais.

Figura 3: Processamento da proteína precursora da MSP-1₍₁₉₎. Representação esquemática do processo de hidrólise da proteína MSP-1 na membrana do merozoíto. Pode-se observar os fragmentos que são liberados durante as hidrólises e a porção remanescente de 19kDa que permanece ancorada na membrana
Fonte: Adaptado de *Pasteur Institute* [(2010)].

A MSP-1 é uma proteína de membrana expressa na fase eritrocítica da infecção pelo *Plasmodium sp* (35). Sua síntese ocorre durante a esquizogonia (36), como um precursor de aproximadamente 200kDa (37), clivado sucessivamente na porção C-terminal durante a liberação do merozoíto (38). Embora não se conheça exatamente a função biológica dessa proteína, sabe-se que as clivagens proteolíticas são essenciais para a invasão dos eritrócitos (39) e para a

sobrevivência do parasito (40). Após as clivagens iniciais, um fragmento de 42kDa permanece ancorado na membrana do merozoíto via GPI, enquanto os fragmentos restantes são liberados na forma de complexos solúveis (41). O peptídeo que permanece ancorado sofre nova clivagem, imediatamente após a invasão, sendo reduzido a um fragmento com tamanho aproximado de 19kDa, que tem sua estrutura terciária moldada por seis pontes dissulfeto, agrupadas como domínios tipo EGF (37, 39, 41). A porção remanescente da clivagem, denominada de MSP-1₍₁₉₎ (Figura 3), é uma região altamente conservada em diferentes espécies de *Plasmodium* (40), sendo utilizada como alvo principal em pesquisas para o desenvolvimento de vacinas efetivas como forma de profilaxia ou atenuantes à infecção.

De acordo com estudos em humanos, anticorpos policlonais (42-43) e monoclonais (44-45), que reconhecem a MSP-1₍₁₉₎ são potentes inibidores da invasão de eritrócitos *in vitro* por merozoítos (45). Em estudos de imunização passiva com modelos de infecção utilizando *P. chabaudi* (46) e *P. yoelii* (47-49), observou-se a capacidade de anticorpos específicos contra MSP-1₍₁₉₎ em induzir imunidade protetora, mediante desafios de infecção.

No entanto, a resposta humoral e celular a antígenos específicos é transitória e dependente da presença de parasitos circulantes (50-51). Sabe-se que a geração de uma resposta imune celular de memória está correlacionada com a ativação e geração de linfócitos T específicos ao parasito, e com a apresentação de antígenos pelas DCs.

1.6 DIRECIONAMENTO DE ANTÍGENOS PARA CÉLULAS DENDRÍTICAS

Na última década, uma estratégia para induzir respostas imunes celular e humoral contra antígenos de diferentes patógenos vem sendo desenvolvida com sucesso em vários laboratórios. Esta estratégia consiste em direcionar antígenos de antígenos para as DCs, utilizando anticorpos monoclonais que reconhecem receptores endocíticos presentes na membrana dessas células.

Dentro dessa estratégia, alguns parâmetros importantes devem ser levados em consideração para a eficiência do modelo de imunização, como a origem, o estado de ativação e maturação das DCs, o antígeno-alvo e a via de administração (25).

A princípio, as moléculas de superfície que serão alvos dos anticorpos devem ser específicas para DCs, evitando ao máximo o processamento dos antígenos por outros tipos celulares e possíveis resultados inespecíficos. Além disso, essas moléculas de superfície devem ser receptores endocíticos com capacidade de promover o processamento e apresentação de antígenos de interesse.

Outro fato que precisa ser levado em consideração quando da utilização do direcionamento de antígenos é a existência de algumas particularidades que envolvem os receptores endocíticos, quanto à expressão, em diferentes subtipo de DCs, e quanto as vias intracelulares de processamento dos antígenos (52).

Exemplos disso são os receptores DEC205 e MMR. No caso do receptor DEC205, os antígenos são reciclados através de endossomos 'tardios', ou endossomos ricos em produtos para MHC II. Ao passo que o MR (do inglês 'mannose receptor'), um receptor homólogo ao DEC205, expresso em DCs, têm como alvo endossomos iniciais (53).

Sendo que ambos medeiam a endocitose de antígenos e possuem domínios citosólicos com sequência de sinalização (54-55), seria esperado que as vias de reciclagem através de endossomos e a apresentação de antígenos ocorressem de forma parecida. Mas o DEC205 tem como alvos lisossomos em desenvolvimento no citoplasma da célula, fato que em comparação com outros membros da mesma família de receptores, o torna superior na apresentação de antígenos (56). Por essa via, as moléculas endocitadas são inicialmente entregues em vesículas para endossomos 'tardios', onde o pH levemente ácido possibilita a digestão hidrolítica e o subsequente amadurecimento do lisossomo (57). E essa seletividade quanto aos lisossomos, está vinculada à presença de uma porção distal presente na cauda citoplasmática do receptor DEC205, que apresenta uma tríade ácida, necessária para reciclar não somente por endossomos 'iniciais', mas , principalmente, através de endossomos 'tardios' positivos para MHC II (53). DCs DEC205⁺ também são capazes de fazer apresentação cruzada de antígenos, o que ocorre quando

moléculas endocitadas e processadas são apresentadas através de moléculas do MHC I. Em camundongos esse fenótipo de DCs está associado com uma melhor eficiência em realizar apresentação cruzada de antígenos, fato que pode ser explicado pela alta expressão de proteínas envolvidas na apresentação de antígenos via moléculas do MHC I (58).

Além das vias de processamento de antígenos diferenciadas para receptores distintos, de forma particular, a expressão desses receptores também está vinculada a diferentes subtipos de DCs, que podem determinar a resposta imunológica que será formada. Por exemplo, DCs CD8⁺ expressam DEC205 e Langerina (59-60), enquanto que as DCs CD8⁻ expressam DCIR2 (58). No caso de infecções pelo *Plasmodium*, como citado anteriormente, estudos recentes demonstram que, em infecções pelo *P. chabaudi* as DCs convencionais, são as principais células envolvidas na apresentação de antígenos do parasito e ativação de células T CD4⁺(61), que quando ativadas produzem IFN- γ , IL-2 e IL-4 (62), importantes citocinas que medeiam a resposta pro - inflamatória.

Vários estudos têm demonstrado a eficiência do direcionamento de antígenos, utilizando como alvo o receptor endocítico DEC205 em diferentes modelos de infecção.

Em 2001, *Hawiger e cols.* (63) demonstraram a necessidade da utilização de estímulos de maturação para as DCs, na indução de resposta imune utilizando o direcionamento de antígenos. Nesse estudo o anticorpo híbrido, α DEC205 acoplado a proteína HEL (do inglês 'hen egg lysozyme'), foi utilizado em testes de imunização, com ou sem estímulo de maturação. Camundongos imunizados apenas com o anticorpo híbrido desenvolveram tolerância ao antígeno, com deleção de células T específicas ao antígeno. Por outro lado, a imunização com anticorpo híbrido juntamente com um estímulo de maturação promoveu ativação prolongada de células T e imunidade. Da mesma forma, *Bonifaz e cols.* (64), utilizando anticorpo α DEC205 acoplado a OVA, também observaram a geração de tolerância em testes de imunização sem estimulação, fato que se modificou quando a imunização ocorreu juntamente com α CD40, um estímulo de maturação que levou à ativação prolongada de células T CD4⁺ e CD8⁺ (63-64). Em modelo de EAE (encefalite experimental aguda) o direcionamento de antígenos também foi capaz de induzir tolerância à

MOG (65), (do inglês 'myelin oligodendrocyte glycoprotein'), peptídeo que induz a inflamação (66-67).

O mAb α DEC205 acoplado à OVA, foi utilizado em outro estudo, no qual camundongos foram imunizados com o anticorpo híbrido juntamente com dois estímulos de maturação, α CD40 e poly I:C. A geração de resposta específica foi medida contra o hapteno NP após imunização com a proteína OVA-NP. *Boscardin e cols* (68) observaram a geração de uma resposta de células T auxiliares capaz de orquestrar a geração de uma resposta humoral específica.

Da mesma forma a proteína circunsporozoíta, expressa na fase pré-eritrocítica do *Plasmodium*, utilizada em fusão com anticorpo monoclonal, que reconhece o receptor DEC205 (68), foi efetiva na geração de resposta de células T, auxiliando na geração de anticorpos contra a proteína em questão.

A ativação do sistema imune, também foi observada em estudos com a proteína Gag p24, expressa pelo HIV, direcionada para as DCs utilizando anticorpos contra o receptor DEC205. Nesse caso o direcionamento foi capaz de aumentar a produção de IFN- γ e IL-2 por células T CD4⁺ (69) e de levar à proteção, dependente de células T CD4⁺ e produção de IFN- γ , ao desafio com vírus vaccínia expressando gag recombinante (70).

Em estudos utilizando LcrV, um antígeno bacteriano de *Yersinia pestis*, o direcionamento para DCs foi efetivo em gerar resposta imune celular com aumento de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e resposta imune humoral com produção de anticorpos IgG2a e IgG2c específicos (71).

2 OBJETIVOS

A resposta imune contra o *Plasmodium*, apesar de ser induzida não promove proteção a novas infecções. Em modelos animais de infecção pelo *P. falciparum*, a proteína MSP-1₍₁₉₎, tem sido amplamente estudada como antígeno vacinal potencial, visto que anticorpos específicos têm a capacidade de bloquear a reinvasão de eritrócitos *in vitro* e conferir proteção a desafios prévios em ensaios de transferência adotiva, *in vivo*. Sabendo que a resposta contra a MSP-1₍₁₉₎ tem capacidade protetora, existe a necessidade de se desenvolver métodos que promovam a indução de uma resposta duradoura, que seja capaz de conferir proteção prévia à infecção.

Diversos estudos demonstram a capacidade do modelo vacinal de direcionamento de antígenos para DCs em gerar resposta imune humoral e celular antígeno específica, mediante estímulos de maturação, como α CD40 e poly I:C.

Por isso o objetivo desse trabalho foi produzir um anticorpo monoclonal específico para o receptor endocítico DEC205 presente em células dendríticas acoplado a proteína MSP-1₍₁₉₎ de *P. chabaudi*, modelo de infecção que mimetiza algumas das características da infecção pelo *P. falciparum* em humanos (72).

As etapas do trabalho desenvolvido estão listadas abaixo:

1. Amplificação da porção codificante do gene que codifica para MSP-1₍₁₉₎ a partir do RNA total do extrato do parasito;
2. Clonagem do cDNA da proteína MSP-1₍₁₉₎ nos vetores pGEM-T e pCR-TOPO2.1;
3. Sub-clonagem no vetor pET28a, para expressão em cepas bacterianas e nos vetores que contêm a porção codificante da cadeia pesada do anticorpo monoclonal α DEC 205 e um controle isotípico;
4. Expressão *in vitro* e purificação por cromatografia de afinidade da proteína recombinante e dos anticorpos híbridos;
5. Caracterização dos anticorpos monoclonais;
6. Análise do perfil de resposta humoral gerada pela imunização com anticorpos híbridos.

3 METODOLOGIA

3.1 SOLUÇÕES E REAGENTES

3.1.1 Preparação de Bactérias Competentes

- Solução I: Cloreto de Cálcio 0,1 M em água MiliQ estéril
- Solução II: Cloreto de Cálcio 0,1 M, 15% Glicerol em água MiliQ estéril

3.1.2 Eletroforese em Gel de Agarose

- Tampão TAE: Tampão Tris-acetato 40 mM pH 8,5, EDTA 1 mM pH 8,5
- Gel de Agarose: 1 a 2% em tampão TAE
- Tampão de Amostra 6x: Azul de Bromofenol 0,25% e Glicerol 30%

3.1.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

- Acrilamida 30%: 29% Acrilamida e N,N-metilenobisacrilamida 1%
- Tampão Tris-HCl pH 8,8: Tampão Tris-HCl 1 M pH 8,8
- Tampão Tris-HCl pH 6,8: Tampão Tris-HCl 1 M pH 6,8
- SDS: Solução de SDS 10%
- TEMED
- APS: Solução de Persulfato de Amônio 10%
- Tampão de Amostra com agente redutor 5 x: Tampão Tris-HCl 60 mM pH 6,8, Azul de Bromofenol 0,3%, Glicerol 20%, β -Mercaptoetanol 25% e SDS 4%
- Tampão de Amostra sem agente redutor 5x: Tampão Tris-HCl 60 mM pH 6,8, Azul de Bromofenol 0,3%, Glicerol 20% e SDS 4%
- Tampão de 'Corrida': Tampão Tris-HCl 25 mM, Glicina 200 mM e SDS 0,1%
- Solução Corante: Azul de Coomassie G250 0,25%, Ácido Acético Glacial 10% e Etanol 45%
- Solução Descorante: Ácido Acético Glacial 10% e Etanol 30%

