Kelly Nazaré da Silva Amorim

Direcionando a proteína MSP1₄₂ de *Plasmodium vivax in vivo* para o subtipo DEC205⁺CD8 α ⁺ de células dendríticas: análise das respostas imunes celular e humoral

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

São Paulo
2016

Kelly Nazaré da Silva Amorim

Direcionando a proteína MSP1₄₂ de *Plasmodium vivax in vivo* para o subtipo DEC205⁺CD8 α ⁺ de células dendríticas: análise das respostas imunes celular e humoral

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Dra Silvia Beatriz Boscardin

Versão original

São Paulo
2016

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

da Silva Amorim, Kelly Nazaré

Direcionando a proteína MSP142 de Plasmodium vivax in vivo para o subtipo DEC205+CD8alpha+ de células dendríticas: análise das respostas imunes celular e humoral / Kelly Nazaré da Silva Amorim; orientadora Silvia Beatriz Boscardin. -- São Paulo, 2016.

152 p.

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

1. Imunologia. 2. Células Dendríticas. 3. Anticorpos Monoclonais. 4. Malária. 5. Vacina. I. Beatriz Boscardin, Silvia, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Kelly Nazaré da Silva Amorim

Título da Tese: Direcionando a proteína MSP1₄₂ de *Plasmodium vivax* *in vivo* para o subtipo DEC205⁺CD8α⁺ de células dendríticas: análise das respostas imunes celular e humoral

Orientador(a): Silvia Beatriz Boscardin

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão

pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **124** nas fls. **25** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Silvia Beatriz Boscardin**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Direcionamento de antígenos recombinantes para células dendríticas in vivo: uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacinas*" do qual participam o(s) aluno(s) **Kelly Nazaré da Silva Amorim, Raquel Hoffmann Panatieri, Elaine Cristina Matos Vincentin**, Iniciação Científica **Juliana Stopa**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **04.11.2014**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 05 de novembro de 2014.

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

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

Agradecimentos

Nossa como começar essa seção, faltam-me as palavras pois tenho tantos motivos para agradecer. Em primeiro lugar agradeço nosso senhor Jesus Cristo que me permitiu seguir essa trajetória sempre iluminando os meus caminhos afinal durante essa jornada encontrei verdadeiros anjos. Dedico essa tese a minha mãe meu exemplo de mãe, mulher, amiga e de caridade sempre se colocando em segundo plano, para ajudar o próximo mãe obrigado. Agradeço meu pai por sempre me ensinar a questionar e querer mais sempre. Minha vó como poderei retribuir um dia tudo que fez por mim, pelo Flailton e pelo meu filho durante todos esses anos a senhora cuidou de nós em todos os momentos com muita paciência e amor me ajudou chegar até aqui. Flailton meu marido e meu melhor amigo quantas coisas vivemos juntos ao longo desses 17 anos sempre do meu lado cuidando de mim e do nosso bebe lindo! Meus irmãos (Samara, Josy, Jefferson, Evelyn e Erika) obrigado pelas palavras amigas durante todos esses anos amo todos vocês, agradeço ao papai do céu a família que me deu tias, sobrinhos e primos maravilhosos. Tia Rosilene obrigado por tudo por cuidar do meu bebê quando mais precisei se não fosse a ajuda de todos vocês jamais esse momento seria possível. Amigos e quantos amigos conheci durante esses anos alguns são amigos irmãos que jamais esquecerei estarão para sempre em meu coração me aconselharam quando precisei, me deram a mão quando pedi e sempre estiveram do meu lado (Eline, Renan Suelen, Juliana, Juliane, Elaine, Raquel, Catarina, Daniela, Heloisa, Mariana, Isabel, Mauricio, Wesley, André, Higo, Fernando, Bianca e Arthur). Marcio o que falar de você meu amigo sempre ajudando todos em sua volta, sempre do meu lado me apoiando e persistindo para o meu crescimento obrigado pelo que fez por mim e o que faz por todos que passam pelo laboratório, você é um desses anjos que cruzaram meu caminho. Agradeço a todos do departamento de parasitologia (Alunos e funcionários) jamais esquecerei de cada um de vocês pois vocês me proporcionaram os melhores anos de minha vida.