3.1.4 Western Blot

- Tampão de Transferência: Solução Tris-HCl 25 mM pH 8,3, Glicina 200 mM e Metanol 20%
- PBS: Cloreto de Potássio 2,7 mM, Cloreto de Sódio 137 mM, Fosfato Dibásico de Sódio 8,1mM e Fosfato Monobásico de Potássio 1,5 mM. Ao final do preparo o pH da solução deve ser acertado para 7,4.
- Tampão de 'Bloqueio': Leite Desnatado 5% em PBS e Tween 20 0,05%
- Tampão de 'Lavagem': PBS e Tween 20 0,05%
- Corante Vermelho de Ponceau: Ponceau S 0,5% em Ácido Acético Glacial 10%
- Solução de Revelação: 0,05% DAB e 0,02% H_2O_2 em PBS

3.1.5 ELISA

- PBS: Cloreto de Potássio 2,7 mM, Cloreto de Sódio 137 mM, Fosfato Dibásico de Sódio 8,1mM e Fosfato Monobásico de Potássio 1,5 mM. Ao final do preparo o pH da solução deve ser acertado para 7,4.
- Tampão de 'Lavagem': PBS e Tween 20 0,05%
- Tampão de 'Bloqueio': PBS, Tween 20 0,05% e BSA 1%
- Solução Reveladora: TMB ou OPD
- Solução que interrompe a reação de revelação: Ácido Sulfúrico 4 N

3.1.6 ELISPOT

- Tampão para sensibilização das placas: 'Coating Buffer Powder' eBioscience
- Anticorpo de captura 250x eBioscience
- Anticorpo de detecção biotilado 250x eBioscience
- Estreptavidina 250x eBioscience
- Tampão de Bloqueio: RPMI suplementado com 10%FBS
- PBS: Cloreto de Potássio 2,7 mM, Cloreto de Sódio 137 mM, Fosfato Dibásico de Sódio 8,1mM e Fosfato Monobásico de Potássio 1,5 mM. Ao final do preparo o pH da solução deve ser acertado para 7,4.
- Tampão de 'Lavagem': PBS e Tween 20 0,05%

3.1.7 Cromatografia de Afinidade

- Tampão de 'Sonicação': Fosfato de Sódio Monobásico 60mM e Cloreto de Sódio 200 mM em água MiliQ autoclavada pH 7
- Tampão de 'lavagem' para Cromatografia de Afinidade a Cauda de Histidina: Fosfato de Sódio Monobásico 60 mM, Cloreto de Sódio 200mM e Glicerina 10% em água MiliQ autoclavada pH 6.
- Tampão de 'lavagem' para Cromatografia de Afinidade a Proteína G: PBS
- Tampão de Eluição para Cromatografia de Afinidade a Cauda de Histidina: Tampão de 'lavagem' com 200 mM de Imidazol.
- Tampão de Eluição para Cromatografia de Afinidade a Proteína G: Tampão Tris-Glicina 0,1 M pH 2. Acrescentar em cada microtubo 50 uL de tampão TRIS 1 M pH 8 antes de eluir.

3.1.8 Transfecção

- Meio de Cultivo Celular Eucariótico *in vitro*: DMEM suplementado com Bicarbonato de Sódio 45 mM, HEPES 25 mM e 5% de FBS (soro fetal bovino) 'ultra low IgG'.
- PEI (polietilenoimina): Concentração de 0,45 mg/mL
- Clones: 10 ug/placa de cada construção, ou seja, da construção que carrega a cadeia leve do anticorpo monoclonal α DEC205, que carrega a cadeia pesada do anticorpo monoclonal α DEC205 conjugada a porção codificante da MSP-1₍₁₉₎ de *P. chabaudi* e uma construção que carrega a porção codificante de uma enzima que auxilia no 'dobramento' correto do anticorpo denominado pHELPER.

3.1.9 Extração de DNA Plasmidial

- Solução I: TRIS 25 mM pH 8, EDTA 10 mM e RNase A
- Solução II: NaOH 200 mM e SDS 1%
- Solução III: Ácido Acético 5 M e Acetato de Sódio 3 M
- Solução de Clorofórmio: 24 partes de clorofórmio e 1 parte de Álcool Isoamílico

- Isopropanol 100%
- Etanol 75%

3.1.10 Ensaios de Viabilidade e Especificidade dos Anticorpos Híbridos

- Meio de cultura RPMI suplementado 10% FBS
- Solução para lise de eritrócitos (ACK)
- Tampão para marcação de células ('Staining Buffer'): PBS, 0,1% de Azida Sódica e 2% de Soro Fetal Bovino
- Corante Trypan Blue 0,4%

3.2 CEPAS BACTERIANAS

3.2.1 Meios de Cultura

Os meios de cultura para cultivo bacteriano foram esterilizados por autoclavagem à 121 °C por 20 min. Os meios sólidos foram plaqueados após o resfriamento e adição dos antibióticos de interesse.

- Meio de Cultura Líquido
 - LB: Triptona 1%, Extrato de Levedura 0,5% e NaCl 1%
- Meio de Cultura Sólido
 - LB: Triptona 1%, Extrato de Levedura 0,5%, NaCl 1% e Ágar 1,5%

3.2.2 Linhagens Bacterianas

As características das linhagens bacterianas utilizadas para expressão da proteína recombinante são descritas na tabela abaixo.

Tabela 1 - Descrição das linhagens de *Escherichia coli* utilizadas.

Linhagem Bacteriana	Características
DH10	Cepa utilizada para clonagens e obtenção de material plasmidial.
DH5 α	Cepa utilizada para clonagens e obtenção de material plasmidial.
BL21 DE3	Cepa utilizada para a expressão de proteínas recombinantes. Possui o gene da T7 RNA polimerase integrado ao cromossomo (λ DE3) sob controle do promotor <i>lacUV5</i> , induzível por IPTG.

3.2.3 Preparo das Bactérias Competentes

Uma colônia isolada de bactéria que cresceu por 18 h a 37°C em placa de LB ágar, sem antibiótico, foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido por 18 h à 37°C sob agitação orbital. O pré-inóculo foi diluído na proporção de 1:40 em 200 mL de meio LB líquido e incubado sob agitação orbital a 37 °C até atingir a DO_{600nm} entre 0,5 e 0,8. Nesse momento o frasco foi retirado da incubadora e deixado no gelo por 30 min. As células foram centrifugadas a 3000 RPM por 10 min 4 °C e depois ressuspensas cuidadosamente em 75 mL de tampão 0,1 M de cloreto de cálcio, previamente esterilizado por filtração em membrana de 25 μ m sob fluxo laminar, e incubadas no gelo 1-12 h. Passado esse período, foram novamente centrifugadas (3000 RPM por 10 min a 4 °C) e ressuspensas cuidadosamente em 2 mL de tampão cloreto de cálcio 0,1 M com 15% de glicerol, também estéril e colocadas em alíquotas de 50 μ L, incubadas no gelo seco e estocadas a -80 °C.

3.2.4 Transformação de Bactérias Competentes

As linhagens de bactérias competentes foram transformadas conforme o método de ‘choque térmico’ como em Sambrook 2001, descrito a seguir.

Às alíquotas de 20 μ L da suspensão de células competentes foi adicionado 5 μ L do produto das reações de ligação ou 1 μ L da solução de DNA plasmidial e 80 μ L da solução de cloreto de cálcio 0,1 M. A solução foi incubada no gelo e após 30 min foi submetida ao choque térmico a 42 °C por 40 segundos e novamente incubada a 4 °C por 5 min. Para recuperação da parede bacteriana foi adicionado 300 μ L de meio LB líquido a suspensão de células e estas foram incubadas a 37 °C sob agitação orbital por 90 min. Em seguida as células foram centrifugadas (2000RPM a

temperatura ambiente). Do sobrenadante, foram retirados 200 μ L, e o restante foi utilizado para homogeneizar cuidadosamente as células que foram plaqueadas em meio LB sólido seletivo. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 h.

3.3 VETORES

Os vetores que foram utilizados para clonagens e sub-clonagens das porções codificantes estão descritos na tabela a seguir, e seus desenhos representativos na figura 4.

Figura 4: Vetores de clonagem e sub-clonagem. Representação esquemática dos vetores utilizados para clonagem da porção codificante do gene da MSP-1₍₁₉₎, pGEM T (Promega) e pCR-TOPO 2.1 (Invitrogen), e para sub-clonagem em vetor de expressão em eucarioto pET28a (invitrogen).

Tabela 2 - Descrição das características dos vetores

Vetores	Características
pGEM-T Easy Vector (Promega)	Vetor utilizado para clonagem de produtos de PCR por ligação A-T. Possui <i>f1ori</i> , <i>amp^R</i> e <i>lacZ</i> . Permite a distinção entre colônias azuis (negativas) e brancas (positivas) quando é adicionado XGal ao meio de cultura.
pGEM-T Easy Vector (Promega)	Vetor utilizado para clonagem de produtos de PCR por ligação A-T. Permite a distinção entre colônias azuis (negativas) e brancas (positivas) quando é adicionado XGal ao meio de cultura.
pET28a (Novagen)	Vetor de sub-clonagem e expressão de proteínas recombinantes em <i>E.coli</i> . Possui <i>f1ori</i> , <i>Kan^R</i> e <i>lacI</i> . A expressão da proteína de interesse fica sob controle da T7RNAPol, induzida pela adição de IPTG ao meio de cultura seletivo.

3.3.1 Amplificação do Inserto

A porção codificante do gene da MSP-1₍₁₉₎ de *Plasmodium chabaudi* (cepa AS) foi obtida a partir do RNA total do extrato do parasito tratado com DNase.

Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para sub-clonagem. (*Porção dos oligonucleotídeos iniciadores necessária para refazer os sítios de restrição das enzimas *Bam* HI, *Eco* RI, *Xho* I e *Not* I.)

Vetor	*Oligonucleotídeos Iniciadores 5'-3'	Sítios de Restrição
pGEM-T	F: <u>GGATCC</u> TTTGATATTTTAATGG R: <u>GAATTC</u> ATCCGGAAGAAGCTC	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI
pET28a	F: <u>GGATCC</u> TTTGATATTTTAATGG R: <u>GAATTC</u> ATCCGGAAGAAGCTC	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI
pCR-TOPO 2.1	F: <u>CTCGAGGG</u> ATTCGGTAGGTTCTTTGATATTTTAATGGCAAATTTAG R: <u>GGCCGCTC</u> ATCCGGAAGAAGCTACAGAA	<i>Not</i> I/ <i>Xho</i> I
DEC	F: <u>CTCGAGGG</u> ATTCGGTAGGTTCTTTGATATTTTAATGGCAAATTTAG R: <u>GGCCGCTC</u> ATCCGGAAGAAGCTACAGAA	<i>Not</i> I/ <i>Xho</i> I
ISO	F: <u>CTCGAGGG</u> ATTCGGTAGGTTCTTTGATATTTTAATGGCAAATTTAG R: <u>GGCCGCTC</u> ATCCGGAAGAAGCTACAGAA	<i>Not</i> I/ <i>Xho</i> I

Tabela 4 - Reação para amplificação da porção codificante da MSP-1₍₁₉₎ por PCR.

Componente	Volume/ Reação	Concentração final
Água MiliQ estéril	16,75 μ L	-
Tampão para Reação 10x	2,5 μ L	1x
Cloreto de Magnésio 50mM	1,0 μ L	2mM
Primer <i>Forward</i> 10mM	1,0 μ L	0,2mM
Primer <i>Reverse</i> 10mM	1,0 μ L	0,2mM
dNTP 10mM	1,0 μ L	0,2mM
Enzima <i>Taq</i>	0,25 μ L	0,01U/ μ L
DNA molde (50ng/ μ L)	2 μ L	-

3.3.2 Clonagem da Porção Codificante

O DNA obtido das amplificações foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e purificado utilizando kit QIAquick Gel extraction (Qiagen). Depois, fizemos a reação de ligação do inserto ao vetor de clonagem pGEM-T à temperatura ambiente por 2 h, e ao vetor pCR2.1-TOPO a 14 °C por 18 h.

Tabela 5- Reação para ligação da porção codificante da MSP-1₍₁₉₎ em vetor pGEM-T e em vetor PCR-TOPO 2.1.

Componente	pGEM-T	pCR-TOPO 2.1	Concentração final
Água MiliQ estéril	-	5,5 μ L	-
Tampão para Reação	2,5 μ L	1 μ L	1x
Enzima <i>T4 DNA Ligase</i>	1,0 μ L	1,0 μ L	1U/ μ L
DNA Inserto	0,5 μ L	0,5 μ L	-
DNA Vetor	2 μ L	2 μ L	-

3.3.3 Sub-clonagem da Porção Codificante

Dos clones analisados como positivos para pGEM-T/MSP-1₍₁₉₎ pela análise de restrição e sequenciamento, foi escolhido um para prosseguir com as reações de PCR para amplificação da porção codificante da MSP-1₍₁₉₎.

O vetor pET28a e uma alíquota dos insertos de MSP-1₍₁₉₎ foram hidrolisados com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Eco* RI, enquanto os vetores DEC, ISO e uma alíquota dos insertos de MSP-1₍₁₉₎ foram hidrolisadas com *Xho* I e *Not* I. Os produtos dessas hidrólises foram purificados a partir de bandas de gel de agarose com a utilização de kits, e suas concentrações estimadas por eletroforese em gel de agarose 1% (73). As reações de ligação foram estipuladas para ocorrerem na proporção de 1 molécula de vetor para 3 moléculas de inserto.

3.4 Procedimentos Comuns às Etapas de Clonagem e Sub-clonagem

3.4.1 Seleção dos Clones Recombinantes

O DNA resultante das reações de ligação foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* cepas DH10B e DH5 α por choque térmico. Após a extração de DNA plasmidial, os clones foram checados por análise de restrição, PCR e seqüenciamento.

Tabela 6 - Análise por enzima de restrição.

Componente	Volume	Concentração final
Água MiliQ estéril	5 μ L	-
Tampão para Reação 10x	1 μ L	1 x
Enzima	0,5 μ L	2 U/ μ L
DNA dos Clones (200ng)	3,5 μ L	-

Tabela 7 - Enzimas utilizadas nas análises de restrição.

Clone	Enzimas de Restrição
pGEM-T/MSP-1 ₍₁₉₎	<i>Eco</i> RI
pCR.TOPO2.1/MSP-1 ₍₁₉₎	<i>Xho</i> I/ <i>Not</i> I
pET28a/MSP-1 ₍₁₉₎	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI
DEC205/MSP-1 ₍₁₉₎	<i>Xho</i> I/ <i>Not</i> I
ISO/MSP-1 ₍₁₉₎	<i>Xho</i> I/ <i>Not</i> I

3.4.2 Extração de DNA Plasmidial

Das colônias obtidas, foram inoculadas em meio seletivo para cultivo a 37 °C por 18 h para que fosse realizada a extração de DNA plasmidial por lise alcalina como em *Sambrook* (2001), descrito a seguir.

Os inóculos foram centrifugados em microtubos de 2 mL, e as células ressuspensas em 200 μ L de solução I e mantidas por 5 min à TA. Em seguida, acrescentou-se às amostras 200 μ L da solução II, misturadas suavemente por inversão, e após 10 min de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 200 μ L de solução III. As amostras foram agitadas suavemente e incubadas por 5 min à temperatura ambiente, e, em seguida, foram centrifugadas por 15 min a 12000 RPM. Ao sobrenadante em novos tubos foi adicionado 500 μ L da solução de Clorofórmio/Álcool Isoamílico; as amostras foram agitadas suavemente por 30s, e centrifugadas a 12000 RPM por 5 min. O DNA, presente no sobrenadante, foi transferido para um novo microtubo onde foi precipitado por desidratação, utilizando-se 900 μ L de Isopropanol 100% por 10 min à temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi centrifugada por 15 min a 12000 RPM, e o precipitado foi lavado com etanol 75%, e centrifugado por 5 min a 12000 RPM. Após a secagem por 30 min, o DNA foi ressuspensado em 30 μ L de água livre de DNase/RNase.

3.4.3 Sequenciamento de DNA

Os sequenciamentos foram realizados pelo método da terminação da cadeia por ddNTPs (74), e adaptado para sequenciador automático. Os primers utilizados no sequenciamento dos fragmentos gênicos clonados são especificados na tabela abaixo.

Tabela 8 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de sequenciamento

Vetor	Primers	Sequência
pGEM-T Easy Vector	T7 Forward	5' TAATACGACTCACTATAGG 3'
	SP6 Reverse	5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'
pCR-TOPO 2.1	M13 Forward	5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'
	M13 Reverse	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
pET28a	T7 Forward	5' TAATACGACTCACTATAGG 3'
	T7 Reverse	5' TATGCTAGTTATTGCTCAG 3'
DEC205	M13 Forward	5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'
	M13 Reverse	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
ISO	M13 Forward	5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'
	M13 Reverse	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

As reações de sequenciamentos foram realizadas em microtubos utilizando entre 100 ng e 200 ng de DNA plasmidial e o reagente '*Big Dye Terminator*' (Applied Biosystems), uma solução contendo a enzima DNA polimerase e ddNTPs, sendo cada base nitrogenada ligada a diferentes fluoróforos. O DNA obtido após a reação de PCR foi precipitado, por desidratação, utilizando 90 μ L de isopropanol 66% por 15 min a temperatura ambiente. Passado esse período foram submetidos a centrifugação por 20 min a 15300 g e o sobrenadante foi retirado com micropipeta. As amostras foram lavadas com etanol 70% e novamente centrifugadas por 10 min a 15300 g. Após o descarte do sobrenadante, o DNA precipitado foi estocado a -20 °C e entregue para sequenciamento no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II, na Universidade de São Paulo.

3.5 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

A porção codificante da proteína MSP-1₍₁₉₎ foi clonada em diferentes vetores, com o objetivo de obtermos a proteína recombinante e os anticorpos híbridos expressos *in vitro* no modelo procarioto em *E. coli*, assim como no modelo eucarioto de expressão em células HEK293T (ATCC CRL-11268™), respectivamente.

3.5.1 Expressão da Proteína MSP-1₍₁₉₎ em *Escherichia coli*

Os testes de indução para padronização da expressão da proteína recombinante, no modelo de expressão *in vitro* em procarioto foram realizados com o clone pET28a/MSP-1₍₁₉₎, utilizando cepas transformadas por 'choque-térmico' de

E. coli DE3. A partir de um pré-inóculo contendo 5 mL de meio LB seletivo com ampicilina, incubado por 18 h a 37 °C sob agitação orbital, fez-se um inóculo em 50 mL de meio seletivo, igual ao anterior, na proporção de 1:100, o qual foi incubado por aproximadamente 3 h a 37 °C sob agitação orbital, até atingir uma DO_{600nm} entre 0,5 e 0,6. Após esse período, o frasco foi retirado da incubação e separado em alíquotas de 5 mL, às quais foi acrescentado IPTG, um indutor da transcrição de proteínas reguladas pelo promotor T7, em diferentes concentrações. Os inóculos foram então mantidos por mais 4 h à 37 °C sob agitação, e depois centrifugados. O precipitado de células foi ressuspensionado em 150 μ L de água, depois acrescentado 50 μ L de tampão de amostra para proteínas 5 x com redução, seguindo o procedimento padrão para submeter às amostras a SDS-PAGE, tornando possível a visualização dos extratos celulares não induzidos e induzidos com diferentes concentrações de IPTG.

A expressão da proteína recombinante em maior quantidade foi realizada em frascos erlenmeyer de 2 L contendo 200 mL de meio de cultivo bacteriano seletivo. Após o período de indução, os extratos celulares, obtidos após a centrifugação do volume de crescimento, foram ressuspensionados em tampão de sonicação completo com PMSF 1 mM e lisozima na concentração de 20 μ g/mL. Após a ruptura dos extratos celulares, esses foram centrifugados para separação das porções de proteínas solúveis e insolúveis, sendo a porção solúvel utilizada para purificação da proteína MSP-1₍₁₉₎r de *P. chabaudi*.

3.5.2 Expressão dos Anticorpos Híbridos em Células HEK293T

Os anticorpos híbridos, denominados α DEC205/MSP-1₍₁₉₎, e seu controle isotípico, ISO/MSP-1₍₁₉₎, foram produzidos *in vitro* por transfecção transitória de células HEK293T (Figura 5) utilizando PEI, um polieletrólito positivamente carregado quando em solução aquosa, e de especial interesse devido à sua capacidade de se ligar a ácidos nucleicos, diminuindo a força de repulsão eletrostática que ocorre naturalmente entre componentes de cargas iguais, como é o caso do DNA e da membrana plasmática, possibilitando a transfecção celular.

Essas células foram cultivadas em meio DMEM completo, suplementado com 5 % de FBS com baixa concentração de imunoglobulinas, em placas com volume final de 20 mL cada. O procedimento foi realizado com as células apresentando uma

confluência de cerca de 80 %. Aproximadamente 10 μ g de DNA de cada clone – um que codifica a cadeia pesada dos anticorpos acoplada à porção codificante da MSP-1₍₁₉₎, e um que codifica a cadeia leve κ dos anticorpos – foram colocados em solução contendo PEI na concentração de 0,45 mg/mL por 10 min. Após esse período, foi adicionado 1 mL da solução à cada placa de cultura, por gotejamento.

Após uma semana em estufa à 37 °C e 95% de CO₂, o sobrenadante de cultura foi coletado e submetido à centrifugação (3000 RPM por 20 min), para retirada de restos celulares. Após filtração a 0,45 μ m, os anticorpos foram precipitados a partir do sobrenadante pela adição gradual de 60% do volume em massa de persulfato de amônio, mantido sob agitação constante a 4 °C por 18 h. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 5000 RPM por 30 min, sendo o precipitado ressuspendido em 25 mL de PBS gelado. Foi então adicionado ao ressuspendido PMSF 1 mM, e colocado em diálise contra 2 L de PBS gelado por 12 h, sendo o tampão trocado ao menos duas vezes durante esse período. A solução foi retirada da diálise, e os anticorpos purificados por cromatografia de afinidade à proteína G.

Figura 5: Produção de anticorpos híbridos. Esquema demonstrando o processo de transfecção transitória de células HEK203T *in vitro*. Células HEK203T mantidas em cultura a 37 °C e 5% CO₂. Três vetores diferentes foram utilizados na transfecção, um carregando a porção codificante do gene para cadeia pesada do mAb α DEC205 ou ISO, outro carregando a porção codificante da cadeia leve do anticorpo ou do seu controle isotípico e um terceiro carregando a porção codificante de uma enzima que auxilia no 'dobramento' correto da proteína e formação do anticorpo.

3.5.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Amostras das culturas induzidas e não induzidas com IPTG, assim como das frações coletadas na etapa de expressão das proteínas, foram analisadas por SDS-PAGE (75).

Os géis confeccionados com 1mm de espessura possuíam uma concentração de acrilamida de 5 % no gel de ‘empilhamento’, e de 12 % a 15 % no gel de ‘separação’. O tampão com agente redutor 5 X foi adicionado às amostras, e estas foram então aquecidas à 96 °C por 5 min. As eletroforeses foram efetuadas a 120 V, em tampão de corrida 1 x à temperatura ambiente. Os géis foram corados com solução corante por 1 h, e descorados com solução descorante até a visualização das bandas de proteínas.

3.6 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

3.6.1 Procedimentos Comuns às Cromatografias de Afinidade

3.6.1.1 Preparação da Coluna

Como a resina é conservada em etanol 20%, antes de iniciar o processo de purificação a resina deve ser lavada com no mínimo 25 volumes da coluna com tampão, antes de ser utilizada para purificação das proteínas. Para tal procedimento, colocamos a resina em um tubo falcon com 50 mL de tampão, centrifugamos a 2000 RPM por 15 min à 4 °C e removemos parte do sobrenadante, aproximadamente 40 mL. A resina foi ressuspensa nos 10 mL restantes de tampão. Com auxílio de micropipeta foi empacotada em suporte apropriado possibilitando a purificação da proteína recombinante.

3.6.1.2 Parâmetros da Cromatografia de Afinidade

O suporte utilizado para empacotamento da resina ligada a níquel, não possibilitava a utilização de bomba peristáltica. Por isso todo o processo foi determinado pela força gravitacional, sobre uma coluna de tampão com aproximadamente 12 mL, gerando um fluxo de 25 gotas/min.

Para a purificação da proteína, a resina empacotada foi equilibrada utilizando 25 volumes de tampão. O sobrenadante de cultura induzido com IPTG foi passado pela coluna. A resina foi lavada com 25 mL de tampão, retirando impurezas presentes no sobrenadante que possam ter ligado de forma inespecífica a resina. A proteína recombinante foi eluída utilizando 5 mL de solução contendo 500 mM de imidazol, que compete com o níquel pela ligação à His6.

3.6.1.3 Monitoramento da Cromatografia

O monitoramento da cromatografia foi realizado utilizando-se o método microanalítico com reagente de Bradford (76). Em placa de 96 poços, foram adicionados 20 μ L de amostra em 180 μ L do reagente. Como controle negativo, foi utilizado o tampão em que as amostras de proteína se encontravam diluídas. Sendo assim, foram selecionadas as amostras que continham proteína para posterior análise por SDS-PAGE.

3.6.1.4 Limpeza da Coluna após Purificação

Após a eluição da proteína a resina foi lavada com 10 mL de tampão de eluição, para que houvesse a completa remoção de material protéico da coluna e com 50 mL de tampão para completa retirada do imidazol. A resina foi armazenada em etanol 30% a 4 °C.

3.6.2 Cromatografia de Afinidade a Cauda de Histidina

Essa forma de cromatografia baseia-se na afinidade que o Níquel possui pelo aminoácido Histidina. Para facilitar a purificação da proteína, sub-clonamos a porção codificante da proteína em vetor de expressão em procarioto pET28a, que possui duas caudas de Histidina na sua sequência, uma na porção N'-terminal e outra na porção C'-terminal.