Filho meu príncipe amado você trouxe luz a minha vida graças a você hoje enxergo a vida com mais amor e compaixão meus dias andavam tão cinzas sem você e hoje todos os dias são ensolarados repleto de flores e vida. Um amor mais forte que tudo, mais obstinado que tudo, mais duradouro que tudo te amo eternamente.....

Escrevo esse parágrafo para agradecer a pessoa mais importante dessa tese minha orientadora Silvia Beatriz Boscardin, sem você esse momento seria impossível, você me ensinou muito além de ciência pois você possui um senso de justiça, humildade, caridade e ética como poucas vezes vi obrigado por sempre está do meu lado e acreditar em mim mesmo quando eu não acreditava.

Obrigado por ser muito mais do que uma orientadora ser humana!

O que você faz com amor e cuidado tem uma chance de fazer diferença,
tanto para você como para a vida de outras pessoas. Tudo o que se faz sem
amor e sem convicção é fadado ao fracasso e à perda de tempo, para você e
para os outros"
(Wim Wenders)

"Porque cada um, independente das habilitações que
tenha, ao menos uma vez na vida
fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e
condição, e se a essas pessoas
pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão
perdendo os contornos, ou elas a si
próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas
mais maravilhas seriam capazes de
obrar, que pedaços de conhecimento profundo
poderiam comunicar, porque cada um de
nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um
dos outros infinitamente mais do
que neles aceitamos reconhecer."
José Saramago (A Jangada e a Pedra)

Resumo

Amorin KNS Direcionando a proteína MSP1₄₂ de *Plasmodium vivax* *in vivo* para o subtipo DEC205⁺CD8 α ⁺ de células dendríticas: análise das respostas imunes celular e humoral. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016

As células dendríticas (DCs) são fundamentais para a interação entre os sistemas imunes inato e adaptativo, pois são capazes de processar e apresentar antígenos para células T. Na última década, estudos conduzidos por vários grupos demonstraram que é possível direcionar antígenos para diferentes subtipos de DCs utilizando anticorpos monoclonais (mAbs) contra receptores presentes na superfície das DCs fusionados ao antígeno de interesse. A administração de doses baixas desses mAbs de fusão na presença de estímulos maturação para as DCs é capaz de ativar células T específicas ao antígeno fusionado e induzir também a produção de elevados títulos de anticorpos específicos. Nosso grupo tem utilizado nos últimos anos um mAb que é capaz de direcionar o antígeno para um subtipo de DCs caracterizado pela expressão do receptor endocítico DEC205 e da cadeia alfa da molécula de CD8 (DCs DEC205⁺CD8 α ⁺). Esse subtipo é capaz de apresentar antígenos tanto para linfócitos T CD4⁺ quanto para linfócitos T CD8⁺, além de induzir a produção de anticorpos. Neste trabalho, fusionamos o mAb α DEC205 a um fragmento de massa molecular aproximada de 42 kDa derivado da proteína 1 de superfície do merozoíto (MSP1) do *Plasmodium vivax*, um importante candidato para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária. Este fragmento de 42 kDa (MSP1₄₂) sofre ainda uma clivagem adicional durante a invasão das hemácias pelos merozoítos e produz dois fragmentos com massas moleculares aproximadas de 33 (MSP1₃₃) e 19 kDa (MSP1₁₉). A MSP1₁₉ é um importante alvo da resposta humoral, sendo que alguns trabalhos mostraram que pacientes infectados com *Plasmodium vivax* apresentam altos títulos de anticorpos contra esse fragmento. No que se refere à MSP1₃₃, outros trabalhos mostraram que nessa região encontram-se epítomos capazes de ativar linfócitos T. Para estudar a resposta induzida pelo direcionamento da proteína MSP1₄₂ para o subtipo de DCs DEC205⁺CD8 α ⁺, administramos duas doses do mAb α DEC-MSP1₄₂ na presença de poly (I:C), que é um agonista de TLR3 e MDA5, levando a maturação deste subtipo de DCs em particular. Grupos de camundongos C57BL/6 e B10.A foram imunizados e observamos elevados títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉ em ambas as linhagens estudadas. Verificamos também uma forte resposta celular quando esplenócitos dos animais imunizados foram reestimulados com a proteína MSP1₃₃ recombinante, mas não com a MSP1₁₉. Nossos resultados indicam que o direcionamento da MSP1₄₂ para o subtipo de DCs DEC205⁺CD8 α ⁺ é capaz de induzir uma potente resposta celular contra o fragmento de 33 kDa e elevados títulos de anticorpos contra a porção de 19 kDa nas duas linhagens de camundongos.