O volume de 2 mL da resina de microesferas de sefarose ligada a níquel, 'NI-NTA supreflow', foi lavada e equilibrada com 25 volumes da coluna, equivalente a 50 mL, com tampão. A coluna utilizada para realização da cromatografia, 'Poly-Prep Chromatography Columns Bio-Rad', não permite a utilização de bomba peristáltica

para controle do fluxo de passagem do tampão ou da amostra pela resina. Nesse caso a força exercida sobre a resina era da coluna de líquido acima da resina com mais ou menos 8 mL, gerando um fluxo de 25 gotas/min.

Após a lavagem e equilíbrio da coluna com tampão de lavagem, a porção de proteínas solúveis, obtida após a centrifugação do lisado celular, foi colocada na coluna. Após a passagem do sobrenadante, a resina foi lavada com 10 volumes de tampão, retirando qualquer proteína que tenha ficado ligada na resina de forma inespecífica. Para eluição, foi utilizado 5 mL de tampão contendo 500 mM de imidazol. Foram coletadas diversas frações de eluição, com 500 μ L cada, sendo a presença de proteínas acompanhada pelas reações com o reagente de Bradford.

3.6.3 Cromatografia de Afinidade a Proteína G

Os anticorpos híbridos foram purificados utilizando cromatografia de afinidade à proteína G. Para tal, o sobrenadante de cultura das células transfectadas foi coletado e passado na coluna, após a lavagem e equilíbrio da resina. As diferentes frações eluídas com tampão Glicina pH3 foram testadas para a presença de proteínas utilizando-se reagente de Bradford. À cada tubo utilizado para eluir foi adicionado 50 μ L de tampão TRIS 1 M pH 8, para equilibrar o pH da amostra evitando degradação.

3.6.4 Análise das Proteínas Purificadas

As proteínas purificadas e dialisadas em PBS foram analisadas, e sua concentração estimada após um SDS-PAGE, utilizando uma curva de concentração padrão de BSA, e de um anticorpo com concentração conhecida.

3.6.5 Proteína MSP-1₍₁₉₎ Recombinante

A proteína recombinante foi induzida, de forma parcial, na fração solúvel de proteínas extraída do lisado de células induzidas, sob as condições de 1 mM de IPTG por 4 h a 37 °C. O rendimento de expressão e purificação foi calculado com base no volume de meio de cultura induzido e na quantidade de proteína purificada.

3.6.6 Anticorpos Híbridos DEC205-MSP-1₍₁₉₎ e ISO-MSP-1₍₁₉₎

Da mesma forma que a proteína recombinante, o rendimento de expressão e purificação foi calculado com base no volume de meio de cultura coletado e da quantidade de proteínas obtidas. Testes para determinação da viabilidade e especificidade dos anticorpos foram realizados (Figura 6).

Figura 6: Representação esquemática do ensaio de determinação da viabilidade dos anticorpos híbridos. Para tal foram utilizadas células CHO transgênicas, expressando diferentes receptores (DEC205 de camundongo, DEC205 de humanos e DCIR2). 1º Passo) Diferentes concentrações dos anticorpos híbridos foram incubadas com células CHO expressando diferentes receptores. 2º Passo) Após 15min as células foram lavadas e incubadas com anticorpo α IgG1 ligado ao fluoróforo PE. As células foram adquiridas em citômetro de fluxo (FACSCANTO II BD Biosciences).

Células CHO expressando diferentes receptores - DEC-205 de camundongo, DEC205 de humano ou DCIR2 de camundongo - foram plaqueadas 3×10^5 células e incubadas com diferentes concentrações do mAb (10 μ g/mL, 1 μ g/mL, 0,1 μ g/mL) α -DEC205/MSP-1₍₁₉₎ ou seu controle isotípico, ISO-MSP-1₍₁₉₎. Após 30 min, as células foram lavadas com tampão de FACS. As células foram incubadas no gelo com anticorpo de rato anti-IgG1 de camundongo, conjugado ao fluoróforo PE na diluição 1:2000 por 15 min. As células foram novamente lavadas com tampão salino e lidas utilizando citometria de fluxo. A análise desses experimentos foi realizada utilizando-se o software FlowJo (TreeStar Inc.).

3.7 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS (ELISA e western blot)

3.7.1 Reconhecimento de proteínas por 'western blot'

Proteínas foram separadas por SDS-PAGE por 45 min a 100 V, na concentração de 12-15% de acrilamida, sendo que, na maioria dos casos, submetidas a condições redutoras com DTT. Após a separação foram transferidas para membrana de nitrocelulose – Hybond ECL Nitrocellulose Membrane AmershamTM, por 2 h a 200 v.

Depois de avaliada a eficiência de transferência, a membrana foi incubada com solução de bloqueio por 2 h a temperatura ambiente, ou por 16 h a no gelo, sob agitação orbital. Após sucessivas lavagens utilizando PBS-Tween 0,05%, a membrana foi incubada com anticorpo primário por 2 h à temperatura ambiente sob agitação orbital. Foram efetuadas três lavagens de 10min cada, e o anticorpo secundário conjugado à HRP ou à proteína A conjugada a HRP, foi adicionado na diluição de 1:10000, permanecendo por 1 h a temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando o kit quimioluminescência ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare-Amersham).

3.7.2 Quantificação dos níveis séricos de anticorpos por 'ELISA'

Microplacas de 96 poços (High Binding Polystyrene Corning) foram sensibilizadas com proteína MSP-1_{(19)r} ou extrato total do parasito, que variaram

entre 200 e 400 ng/poço em PBS por 16 h a temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com solução de PBS-Tween 0,02% entre as diferentes incubações. Possíveis sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados com solução contendo BSA 0,25% por 4 h a temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens, os soros dos animais foram aplicados numa diluição de 1:50 e incubadas por 2 h a TA. Em seguida os anticorpos secundários α lgG1, α lgG2a e α lgM foram incubados na diluição 1:4000, 1:1000 e 1:3000, respectivamente.

A reação foi revelada durante 15min após a adição de solução de revelação, contendo TMB ou OPD, e interrompida pela adição de H_2SO_4 4 N. A intensidade da coloração foi determinada pela medida da absorbância a 450 nm ou 490 nm.

3.7.3 *ELISPOT*

No dia anterior a coleta dos baços de camundongos imunizados, o anticorpo de captura 250 x (eBioscience), sob condições estéreis em capela de fluxo laminar, foi diluído em tampão estéril específico para a sensibilização da membrana de PVDF da placa de ELISPOT (Milipore-MultiScreen filter plates). Adicionados 100 μL por poço da diluição do anticorpo, a placa foi incubada a 4 °C por 16-18 h. Passado esse período, possíveis sítios de ligação inespecífica dos poços, foram bloqueados, utilizando meio RPMI suplementado com 10% FBS estéril, por 1 h à temperatura ambiente. Nesse os animais foram sacrificados para retirada do baço. Os órgãos foram macerados utilizando 'cell strainer' e as células obtidas foram lavadas utilizando meio RPMI suplementado e centrifugadas a 1700 RPM a 4°C por 5 min. Após a contagem do número de células utilizando câmara de Neubauer, 3×10^5 células foram plaqueadas por poço e o meio contendo IL-2r, na concentração final de 30U/mL, e a proteína recombinante, nas concentrações finais de 10 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 0,1 $\mu\text{g/mL}$, foi adicionado em seus respectivos poços. Para controle positivo do experimento foi utilizado meio contendo IL-2r e Con A, na concentração final de 2,5 $\mu\text{g/mL}$. As células foram incubadas na estufa de CO_2 a 37°C por 24 horas. Após esse período a placa foi lavada utilizando solução de PBS-Tween 0,05% por 3 vezes e a cada poço foi adicionado 100 μL da solução do anticorpo de detecção 250 x (eBioscience). Passadas 2 h à temperatura ambiente a placa foi novamente lavada e incubado com estreptavidina ligada a HRP 250 x (eBioscience) Passados 45 min à

temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada e revelada utilizando solução reveladora (substrato AEC), por aproximadamente 30 min. A leitura do 'spots' foi realizada em leitor próprio, gentilmente cedido pelo laboratório do Prof^o Edécio Cunha Neto, na Faculdade de Medicina, na Universidade de São Paulo.

3.7.4 *Análise Estatística*

Análises estatísticas foram realizadas utilizando método estatístico ANOVA, para determinação de significância entre diferentes grupos com $p < 0,05$.

3.8 *ENSAIOS DE VIABILIDADE DOS ANTICORPOS*

Células da linhagem CHO, expressando diferentes receptores, esplenócitos totais, de camundongos com DCs expressando YFP e camundongos WT, ou células de linfonodos de camundongos WT, foram utilizadas, em ensaios *in vitro* e *ex vivo*, para determinar a capacidade do anticorpo em reconhecer o receptor DEC205 de forma específica.

A coleta de células do baço e LN para experimentos *ex vivo*, ocorreu no dia dos referidos experimentos, quando os camundongos foram sacrificados e os órgãos coletados. No caso dos LN drenantes foram utilizados os inguinais, poplíteos, axilares, ilíacos e braquiais.

Todos os órgãos foram macerados e as células separadas utilizando 'cell strainer' (BD Falcon 100 μ m). Após a primeira lavagem, utilizando meio de cultura RPMI completo, os eritrócitos foram retirados utilizando solução de lise.

Mantidas a no gelo, a solução de células foi ressuspendida, e a quantidade de células estimada através da contagem da câmara de Neubauer, utilizando solução de 'Trypan Blue', para observarmos a viabilidade das células.

As células foram incubadas com anticorpos que reconhecem e bloqueiam receptores da porção Fc na membrana das células, na concentração de 1:100. Após 15min foram plaqueadas 5×10^6 células/poço e incubadas a no gelo com as diferentes concentrações de anticorpos híbridos. Após 40 min, as células foram lavadas com tampão de FACS, e incubadas no gelo com anticorpo secundário α IgG1 conjugado ao fluoróforo PE. Passados mais 40 min as células foram lavadas,

ressuspendidas e adquiridas por citômetro de fluxo. Os resultados foram analisados utilizando programa FlowJo.

4 RESULTADOS

4.1 CLONAGEM E SUB-CLONAGEM

O extrato total de parasitos foi obtido a partir de eritrócitos infectados lisados com saponina, próximo ao momento da esquizogonia. Ao extrato total foi acrescentado fenol, sendo o RNA total precipitado com etanol. Aproximadamente 2 μ g de RNA total foi tratado com DNase e utilizado para reação de cDNA por transcriptase reversa. Utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, amplificamos a porção codificante do gene da MSP-1₍₁₉₎, a partir do cDNA obtido (Figura 7).

Figura 7: Amplificação da porção codificante da MSP-1₍₁₉₎. RNA total foi obtido a partir do extrato total do parasito, tratado com DNase e submetido a reação de transcrição reversa. A porção codificante do gene que codifica para MSP-1₍₁₉₎ foi amplificada, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, a partir do cDNA do extrato total de *P.chabaudi*, e submetido a eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Pode-se observar a amplificação de 500pb correspondente a porção codificante do gene.

A porção codificante amplificada foi clonada em vetor pGEM T e o produto da ligação vetor-inserto foi utilizado para transformação de bactérias *E. coli* BL21 DH5 α , que após terem sido cultivadas em meio seletivo, contendo ampicilina, seu extrato celular foi utilizado para extração de DNA plasmidial utilizando lise alcalina.

O DNA obtido foi utilizado para amplificação da porção codificante da MSP-1₍₁₉₎ com diferentes primers. Isso ocorreu devido à necessidade da inserção de diferentes sítios de restrição na sequência dos oligonucleotídeos. Sítios para as endonucleases *Bam* HI e *Eco* RI foram inseridos na porção codificante para sub-clonagem em vetor de expressão em procaritoto pET28a. Para sub-clonagem em vetor de expressão em eucarioto, os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados de forma que uma porção do 'linker' (Figura 8) na sequência Fc do anticorpo monoclonal, fosse reconstituída, tendo sido deletada no momento da hidrólise do vetor para sub-clonagem, além da reconstituição de sítios para as enzimas *Xho* I e *Not* I (Figura 9). Em vetor pCR-TOPO 2.1 sub-clonamos a porção codificante amplificada com primers para sub-clonagem em vetores de expressão em eucarioto.

Figura 8: Anticorpos Híbridos. Desenho esquemático mostrando a MSP-1r ligada a cadeia pesada do mAb por meio do 'Linker'.

Figura 9: Representação esquemática da sequência codificante do gene da MSP-1₍₁₉₎ sub-clonada em vetor que carrega a cadeia pesada do anticorpo monoclonal α DEC205. A sub-clonagem foi realizada entre os sítios para as enzimas de restrição de *Xho* I e *Not* I. Como pode ser observada na representação, a análise de restrição do vetor com a enzima de restrição *Xho* I retira um fragmento da porção de ligação a cadeia pesada do anticorpo, denominada 'Linker'. Por isso houve a necessidade, no momento do desenho do oligonucleotídeos iniciadores, de repor a sequência perdida, refazendo o sítio de restrição para *Xho* I.

Os produtos resultantes das reações de clonagem foram utilizados para transformar, por 'choque térmico', cepas DH10B e DH5 α de *E. coli*. Foi realizada a extração de DNA plasmidial por lise alcalina a partir das colônias inoculadas em meio seletivo. Testes por PCR, hidrólise por enzima de restrição e sequenciamento foram feitos para confirmação dos clones positivos para pGEM-T/MSP-1₍₁₉₎ e pCR-TOPO2.1/MSP-1₍₁₉₎. A partir desses clones amplificamos a porção codificante do gene para que realizássemos as sub-clonagens em vetor de expressão em procarioto, pET28a, e em vetores contendo a porção do gene que codifica para cadeia pesada do anticorpo monoclonal que reconhece o receptor DEC205, e outro vetor que contendo a porção codificante do gene que codifica a cadeia pesada do

anticorpo utilizado como controle isotópico. Dos clones obtidos para pET28a/MSP-1₍₁₉₎, foram selecionados seis para análises por enzimas de restrição (Figura 10A). Os clones foram hidrolisados com *Eco* RI, apenas para linearização do clone, possibilitando a análise correta do tamanho do clone em pares de base, em comparação com o vetor pET28a vazio também linearizado; ou com *Eco* RI e *Bam* HI, quando podemos observar a liberação do inserto de 500pb correspondente a porção codificante da MSP-1₍₁₉₎. Dos clones analisados observamos que apenas o clone 1 não apresenta a liberação do inserto e seu tamanho correspondente em pares de base se assemelha ao vetor vazio. Em todos os outros, podemos observar a presença do fragmento de 500 pb, e os clones linearizados com tamanhos, de aproximadamente, 5800 pb. Desses analisados como positivos para análise por enzima de restrição, escolhemos os clones dois, três e quatro para análises por PCR e sequenciamento. Podemos observar a amplificação de uma banda correspondente a 500 pb no PCR dos clones selecionados (Figura 10B), e nas análises por sequenciamento, confirmando assim a presença do inserto nos clones obtidos. Como controle positivo da PCR utilizamos o clone original pGEM T/MSP-1₍₁₉₎, onde podemos observar a amplificação de uma banda de 500 pb, e como controle negativo o vetor pET28a vazio, onde não observamos a amplificação da banda de 500 pb.

Figura 10: Sub-clonagem da porção codificante da MSP-1₍₁₉₎ no vetor de expressão em eucariotos pET28a. A) Análise dos clones por endonuclease de restrição. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Seis dos clones obtidos para pET28a/MSP-1 foram submetidos à análise por enzima de restrição. Na hidrólise com apenas uma enzima, a Eco RI, observa-se apenas a linearização do clone, o que torna possível a correta análise do tamanho do clone em pares de base. Pode-se observar a liberação do inserto de 500 pb, com ambas as enzimas de restrição, em cinco dos seis clones obtidos. B) Análise dos clones por PCR. Os produtos das reações de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. Pode-se observar a amplificação do inserto de 500 pb, correspondente à porção codificante da MSP-1₍₁₉₎.

Da mesma forma, dos clones obtidos da ligação de DEC205/MSP-1₍₁₉₎ e ISO/MSP-1₍₁₉₎, foram escolhidos dois clones de cada para análise por PCR (Figura 11B), onde observamos a presença da banda de 500pb em todos os clones analisados. Desses clones escolhemos um para análise por enzima de restrição utilizando as enzimas *Xho* I, ou *Xho* I e *Not* I. A hidrólise (Figura 11A) utilizando as enzimas de restrição *Xho* I e *Not* I liberou um fragmento de 500pb correspondente a porção codificante da MSP-1₍₁₉₎ nos clones escolhidos, tanto DEC205/MSP-1₍₁₉₎, quanto ISO/MSP-1₍₁₉₎. A análise de restrição apenas com a enzima de restrição *Xho* I, mostra a linearização dos clones e o correto tamanho em pares de base, de aproximadamente 5000 pb.

Figura 11: Sub-clonagem da porção codificante da MSP-1₍₁₉₎ em vetor que expressa a cadeia pesada do anticorpo monoclonal e seu controle isotípico. A) Análise de restrição dos clones utilizando as enzimas *Xho* I e/ou *Not* I. Os produtos das hidrólises foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Pode-se observar a liberação do fragmento correspondente a porção codificante da MSP-1₍₁₉₎ com 500pb. B) Análise dos clones por PCR. Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Pode-se observar a amplificação do fragmento de 500pb nos dois clones DEC205/MSP-1₍₁₉₎ e nos dois clones correspondentes ao clone ISO/MSP-1₍₁₉₎.

4.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MSP-1₍₁₉₎r

Dos clones positivos para pET28a/MSP-1₍₁₉₎, utilizamos um para transformar cepas BL21 DE3 de *E. coli*, por ‘choque-térmico’. As cepas transformadas foram cultivadas em meio seletivo contendo Kanamicina e, após atingirem a DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,7. As induções iniciaram com a utilização de diferentes concentrações de IPTG, por 4 h a 37 °C sob agitação orbital. O meio de cultura bacteriano foi centrifugado e os extratos celulares obtidos, após a sonicação das células, foram submetidos a SDS-PAGE, sob condições redutoras utilizando DTT.

Podemos observar o aparecimento da banda correspondente a MSP-1r nos extratos celulares induzidos nas diferentes concentrações de IPTG utilizadas (Figura 12A), em comparação com extrato celular não induzido. De uma forma qualitativa pode-se observar que a expressão da proteína recombinante aumenta de forma direta com relação ao aumento da concentração de IPTG utilizada. Nosso próximo passo foi verificar a solubilidade da proteína recombinante expressa a 1mM de IPTG. Cepas BL21 DE3 transformadas foram cultivadas em meio seletivo e induzidas, ou não, com 1mM de IPTG a 37 °C por 4 h. Após esse período as células induzidas e não induzidas foram centrifugadas, as células foram ressuspensas em 400 μ L de água, sonicadas e centrifugadas novamente. Separamos a porção solúvel e insolúvel do extrato induzido. As amostras foram separadas por SDS-PAGE 15% e coradas com ‘comassie blue’ e descoradas para visualização dos padrões de bandas (Figura 12B). Após a eletroforese podemos observar o padrão de bandas do extrato não induzido, utilizado como controle negativo, e das porções solúvel e insolúvel dos extratos induzidos, onde podemos observar a presença das bandas correspondentes a proteína recombinante. Em termos gerais a purificação da proteína recombinante fica mais viável em termos de custo e tempo gasto, quando a proteína é expressa na fase solúvel do extrato celular. Na fase solúvel a purificação se torna mais complicada, sendo necessário desnaturar e renaturar a proteína, para que ela obtenha a conformação original, o que pode não ocorrer.

Pelo observado no SDS-PAGE, conseguimos obter a proteína recombinante tanto na fase solúvel, quanto na fase insolúvel do extrato induzido a 1 mM de IPTG. Por isso padronizamos a expressão da proteína recombinante utilizando as cepas de *E. coli* BL21 DE3 em meio seletivo contendo kanamicina, induzidas com 1 mM de IPTG a 37 °C por 4 h sob agitação orbital.

Figura 12: Expressão e solubilidade da proteína MSP-1₍₁₉₎r. A) Testes de expressão da proteína recombinante foram realizados utilizando cepas de *E. coli* BL21DE3 transformadas por choque-térmico com o clone 1 classificado como 'positivo' para pET28aMSP-1₍₁₉₎. A indução da expressão foi realizada utilizando IPTG em três diferentes concentrações. B) Extrato celular bacteriano induzido com 1mM de IPTG por 4h a 37°C foi lisado por sonicação e, a seguir, as porções solúvel e insolúvel foram separadas, submetidas a SDS-PAGE 15%, corado com coomassie blue. Pode-se observar a presença da proteína recombinante em ambas as frações do extrato.

4.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Um dos métodos mais utilizados em termos de purificação de proteínas recombinantes é a cromatografia de afinidade. No caso da MSP-1_{(19)r} a purificação foi realizada utilizando cromatografia de afinidade a His6, pois o vetor utilizado para expressão em procarioto, pET28a, possui a sequência correspondente para expressão de His6. Esse método de purificação utilizada a afinidade de ligação existente entre o aminoácido histidina e íons de níquel, que são imobilizados em microesferas de sefarose.

Após a lavagem, a resina foi empacotada na coluna utilizando um volume final de 10 mL em tampão. As purificações foram realizadas com 5 mL de volume da porção solúvel do extrato expresso. A MSP-1_{(19)r} foi eluída utilizando solução de imidazol 500 mM, reagente que compete pela ligação à His6, retirando a proteína ligada aos íons de níquel imobilizados na sefarose. Alíquotas de 500 uL foram coletadas e a presença da proteína foi determinada utilizando reagente de Bradford. Alíquotas de 5 uL de cada fração eluída foram submetidas a SDS-PAGE 12% sob condições redutoras com DTT (Figura 13). A proteína recombinante foi observada a partir da segunda fração eluída com 500 mM de imidazol. As frações dois à oito foram reunidas e dialisadas contra PBS, para retirada do imidazol, evitando a degradação da proteína recombinante. Após a diálise foram separadas frações de 500 uL, quantificadas e armazenadas a -20 °C. Obtivemos um rendimento aproximado de 3 mg de proteína por litro de meio de crescimento seletivo bacteriano.

Figura 13: Purificação da proteína MSP-1₍₁₉₎r. A porção solúvel do extrato bacteriano induzido foi utilizada para purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade a His6. Diferentes frações foram eluídas com 500mM de imidazol e submetidas à SDS-PAGE 12% corado com coomassie blue. Pode-se observar a presença da proteína a partir da segunda fração eluída.

4.4 EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS HÍBRIDOS

Com base em análises comparativas, obtivemos um rendimento de aproximadamente 7 mg de proteína por litro de cultura para o anticorpo α DEC205/MSP-1₍₁₉₎, e de 1,6 mg/L do anticorpo utilizado como seu controle isotípico, ISO/MSP-1₍₁₉₎.

Cerca de 2 μ g dos anticorpos híbridos, α DEC205/MSP-1₍₁₉₎ e ISO/MSP-1₍₁₉₎, e da proteína recombinante MSP-1₍₁₉₎ foram submetidas à SDS-PAGE, sob condições redutoras (Figura 14A.1) e não redutoras (Figura 14B.1). A figura 14A.1 mostra as cadeias pesadas de ambos os anticorpos migrando em torno de 70 kDa, tamanho esperado para a fusão da MSP-1₍₁₉₎ (19 kDa) com a cadeia pesada do anticorpo anti-DEC205 (50 kDa). As cadeias leves de ambos os anticorpos migram em torno de 25 kDa. A diferença de tamanho entre as cadeias leves do anticorpo α DEC205 e ISO explica-se pela diferença no conteúdo dos aminoácidos em cada cadeia leve. Além disso, pudemos observar principalmente no caso do anticorpo α DEC205 dois

produtos de degradação que apareceram com massas moleculares inferiores. Esta degradação pode ter acontecido durante o processamento do anticorpo pois vários passos são requeridos até que o mesmo esteja puro. A figura 14B.1 mostra um gel não redutor em que ambos os anticorpos aparecem com massas moleculares de tamanhos esperados em torno de 200 kDa.

Para verificarmos se a proteína MSP-1₍₁₉₎ estava intacta em cada um dos anticorpos quiméricos, realizamos a transferência dos mesmos para membranas de nitrocelulose que foram submetidas a “western blot” com soro de camundongo imunizado com a proteína MSP-1₍₁₉₎ recombinante. Como mostram as figuras 14A.2 (em condições redutoras) e 14B.2 (em condições não redutoras), os ambos os anticorpos reagiram com o soro α MSP-1₍₁₉₎. Como controle positivo, a proteína MSP-1₍₁₉₎ foi colocada no gel mostrado na figura 14A.2 e também reagiu com o soro. Com esse resultado verificamos que ambos os anticorpos foram produzidos com sucesso.

Figura 14: Caracterização dos anticorpos híbridos. Aliquotas de 2µg de proteína MSP-1r e dos anticorpos híbridos foram submetidas à SDS-PAGE 12% sob condições redutoras utilizando DTT. A) Após o gel ser corado com comassie blue, pode-se observar o padrão de bandas correspondentes às cadeias pesada, somada à massa molecular da proteína MSP-1r, e leve dos anticorpos. B) Outro gel, igual ao da figura A, foi utilizado para teste de reconhecimento por 'western blot', utilizando-se soro proveniente de camundongo imunizado com MSP-1r + CFA, e Proteína A ligada à molécula de HRP. Pode-se observar o reconhecimento específico da proteína recombinante e da cadeia pesada dos anticorpos híbridos.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS HÍBRIDOS

Nosso próximo passo foi testar a viabilidade e especificidade da ligação dos anticorpos monoclonais, utilizando células CHO, expressando diferentes receptores – DCIR2, DEC205 de humano e DEC205 de camundongo (Figura 15). O receptor DCIR2 foi utilizado no teste como controle negativo, para testar a especificidade dos anticorpos em reconhecer o receptor DEC205. O receptor DEC205 expresso em células humanas foi utilizado no teste para determinar a especificidade do mAb híbrido em reconhecer e ligar ao receptor expresso em camundongos. Da mesma forma para controle positivo de ligação foi utilizado um anticorpo híbrido contendo a proteína de circumsporozoíta de *P.falciparum* denominado de α DEC/ Δ N, já caracterizado, e que reconhece de forma específica o receptor DEC205 de camundongo, também expresso em células CHO.