Palavras-chave: Malária. Células Dendríticas. DEC205. Anticorpos Monoclonais.

Abstract

Amorim KNS. Targeting the *Plasmodium vivax* MSP1₄₂ protein *in vivo* to the DEC205⁺CD8 α ⁺ dendritic cell subtype: [Ph. D. thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Dendritic cells (DCs) are key to the interaction between the innate and adaptive immune systems, as they are able to process and present antigens to T cells. In the last decade, studies conducted by several groups have shown that it is possible to target antigens to different DC subtypes using monoclonal antibodies (mAbs) to receptors present on the DC surface fused to the antigen of interest. The administration of low doses of these fusion mAbs in the presence of a maturation stimulus for DCs is able to activate specific T cells to the fused antigen, and also to induce the production of high titers of specific antibodies. In the last years, our group has been using a mAb that is able to direct the antigen to a DC subtype characterized by the expression of the endocytic receptor DEC205 and the CD8 alpha chain molecule (DCs DEC205⁺CD8 α ⁺). This subtype is capable of presenting antigens to CD4⁺ and CD8⁺ T cells, besides inducing antibody production. In this work, we fused the α DEC205 mAb with a 42 kDa fragment derived from the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 (MSP1), a major candidate for the development of a malaria vaccine. This fragment of 42 kDa (MSP1₄₂) is further cleaved during the invasion of red blood cells by merozoites and produces two fragments with approximate molecular masses of 33 (MSP1₃₃) and 19 kDa (MSP1₁₉). MSP1₁₉ is an important target of the humoral response, and some studies have shown that patients infected with *Plasmodium vivax* have high antibodies titers against this fragment. In relation to MSP1₃₃, other studies showed that epitopes capable of activating T cells are found in this region. In order to study the response induced by the MSP1₄₂ targeting to the DEC205⁺CD8 α ⁺ DC subtype, we administered two doses of the α DEC-MSP1₄₂ mAb in the presence of poly (I: C), a TLR3 and MDA5 agonist, that leads to maturation of DCs in this particular subtype. Groups of C57BL/6 and B10.A mice were immunized and we observed high anti-MSP1₁₉ antibody titers in both strains studied. We also observed a strong cellular response when splenocytes were restimulated with the recombinant MSP1₃₃ protein, but not with the MSP1₁₉. Our results indicate that MSP1₄₂ targeting to the DEC205⁺CD8 α ⁺ DC subtype is able to induce strong cellular response against the 33 kDa fragment, and high antibody titers against the 19 kDa portion in two strains of mice.