As células foram incubadas, primeiramente, com os anticorpos híbridos em diferentes concentrações (10 μ g/mL, 1 μ g/mL e 0,1 μ g/mL). Após sucessivas lavagens foram, então, incubadas com anticorpo α IgG1 ligado ao fluoróforo PE, e posteriormente adquiridas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACSCANTO II (BD Biosciences).

Após a análise observamos a ligação dos anticorpos α DEC205/MSP-1₍₁₉₎, de forma específica e dose-dependente, às células que expressavam receptor DEC-205 de camundongo (Figura 15). Observando as medianas de fluorescência, o anticorpo α DEC205/MSP-1₍₁₉₎ permaneceu na mesma faixa de emissão de fluorescência que o controle negativo para o anticorpo conjugado, quando em cultura com células expressando receptores DCIR2 e DEC205 de humano.

Ao contrário do esperado, o controle isotípico também reconheceu de forma inespecífica os três tipos de receptores utilizados nos testes. Nos testes utilizando células expressando DEC205 de camundongo, a mediana de fluorescência foi cerca de 10 vezes menor em comparação com o controle positivo de ligação, o anticorpo α DEC/ Δ N.

Figura 15 Ensaio de viabilidade e especificidade da ligação dos anticorpos híbridos. Células CHO expressando diferentes receptores foram incubadas com diferentes concentrações de anticorpos (10 μ g/mL, 1 μ g/mL e 0,1 μ g/mL). Após 15 min foram lavadas e incubadas com anticorpo α lgG1 ligado ao fluoróforo PE. As células foram adquiridas utilizando o citômetro de fluxo FACS CANTO II (BD Bioscience). Células CHO expressando receptor DCIR foram utilizados como controle para especificidade de ligação ao receptor DEC205 e células CHO expressando receptor DEC205 de humano foram utilizadas como controle de ligação ao DEC205 espécie-específico. Os resultados foram analisados utilizando o programa FlowJo. Pode-se observar a ligação de forma dose-dependente do mAb α DEC205/MSP-1₍₁₉₎ às células CHO expressando receptor DEC205 de camundongo. *Experimento representativo de três.

Testes de ligação dos anticorpos híbridos foram realizados em ensaios *ex vivo* com esplenócitos totais de camundongos C57BL/6 WT e de camundongos com DCs fluorescentes pela expressão da proteína YFP (do inglês 'yellow fluorescence protein') sob o comando do promotor CD11c.

Esplenócitos totais, de ambas as linhagens de camundongos, foram incubados com diferentes concentrações dos anticorpos híbridos (10 μ g/mL, 1 μ g/mL e 0,1 μ g/mL). Após sucessivas lavagens as células foram incubadas com anticorpo α IgG1 conjugado ao fluoróforo PE. As células provenientes do camundongo WT foram também incubadas com o anticorpo α CD11c conjugado ao fluoróforo FITC e adquiridas por citometria de fluxo.

A análise dos resultados mostrou a capacidade do anticorpo híbrido α DEC205/MSP-1₍₁₉₎ em reconhecer DCs, o que não ocorreu com seu controle isotípico (Figura 16), que apresentou uma mediana de fluorescência equivalente ao controle do anticorpo conjugado nas três concentrações.

Figura 16: Ensaio de direcionamento dos anticorpos para DCs do baço. Esplenócitos totais de camundongos com DC expressando YFP e WT foram incubadas com anticorpos híbridos em três concentrações (10ug/mL, 1ug/mL e 0,1ug/mL). As células dos camundongos WT foram marcadas para a expressão da molécula CD11c. Observou-se a ligação dose-dependente do anticorpos α DEC205 em células expressando YFP e CD11c⁺. *Resultados obtidos a partir da análise de um ensaio.

Devido à interferência da fluorescência da molécula YFP no canal de PE (FL2), no aparelho de citometria de fluxo, optamos pela utilização de camundongos WT para realização dos experimentos seguintes.

Tendo sido observado a ligação do anticorpo híbrido em células CD11c⁺ no baço, realizamos um teste nos mesmos moldes que o anterior, utilizando esplenócitos totais (Figura 17) e células de linfonodos drenantes (Figura 18) (LN poplíteo, LN axilar, LN inguinal) de camundongos WT.

Os órgãos foram processados e as células incubadas com diferentes concentrações dos anticorpos híbridos (10 μ g/mL, 1 μ g/mL e 0,1 μ g/mL). Após sucessivas lavagens as células foram marcadas com anticorpos específicos para moléculas MHCII, CD11c e CD8 marcados com diferentes fluoróforos e adquiridas por citometria de fluxo.

Análises mostraram que o anticorpo α DEC205/MSP-1₍₁₉₎ reconheceu de forma dose-dependente as células do linfonodo e do baço com perfil MHCII⁺CD11c⁺CD8⁺, principais DCs que expressam o receptor DEC205 em camundongo (77).

Figura 17: Ensaio de direcionamento dos anticorpos para DCs de baço. Esplenócitos totais de camundongos WT foram incubadas com anticorpos híbridos em três concentrações (10ug/mL, 1ug/mL e 0,1ug/mL). As células foram marcadas e diferenciadas pela expressão das moléculas de membrana MHCII, CD11c e CD8. Observou-se a ligação dose-dependente dos anticorpos específicos para receptor DEC205 principalmente em células MHCII⁺CD11c⁺CD8⁺. Em comparação com o controle negativo não houve ligação do anticorpo isotípico. *Resultados analisados a partir de um ensaio.

Figura 18: Ensaio de direcionamento dos anticorpos para DCs de LN drenantes. Células de linfonodos e esplenócitos totais de camundongos WT foram incubadas com anticorpos híbridos em três concentrações (10ug/mL, 1ug/mL e 0,1ug/mL). Células de LN de camundongos WT foram incubadas com anticorpos híbridos em três concentrações. As células foram marcadas e diferenciadas pela expressão das moléculas de membrana MHCII, CD11c e CD8. Observou-se a ligação dose-dependente dos anticorpos específicos para receptor DEC205 principalmente em células MHCII⁺CD11c⁺CD8⁺. Em comparação com o controle negativo não houve ligação do anticorpo isotópico. *Resultados analisados a partir de um ensaio.

4.6 ANÁLISE DA RESPOSTA HUMORAL

Para uma análise prévia da resposta humoral, camundongos C57BL/6 machos, com idades entre 8 e 12 semanas, foram imunizados por via intraperitoneal (ip) com 5 μ g dos anticorpos híbridos utilizando poly I:C como adjuvante. O poly I:C, um análogo sintético do RNA dupla-fita viral, ativa a produção de citocinas, entre elas, IFN tipo I, TNF- α e IL-6, importantes na geração da resposta inflamatória.

Passados 30 dias após a primeira imunização os camundongos foram novamente imunizados com a mesma quantidade de proteína, nas mesmas condições que a primeira imunização e após 15 dias (Figura 19), foi coletado sangue desses animais para obtenção de soro e realização de testes para titulação de anticorpos específicos contra a MSP-1_{(19)r} (Figura 20), e retirado baço para utilização de esplenócitos totais em ensaio de ELISPOT (Figura 21).

Como controle positivo dos ensaios de ELISA foi utilizado soro de camundongos C57BL/6 imunizados com 5 μ g de proteína MSP-1_r/CFA. Como controle negativo foi utilizado apenas o diluente dos soros, sem anticorpo. Para os ensaios de ELISPOT, como controle positivo, utilizamos Con A (concanavalina A), um potente ativador de células T.

Figura 19: Esquema de imunização com 5 μ g dos anticorpos híbridos. Camundongos machos C57BL/6 foram separados em quatro grupos distintos, sendo dois grupos controles, que receberam somente solução salina ou solução combinada com adjuvante Poly I:C, e dois grupos experimentais, que receberam solução salina combinada com 5 μ g do anticorpo α DEC205/MSP-1₍₁₉₎ ou do seu controle isotípico ISO/ MSP-1₍₁₉₎. Após 30 dias os animais foram novamente imunizados e passados 15 dias foram sacrificados para coleta de soro e retirada do baço para realização de ELISPOT.

Camundongos do grupo controle, que receberam apenas solução salina, não apresentaram níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a detectáveis pelos nossos ensaios. Anticorpos IgM foram detectados em títulos menores que os outros grupos, inclusive do grupo experimental injetados apenas com adjuvante, no qual, também não foram observados níveis detectáveis de anticorpos IgG1 e IgG2a.

Nos grupos experimentais, camundongos imunizados com anticorpo α DEC205/MSP-1₍₁₉₎ apresentaram discrepância quanto a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a, que de qualquer forma, foram significativamente menores que os títulos de anticorpo gerados por camundongos imunizados com controle isotípico.

Figura 20: Análise dos níveis séricos de anticorpos contra MSP-1₍₁₉₎. Camundongos foram imunizados, via ip, com diferentes doses dos anticorpos híbridos, e após 30 dias receberam nova dose. Em 15 dias foi coletado soro, que foi utilizado em ensaios de ELISA contra MSP-1r purificada e extrato total do parasito. Como controles positivos foram utilizados soros de camundongos imunizados com MSP-1r + CFA. Níveis séricos de anticorpos IgG1, IgG2a e IgM foram avaliados. Observou-se a produção de anticorpos IgM em todos os grupos imunizados. A produção de anticorpos IgG1 e IgG2a foram observados em camundongos dos grupos experimentais, com níveis maiores no grupo imunizado com controle isotípico. *Resultados analisados a partir da união de dois ensaios.

Figura 21: Ensaio para determinação da produção de IFN- γ por esplenócitos totais de camundongos imunizados com 5 μ g. Camundongos C57Bl/6 imunizados com 5 μ g de proteínas totais duas vezes em um intervalo de 30 dias. 15 dias após a última imunização os animais foram sacrificados e o baço coletado. Esplenócitos totais foram utilizados em ensaio de ELISPOT para determinar o nível da produção de IFN- γ . * $\S$ £ ANOVA $p < 0,05$.

Passados 45 dias após a primeira imunização os animais foram sacrificados para a retirada do baço, e posterior realização de ELISPOT. Esplenócitos totais foram cultivados na presença de IL-2 e de diferentes doses da proteína MSP-1₍₁₉₎r, (10 μ g/mL, 1 μ g/mL e 0,1 μ g/mL) proporcionando os estímulos necessários para a ativação de células T específicas para o antígeno.

Podemos observar que, nas diferentes doses de estímulo, houve diferença significativa no número de células ativadas, entre os grupos controles e os grupos experimentais imunizados com os anticorpos híbridos (Figura 21* $\S$).

Animais imunizados com anticorpo α DEC205/MSP-1₍₁₉₎ apresentaram forte tendência em induzir maior produção de IFN- γ quando a células foram estimuladas com 10 μ g/mL e 1 μ g/mL da proteína recombinante, em comparação com animais imunizados com o controle isotípico. Mas podemos observar que o grupo de

camundongos imunizados com α DEC205/MSP-1₍₁₉₎ foi mais efetivo na ativação de células T em comparação com o grupo imunizado com ISO/MSP-1₍₁₉₎, quando estimulados com 0,1 μ g/mL da proteína recombinante (Figura 21£).

Observando essa tendência maior na ativação celular em camundongos imunizados com anticorpo α DEC205/MSP-1₍₁₉₎, decidimos analisar novamente esse parâmetro, mas dessa vez utilizando uma dose de 50 μ g dos anticorpos híbridos, em um intervalo menor de tempo entre a imunização e a análise. Após quinze dias os animais foram sacrificados e esplenócitos totais foram utilizados em testes de ELISPOT (Figura 22).

Figura 22: Esquema de imunização com 50 μ g dos anticorpos híbridos. Camundongos machos C57BL/6 foram separados em quatro grupos distintos, sendo dois grupos controles, que receberam somente solução salina ou solução combinada com adjuvante poly I:C, e quatro grupos experimentais, que receberam solução salina combinada com 50 μ g do anticorpo α DEC205/MSP-1₍₁₉₎ ou do seu controle isotópico ISO/ MSP-1₍₁₉₎. Após 15 dias os camundongos foram sacrificados para retirada do baço e realização de ELISPOT com esplenócitos totais.

Da mesma forma que os animais imunizados com 5 μ g, observamos diferenças significativas na produção de IFN- γ , entre os grupos controles e os grupos experimentais, quando induzidos com diferentes concentrações de proteína recombinante (Figura 23*§). Mas nesse experimento conseguimos observar que entre os grupos experimentais houve uma diferença significativa na ativação de células quando estimuladas com 10 μ g/mL de proteína recombinante (Figura 23Υ).

Figura 23: Ensaio para determinação da produção de IFN- γ por esplenócitos totais de camundongos imunizados com 50 μ g. Camundongos C57Bl/6 imunizados com 50 μ g de proteínas totais em uma única dose. Após 15 dias os animais foram sacrificados e o baço retirado. Esplenócitos totais foram utilizados em ensaio de ELISPOT para determinar o nível da produção de IFN- γ . * Υ ANOVA $p < 0,05$. § Υ ANOVA $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Apesar da forte ativação do sistema imune que ocorre durante a infecção pelo *Plasmodium*, a memória imunológica à infecção é restrita a pacientes residentes em áreas endêmicas. Estudos utilizando o *P. chabaudi*, demonstram que a ativação do sistema imune está ligada diretamente a forte ativação de linfócitos T e B com produção de IFN- γ , TNF- α e IgG2a (22-23, 78).

Dessa forma, uma linha de pesquisa importante é a que visa à geração de métodos que induzam uma resposta imune eficaz e duradoura contra o parasito, impedindo ou limitando novas infecções.

Uma das alternativas mais promissoras no desenvolvimento de vacinas é o direcionamento de antígenos específicos para células com funções centrais dentro do sistema imune, como as DCs, utilizando anticorpos capazes de reconhecer receptores na superfície dessas células (68, 79-80).

Dentro desse contexto, expressamos e purificamos um anticorpo monoclonal híbrido (α DEC205), carreando a proteína MSP-1₍₁₉₎ de *P. chabaudi* (81-82) em sua porção cristalizável.

Para que pudéssemos utilizar os anticorpos purificados em testes de vacinação, caracterizamos os anticorpos com base na sua capacidade de reconhecer a molécula DEC205 de forma específica, afastando a possibilidade da construção, com a proteína recombinante, ter interferido de alguma forma no dobramento da proteína e, consequentemente, em sua função biológica de reconhecimento e ligação. Para análise do padrão de ligação dos anticorpos, utilizamos técnicas de citometria de fluxo.

Nossos resultados *in vitro* demonstraram que o anticorpo α DEC205/MSP-1₍₁₉₎ reconheceu de forma específica o receptor DEC205 de camundongo, expresso em células CHO. Por outro lado seu controle isotípico (ISO/MSP-1₍₁₉₎), também foi capaz de reconhecer células expressando os três receptores diferentes, fato que não ocorreu nos ensaios *ex vivo* utilizando células de LN e esplenócitos totais.

Acreditamos que, sendo o ensaio *in vitro* uma situação na qual, a quantidade de anticorpo e a quantidade de células expressando os receptores, sejam muito maiores do que em uma situação natural, talvez isso possa ter ocasionado o aparecimento de ligações inespecíficas pelo anticorpo isotípico.

Observamos no teste *ex vivo*, mostrando a ligação dos anticorpos híbridos às células do baço e do LN de camundongos WT, que a mediana de fluorescência do

anticorpo α DEC205/MSP-1₍₁₉₎, foi maior em células do LN. Tal fato pode ser explicado pela maior proporção de células DEC205⁺ presentes nesse órgão (59).

Em vista dos resultados de caracterização dos anticorpos híbridos realizamos alguns testes iniciais de imunização.

Em animais imunizados com α DEC205/MSP-1₍₁₉₎ não observamos a geração de uma resposta humoral proeminente na produção de anticorpos IgG1 e IgG2a, ao contrário do que ocorreu em camundongos imunizados com α ISO/MSP-1₍₁₉₎. Nesses últimos os títulos de anticorpos foram significativamente maiores em comparação aos títulos gerados nos camundongos imunizados com anticorpo híbrido que reconhece a molécula DEC205.

Nossa hipótese se baseia na possibilidade de que a vacina, utilizando o anticorpo α DEC205/MSP-1₍₁₉₎, tenha sido efetiva quanto ao direcionamento do antígeno. Acreditamos que a resposta humoral observada nos animais imunizados com ISO/MSP-1₍₁₉₎ tenha ocorrido devido à apresentação do antígeno de forma diferenciada em comparação com o anticorpo direcionado para DCs. Nesse caso, o processamento e apresentação do antígeno poderia ter ocorrido pelas células B, o que pode ter levado a ativação T independente, e a produção de IgM de baixa afinidade.

Na malária experimental, a resposta policlonal de linfócitos T, assim como de linfócitos B, é parte importante da resposta imune, em especial no início da infecção (78, 83-84). Nosso grupo de pesquisa tem estudado muitos aspectos da natureza dessa resposta, o que indica um possível papel ao mesmo tempo protetor e gerador de patologia; de fato, tal resposta parece caracterizar-se por ser uma das primeiras linhas de defesa do hospedeiro a ser ativada, comportando-se como uma resposta inata.

Outra hipótese que poderia explicar o fato da geração de resposta humoral mais proeminente em camundongos imunizados com o ISO/MSP-1₍₁₉₎, é a possibilidade de haver um epítopo capaz de ser reconhecido e ativar células T no anticorpo isotípico, que funcionaria como carreador permitindo a geração de resposta imune à proteína recombinante.

Rodrigues et al. (85) demonstraram que a utilização do epítopo 'pan HLA-DR' (do inglês 'PADRE'), foi efetivo na geração de resposta imune contra a proteína MSP-1 recombinante de *P. vivax*. Ou seja, a presença de um epítopo para linfócitos

T no anticorpo utilizado como controle isotípico pode estar funcionando como adjuvante, promovendo maior geração de resposta humoral, específica ao antígeno, em camundongos imunizados com ISO/MSP-1₍₁₉₎ em comparação com o anticorpo utilizado no direcionamento para DCs.

Os títulos de anticorpos IgM observados nos levam a crer que a geração desses anticorpos ocorreu, ao menos em parte, de forma policlonal, visto que houve geração desses anticorpos em camundongos do grupo controle imunizados apenas com poly I:C. Também não descartamos a hipótese de uma parte da IgM detectada seja constituída de anticorpos naturais, pela observação que camundongos do grupo controle (imunizados com solução salina) apresentaram níveis detectáveis de anticorpos IgM reativos contra MSP-1₍₁₉₎ (86).

Mesmo com a observação de que a resposta humoral em camundongos imunizados com controle isotípico foi maior do que em camundongos imunizados com o anticorpo α DEC205, ensaios para verificar a geração de resposta celular mostraram que existe uma tendência na geração de resposta de células T, específicas ao antígeno, maior em camundongos imunizados com 5 μ g o anticorpo α DEC205/MSP-1₍₁₉₎. Mais do que isso, essa tendência se mostrou significativa quando a quantidade de anticorpo utilizado nas imunizações foi aumentada. Nos primeiros testes de imunização com 5 μ g, o testes de ativação celular demonstraram que a menor quantidade de proteína recombinante utilizada nos testes (0,1 μ g/mL), foi mais efetiva na ativação de células T específicas ao antígeno, em comparação com seu controle isotípico.

Isso nos levou a crer que o direcionamento do antígeno foi efetivo utilizando o anticorpo α DEC205, e é melhor em ativar uma resposta celular específica. Mas que de alguma forma o anticorpo isotípico também consegue elevar a resposta imune celular específica por outra via de ativação, no caso através de receptores da porção Fc dos anticorpos presentes nas células fagocíticas. Em todos os nossos ensaios *ex vivo* de caracterização dos anticorpos, utilizamos anticorpos capazes de bloquear receptores Fc, justamente para evitar a ligação inespecífica dos anticorpos a esses receptores. Ou seja, não observamos se havia a possibilidade desses anticorpos, especialmente o anticorpo ISO/MSP-1₍₁₉₎, serem reconhecidos e se ligarem a receptores Fc.

Sabe-se que receptores Fc presentes na superfície de células, como as DCs, são capazes de endocitar antígenos opsonizados e mediar a apresentação via moléculas do MHC I e MHC II. Além disso, assim como o receptor endocítico DEC205, também são eficientes em fazer apresentação cruzada de antígenos, via moléculas do MHC I.

Por isso, também acreditamos, que muito da resposta humoral e celular gerada pelo anticorpo isotípico, foi através da reciclagem natural do anticorpo por fagócitos através da ligação aos receptores Fc.

Novos estudos, entretanto, precisam ser realizados pra analisarmos a geração de resposta imune com ou sem o direcionamento do antígeno. Alguns pontos principais devem ser revistos e analisados por diferentes padrões. 1) reavaliar a geração de resposta humoral mediante imunização; 2) testar a capacidade protetora dos anticorpos gerados pela imunização, durante a infecção pelo parasito; 3) avaliar a geração de resposta celular de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória e 4) novas estratégias de imunização utilizando os anticorpos híbridos e proteína recombinante purificada, alternados em 'prime' e 'boost'.

Desta forma, os resultados desse estudo indicam que tal estratégia para imunização foi efetiva no direcionamento do antígeno para DCs *in vivo*, abrindo a possibilidade de, juntamente com outras estratégias de imunizações adicionais, levarem a uma ativação da resposta imune específica ao parasita.

6 CONCLUSÕES

Nesse trabalho investigamos a capacidade imunogênica da proteína MSP-1₍₁₉₎ de *P.chabaudi*, direcionada para DCs, ligada ao mAb que reconhece o receptor DEC205 nessas células.

A proteína recombinante foi expressa em cepas de *E. coli* BL21DE3 no sistema de pET28a, sob indução de 1mM de IPTG. A MSP-1r foi expressa nas frações solúvel e insolúvel, tendo sido purificada a partir da fração solúvel de indução.

Os anticorpos híbridos, DEC205/MSP-1 e seu controle isotípico, foram expressos *in vitro*, através de transfecção transitória de células HEK293T, e purificados a partir do sobrenadante de cultura dessas células. A presença da proteína MSP-1_r foi detectada a partir de ensaios de 'western blot' sondados com soro de camundongos imunizados com a proteína recombinante.

Demonstramos por ensaios *in vitro* e *ex vivo* a capacidade de ligação de forma dose-dependente o receptor DEC205 em DCs.

A imunização com anticorpos híbridos levou a geração de resposta imune humoral e os anticorpos gerados foram fenotipados por testes de ELISA. Foram detectados títulos de anticorpos IgG1, IgG2a e IgM tanto no grupo de camundongos imunizado com anticorpo híbrido que reconhece DEC205 quanto seu controle isotípico, nos quais, surpreendentemente o título de anticorpos IgG1 e IgG2a foi significativamente maior em comparação com grupo imunizado com α DEC205/MSP-1₍₁₉₎.

Análises da resposta celular específica, através da produção de IFN- γ , revelaram uma paridade quando a geração de células T específicas ao antígeno, entre os grupos experimentais, mas que tende a ser maior em camundongos imunizados com anticorpo híbrido α DEC205/MSP-1₍₁₉₎.

REFERÊNCIAS

Referências*

1. Garcia CR, de Azevedo MF, Wunderlich G, Budu A, Young JA, Bannister L. Plasmodium in the postgenomic era: new insights into the molecular cell biology of malaria parasites. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2008;266:85-156.
2. Bannister LH, Dluzewski AR. The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells*. 1990;16(2-3):257-92.
3. Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Oct;14(4):810-20.
4. Garcia LS. Malaria. *Clin Lab Med*. 2010 Mar;30(1):93-129.
5. World Malaria Report 2007. Available from: www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/index.html. 02.22.2009 .
6. Good MF, Doolan DL. Immune effector mechanisms in malaria. *Curr Opin Immunol*. 1999 Aug;11(4):412-9.
7. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002 Feb 7;415(6872):673-9.
8. Marsh K, Forster D, Waruiru C, Mwangi I, Winstanley M, Marsh V, et al. Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med*. 1995 May 25;332(21):1399-404.
9. Bhattarai A, Ali AS, Kachur SP, Martensson A, Abbas AK, Khatib R, et al. Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar. *PLoS Med*. 2007 Nov 6;4(11):e309.
10. Roberts DJ, Craig AG, Berendt AR, Pinches R, Nash G, Marsh K, et al. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature*. 1992 Jun 25;357(6380):689-92.

*De acordo com: Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

11. Day NP, Hien TT, Schollaardt T, Loc PP, Chuong LV, Chau TT, et al. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis.* 1999 Oct;180(4):1288-97.
12. Seixas E, Cross C, Quin S, Langhorne J. Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Eur J Immunol.* 2001 Oct;31(10):2970-8.
13. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol.* 2002 Sep 15;169(6):2956-63.
14. Skorokhod OA, Alessio M, Mordmuller B, Arese P, Schwarzer E. Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. *J Immunol.* 2004 Sep 15;173(6):4066-74.
15. Taylor RR, Allen SJ, Greenwood BM, Riley EM. IgG3 antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 (MSP2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Apr;58(4):406-13.
16. Ndungu FM, Bull PC, Ross A, Lowe BS, Kabiru E, Marsh K. Naturally acquired immunoglobulin (Ig)G subclass antibodies to crude asexual *Plasmodium falciparum* lysates: evidence for association with protection for IgG1 and disease for IgG2. *Parasite Immunol.* 2002 Feb;24(2):77-82.
17. Leisewitz AL, Rockett KA, Gumede B, Jones M, Urban B, Kwiatkowski DP. Response of the splenic dendritic cell population to malaria infection. *Infect Immun.* 2004 Jul;72(7):4233-9.
18. Ing R, Segura M, Thawani N, Tam M, Stevenson MM. Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. *J Immunol.* 2006 Jan 1;176(1):441-50.
19. Carapau D, Kruhofer M, Chatalbash A, Orengo JM, Mota MM, Rodriguez A. Transcriptome profile of dendritic cells during malaria: cAMP regulation of IL-6. *Cell Microbiol.* 2007 Jul;9(7):1738-52.