Keywords: Malaria. Dendritic Cells. DEC205. Monoclonal Antibodies

Lista de Figuras e Ilustrações

Figura 1 - Principais marcadores de células dendríticas e sua localização em humanos e camundongos.....	28
Figura 2 - Lectinas tipo C do tipo I (MMR e DEC205)	32
Figura 3 - Mapa esquemático apontando as regiões de áreas endêmicas	35
Figura 4 - Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento do parasita.....	37
Figura 5 - Esquema do gene que codifica a MSP1.....	49
Figura 6 - Clonagem da sequência da proteína MSP1 ₄₂ de <i>P.vivax</i> em fusão com a sequência da cadeia pesada do mAb α DEC205.....	70
Figura 7 - Clonagem da sequência da proteína MSP1 ₁₉ de <i>P.vivax</i> em fusão com a sequência da cadeia pesada do mAb α DEC205.....	71
Figura 8 - Clonagem da sequência da proteína MSP1 ₃₃ de <i>P.vivax</i> no vetor de expressão pET28a.....	72
Figura 9 - Produção da proteína MSP1 ₃₃	73
Figura 10 - Produção da proteína MSP1 ₁₉	74
Figura 11 - Os mAbs α DEC fusionados com as proteínas MSP1 ₁₉ e MSP1 ₄₂ foram produzidos com sucesso e são reconhecidos por soro de pacientes infectados com <i>P.vivax</i>	76
Figura 12 - Ensaio de ligação dos mAbs α DEC-MSP1 ₄₂ , α DEC-MSP1 ₁₉ e α DEC a células CHO expressando os receptores DEC205 de camundongo.....	77
Figura 13 - Ensaio de ligação dos anticorpos α DEC-MSP1 ₄₂ e α DEC-MSP1 ₁₉ a DCs provenientes do baço de camundongos.....	79
Figura 14 - Imunização com o anticorpo α DEC-MSP1 ₄₂ induz resposta contra a proteína MSP1 ₁₉	82
Figura 15 - Imunização de camundongos C57BL/6 ou B10.A com o mAb α DEC-MSP1 ₄₂ induz anticorpos de todas as subclasses de IgGs contra a proteína MSP1 ₁₉ de <i>P.vivax</i>	84
Figura 16 - Resposta humoral anti-MSP1 ₁₉ é abolida na ausência de linfócitos T CD4+.....	85

Figura 17 - Imunização com os mAbs α DEC-MSP1 ₄₂ e α DEC-MSP1 ₁₉ induz anticorpos que reconhecem a proteína MSP1 ₁₉ na superfície de células HEK293T transfectadas.	87
Figura 18 - O direcionamento da proteína MSP1 ₄₂ para o subtipo de células dendríticas CD8+DEC205+ induz anticorpos de alta avidéz.....	98
Figura 19 - Esplenócitos derivados de animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1 ₄₂ produzem IFN γ quando reestimulados com a proteína MSP1 ₃₃ em duas linhagens diferentes de camundongos.....	90
Figura 20 - Produção das citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α ex vivo pelas células dos animais imunizados com α DEC-MSP1 ₄₂ após serem reestimuladas com as proteínas MSP1 ₁₉ e MSP1 ₃₃ ou com peptídeo específico.....	93
Figura 21 - Produção das citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α ex vivo pelas células dos animais imunizados há 6 meses com α DEC-MSP1 ₄₂	94
Figura 22 - Imunização de camundongos com o mAb α DEC-MSP1 ₄₂ induz células T CD4+ polifuncionais que produzem IFN γ , IL-2 e TNF α quando reestimuladas com a proteína MSP1 ₃₃	96
Figura 23 - Células dos animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1 ₄₂ proliferam frente a um estímulo com a proteína MSP1 ₃₃ recombinante.....	98
Figura 24 - Células dos animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1 ₄₂ proliferam frente a um estímulo com a proteína MSP1 ₃₃ recombinante 6 meses após imunização.....	99
Figura 25 - A imunização com α DEC-MSP1 ₄₂ induz maior produção das citocinas IFN γ , TNF α e IL-10 após 5 dias de cultura.....	101
Figura 26 - Imunização com o mAb híbrido α DEC-MSP1 ₄₂ ou com a proteína MSP1 ₁₉ recombinante induz resposta semelhante contra a proteína MSP1 ₁₉	104
Figura 27 - Avaliação de subclasses de IgGs contra a proteína MSP1 ₁₉ de <i>P. vivax</i> em diferentes grupos.....	105
Figura 28 - O direcionamento da proteína MSP1 ₄₂ para a subpopulação de células dendríticas CD8+DEC205+ induz anticorpos de alta avidéz.....	106
Figura 29 - Esplenócitos derivados de animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1 ₄₂ produzem IFN γ quando reestimulados com a proteína MSP1 ₃₃	107
Figura 30 - Produção das citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α ex vivo pelas células dos animais imunizados com α DEC-MSP1 ₄₂ após serem reestimuladas com as proteínas MSP1 ₁₉ e MSP1 ₃₃	108
Figura 31 - Células dos animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1 ₄₂ proliferam frente a um estímulo com a proteína MSP1 ₃₃ recombinante.....	109

Tabela

Tabela 1 - Candidatos a vacina para Plasmodium vivax que estão atualmente em desenvolvimento (Tabela adaptada da revisão Mueeler 2015).....44