20. Wykes MN, Liu XQ, Beattie L, Stanisic DI, Stacey KJ, Smyth MJ, et al. Plasmodium strain determines dendritic cell function essential for survival from malaria. PLoS Pathog. 2007 Jul;3(7):e96.
21. Wong KA, Rodriguez A. Plasmodium infection and endotoxic shock induce the expansion of regulatory dendritic cells. J Immunol. 2008 Jan 15;180(2):716-26.
22. Falanga PB, D'Imperio Lima MR, Coutinho A, Pereira da Silva L. Isotypic pattern of the polyclonal B cell response during primary infection by Plasmodium chabaudi and in immune-protected mice. Eur J Immunol. 1987 May;17(5):599-603.
23. Langhorne J, Gillard S, Simon B, Slade S, Eichmann K. Frequencies of CD4+ T cells reactive with Plasmodium chabaudi chabaudi: distinct response kinetics for cells with Th1 and Th2 characteristics during infection. Int Immunol. 1989;1(4):416-24.
24. Ju X, Clark G, Hart DN. Review of human DC subtypes. Methods Mol Biol. 1995;3-20.
25. Fajardo-Moser M, Berzel S, Moll H. Mechanisms of dendritic cell-based vaccination against infection. Int J Med Microbiol. 2008 Jan;298(1-2):11-20.
26. Shortman K, Lahoud MH, Caminschi I. Improving vaccines by targeting antigens to dendritic cells. Exp Mol Med. 2009 Feb 28;41(2):61-6.
27. Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. Annu Rev Immunol. 2005;23:69-99.
28. Hoffman SL, Oster CN, Plowe CV, Woollett GR, Beier JC, Chulay JD, et al. Naturally acquired antibodies to sporozoites do not prevent malaria: vaccine development implications. Science. 1987 Aug 7;237(4815):639-42.
29. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Aide P, et al. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of Plasmodium falciparum disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. Lancet. 2005 Dec 10;366(9502):2012-8.
30. Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K, Hadley TJ, Miller LH. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by Plasmodium falciparum. Science. 1994 Jun 24;264(5167):1941-4.

31. Lynch MM, Cernetich-Ott A, Weidanz WP, Burns JM, Jr. Prediction of merozoite surface protein 1 and apical membrane antigen 1 vaccine efficacies against *Plasmodium chabaudi* malaria based on prechallenge antibody responses. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Mar;16(3):293-302.
32. Xu H, Hodder AN, Yan H, Crewther PE, Anders RF, Good MF. CD4+ T cells acting independently of antibody contribute to protective immunity to *Plasmodium chabaudi* infection after apical membrane antigen 1 immunization. *J Immunol*. 2000 Jul 1;165(1):389-96.
33. Murhandarwati EE, Black CG, Wang L, Weisman S, Koning-Ward TF, Baird JK, et al. Acquisition of invasion-inhibitory antibodies specific for the 19-kDa fragment of merozoite surface protein 1 in a transmigrant population requires multiple infections. *J Infect Dis*. 2008 Oct 15;198(8):1212-8.
34. Rosa DS, Iwai LK, Tzelepis F, Bargieri DY, Medeiros MA, Soares IS, et al. Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). *Microbes Infect*. 2006 Jul;8(8):2130-7.
35. Holder AA, Blackman MJ, Burghaus PA, Chappel JA, Ling IT, McCallum-Deighton N, et al. A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87 Suppl 3:37-42.
36. Bargieri DY, Rosa DS, Braga CJ, Carvalho BO, Costa FT, Espindola NM, et al. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella Typhimurium* FliC flagellin. *Vaccine*. 2008 Nov 11;26(48):6132-42.
37. Holder AA, Freeman RR. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. *J Exp Med*. 1982 Nov 1;156(5):1528-38.
38. Morgan WD, Birdsall B, Frenkiel TA, Gradwell MG, Burghaus PA, Syed SE, et al. Solution structure of an EGF module pair from the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *J Mol Biol*. 1999 May 28;289(1):113-22.
39. Quin SJ, Seixas EM, Cross CA, Berg M, Lindo V, Stockinger B, et al. Low CD4(+) T cell responses to the C-terminal region of the malaria merozoite surface protein-1 may be attributed to processing within distinct MHC class II pathways. *Eur J Immunol*. 2001 Jan;31(1):72-81.

40. O'Donnell RA, Saul A, Cowman AF, Crabb BS. Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-119 across distantly related *Plasmodium* species. *Nat Med*. 2000 Jan;6(1):91-5.
41. Blackman MJ, Scott-Finnigan TJ, Shai S, Holder AA. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. *J Exp Med*. 1994 Jul 1;180(1):389-93.
42. Siddiqui WA, Tam LQ, Kramer KJ, Hui GS, Case SE, Yamaga KM, et al. Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(9):3014-8.
43. Chang SP, Gibson HL, Lee-Ng CT, Barr PJ, Hui GS. A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth. *J Immunol*. 1992 Jul 15;149(2):548-55.
44. Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med*. 1990 Jul 1;172(1):379-82.
45. Cooper JA, Cooper LT, Saul AJ. Mapping of the region predominantly recognized by antibodies to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSA 1. *Mol Biochem Parasitol*. 1992 Apr;51(2):301-12.
46. McKean PG, O'Dea K, Brown KN. A single amino acid determines the specificity of a monoclonal antibody which inhibits *Plasmodium chabaudi* AS in vivo. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Dec;62(2):211-21.
47. Daly TM, Long CA. A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii yoelii* 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice. *Infect Immun*. 1993 Jun;61(6):2462-7.
48. Majarian WR, Daly TM, Weidanz WP, Long CA. Passive immunization against murine malaria with an IgG3 monoclonal antibody. *J Immunol*. 1984 Jun;132(6):3131-7.
49. Tian JH, Miller LH, Kaslow DC, Ahlers J, Good MF, Alling DW, et al. Genetic regulation of protective immune response in congenic strains of mice vaccinated with a subunit malaria vaccine. *J Immunol*. 1996 Aug 1;157(3):1176-83.

50. Cavanagh DR, Elhassan IM, Roper C, Robinson VJ, Giha H, Holder AA, et al. A longitudinal study of type-specific antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan. *J Immunol.* 1998 Jul 1;161(1):347-59.
51. Bull PC, Lowe BS, Kaleli N, Njuga F, Kortok M, Ross A, et al. *Plasmodium falciparum* infections are associated with agglutinating antibodies to parasite-infected erythrocyte surface antigens among healthy Kenyan children. *J Infect Dis.* 2002 Jun 1;185(11):1688-91.
52. Burgdorf S, Kautz A, Bohnert V, Knolle PA, Kurts C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science.* 2007 Apr 27;316(5824):612-6.
53. Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, et al. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol.* 2000 Oct 30;151(3):673-84.
54. Stahl P, Schlesinger PH, Sigardson E, Rodman JS, Lee YC. Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: characterization and evidence for receptor recycling. *Cell.* 1980 Jan;19(1):207-15.
55. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature.* 1995 May 11;375(6527):151-5.
56. Chesnut RW, Grey HM. Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. *J Immunol.* 1981 Mar;126(3):1075-9.
57. Alberts B. *Molecular biology of the cell.* 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
58. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C, Yamazaki S, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science.* 2007 Jan 5;315(5808):107-11.
59. Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, et al. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol.* 2001 Jul 15;167(2):741-8.

60. Cheong C, Idoyaga J, Do Y, Pack M, Park SH, Lee H, et al. Production of monoclonal antibodies that recognize the extracellular domain of mouse langerin/CD207. *J Immunol Methods*. 2007 Jul 31;324(1-2):48-62.
61. Voisine C, Mastelic B, Sponaas AM, Langhorne J. Classical CD11c+ dendritic cells, not plasmacytoid dendritic cells, induce T cell responses to *Plasmodium chabaudi* malaria. *Int J Parasitol*. 2010 May;40(6):711-9.
62. Sponaas AM, Cadman ET, Voisine C, Harrison V, Boonstra A, O'Garra A, et al. Malaria infection changes the ability of splenic dendritic cell populations to stimulate antigen-specific T cells. *J Exp Med*. 2006 Jun 12;203(6):1427-33.
63. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*. 2001 Sep 17;194(6):769-79.
64. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*. 2002 Dec 16;196(12):1627-38.
65. Hawiger D, Masilamani RF, Bettelli E, Kuchroo VK, Nussenzweig MC. Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity*. 2004 Jun;20(6):695-705.
66. Menges M, Rossner S, Voigtlander C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C, et al. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med*. 2002 Jan 7;195(1):15-21.
67. Legge KL, Gregg RK, Maldonado-Lopez R, Li L, Caprio JC, Moser M, et al. On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity. *J Exp Med*. 2002 Jul 15;196(2):217-27.
68. Boscardin SB, Hafalla JC, Masilamani RF, Kamphorst AO, Zebroski HA, Rai U, et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):599-606.

69. Cheong C, Choi JH, Vitale L, He LZ, Trumpfheller C, Bozzacco L, et al. Improved cellular and humoral immune responses in vivo following targeting of HIV Gag to dendritic cells within human anti-human DEC205 monoclonal antibody. *Blood*. 2010 Jul 28 116(19):3828-3838..
70. Trumpfheller C, Finke JS, Lopez CB, Moran TM, Moltedo B, Soares H, et al. Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):607-17.
71. Do Y, Park CG, Kang YS, Park SH, Lynch RM, Lee H, et al. Broad T cell immunity to the LcrV virulence protein is induced by targeted delivery to DEC-205/CD205-positive mouse dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2008 Jan;38(1):20-9.
72. Cox J, Semoff S, Hommel M. *Plasmodium chabaudi*: a rodent malaria model for in-vivo and in-vitro cytoadherence of malaria parasites in the absence of knobs. *Parasite Immunol*. 1987 Sep;9(5):543-61.
73. Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3V.
74. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.
75. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
76. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
77. Birkholz K, Schwenkert M, Kellner C, Gross S, Fey G, Schuler-Thurner B, et al. Targeting of DEC-205 on human dendritic cells results in efficient MHC class II-restricted antigen presentation. *Blood*. Sep 30;116(13):2277-85.
78. D'Imperio Lima MR, Alvarez JM, Furtado GC, Kipnis TL, Coutinho A, Minoprio P. Ig-isotype patterns of primary and secondary B cell responses to *Plasmodium chabaudi chabaudi* correlate with IFN-gamma and IL-4 cytokine production with CD45RB expression by CD4+ spleen cells. *Scand J Immunol*. 1996 Mar;43(3):263-70.

79. Cheong C, Choi JH, Vitale L, He LZ, Trumpfheller C, Bozzacco L, et al. Improved cellular and humoral immune responses in vivo following targeting of HIV Gag to dendritic cells within human anti-human DEC205 monoclonal antibody. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3828-38.
80. Maamary J, Array F, Gao Q, Garcia-Sastre A, Steinman RM, Palese P, et al. Newcastle disease virus expressing a dendritic cell-targeted HIV gag protein induces a potent gag-specific immune response in mice. *J Virol*. 2011 Mar;85(5):2235-46.
81. Cheesman S, Tanabe K, Sawai H, O'Mahony E, Carter R. Strain-specific immunity may drive adaptive polymorphism in the merozoite surface protein 1 of the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. *Infect Genet Evol*. 2009 Mar;9(2):248-55.
82. Brown KN. Antigenic diversity, antigenic variation and merozoite surface protein 1. *Parassitologia*. 1993 Jul;35 Suppl:13-5.
83. Castillo-Mendez SI, Zago CA, Sardinha LR, Freitas do Rosario AP, Alvarez JM, D'Imperio Lima MR. Characterization of the spleen B-cell compartment at the early and late blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. *Scand J Immunol*. 2007 Aug-Sep;66(2-3):309-19.
84. Muxel SM, Freitas do Rosario AP, Sardinha LR, Castillo-Mendez SI, Zago CA, Rodriguez-Malaga SM, et al. Comparative analysis of activation phenotype, proliferation, and IFN-gamma production by spleen NK1.1(+) and NK1.1(-) T cells during *Plasmodium chabaudi* AS malaria. *J Interferon Cytokine Res*. 2010 Jun;30(6):417-26.
85. Rosa DS, Tzelepis F, Cunha MG, Soares IS, Rodrigues MM. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. *Immunol Lett*. 2004 Apr 15;92(3):259-68.
86. Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol*. 1995 Dec;7(6):812-8.