Lista de Abreviaturas

°C	Graus Celsius
µm	micrometro
BSA	Albumina bovina sérica
CD	Do inglês 'cluster of differentiation'
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Imunoensaio enzimático
HEK	Do inglês 'Human Embryonic Kidney'
HRP	Horseradish peroxidase
MHC	Do inglês 'complexo principal de histocompatibilidade'
min	minuto
mL	Mililitro
N	Normal

ng	Nanograma
NK	Do inglês 'natural killer'
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PEI	Polietilenoimina
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
Poly I:C	Polyinosinic:polycytidylic acid
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
V	volts

Lista de Símbolos

μ *mi* ('micro')

α *alfa*

β *beta*

γ *gama*

κ *kappa*

Lista de Fórmulas

CO_2 *dióxido de carbono*

H_2SO_4 *ácido sulfúrico*

HCl *ácido clorídrico*

NaOH *hidróxido de sódio*

NO *óxido nítrico*

Sumário

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Células Dendríticas	23
1.2 Subtipos de Células Dendríticas	24
1.2.1 Células dendríticas presentes em tecidos não linfoides	25
1.2.1.1 Células dendríticas CD103+CD11b-	25
1.2.1.2 Células dendríticas CD11b+	26
1.2.1.3 Células de Langherans	26
1.2.1.4 Células dendríticas migratórias	26
1.2.3 Células dendríticas residentes em órgãos linfoides	27
1.2.3.1 Células Dendríticas CD8α+ CD11b-	27
1.2.3.2 Células Dendríticas CD8α-CD11b+	27
1.3 Direcionando antígenos para o receptor DEC205 presente na superfície das células dendríticas	29
1.4 Malária e Epidemiologia	33
1.5 O Ciclo de Vida do Parasita	35
1.6 Sistema imune durante a malária	37
1.7 Desenvolvimentos de Vacinas	41
1.8 Vacinas contra a Fase Eritrocítica	45
1.9 Proteína de superfície de merozoíto (MSP1)	46
2 OBJETIVO	50
2.1 Objetivo Geral	51
2.2 Objetivos específicos	51
3 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1 Animais utilizados	53
3.2 Preparação de Bactérias Competentes	53
3.3 Transformação de Bactérias Competentes	53
3.4 Amplificação MSP1 ₄₂ e MSP1 ₁₉	54

3.5 Clonagem dos genes MSP1 ₄₂ e MSP1 ₁₉ em fusão com o plasmídeo codificando a cadeia pesada do anticorpo anti-DEC205.....	55
3.6 Amplificação e clonagem do gene da proteína MSP1 ₃₃ de <i>Plasmodium vivax</i> no vetor de expressão pET28a.....	56
3.7 Obtenção de DNA plasmidial em larga escala.....	56
3.8 Produção da Proteína MSP1 ₁₉ Recombinante.....	57
3.9 Produção da Proteína MSP1 ₃₃ Recombinante.....	58
3.10 Produção de anticorpos por transfecção de células HEK293T.....	59
3.11 Precipitação e purificação dos mAbs híbridos.....	59
3.12 Quantificação e avaliação da integridade dos mAbs híbridos.....	60
3.13 Ensaio para detecção de LPS	61
3.14 Ensaio de ligação dos anticorpos híbridos a células CHO expressando os receptores DEC205 de camundongo e humano.....	61
3.15 Ensaio de ligação dos mAbs híbridos em DCs provenientes do baço de camundongos.....	62
3.16 Imunização de camundongos com os diferentes mAbs híbridos na presença de estímulo de ativação para as DCs e análise da resposta imune celular induzida.....	62
3.17 Ensaio de ELISA.....	62
3.18 Elisa de afinidade.....	63
3.19 Ensaio de ELISA para tipagem das subclasses de imunoglobulinas G.....	64
3.20 Avaliação da resposta imune celular.....	64
3.20.1 Suspensão celular.....	64
3.20.2 Ensaio de ELISPOT.....	64
3.20.3 Marcação intracelular de células produtoras de IFN γ , IL-2 e TNF α	65
3.20.4 A análise da resposta imune celular através de proliferação medida pela diluição do corante CFSE.....	66
3.20.5 CYTOMETRIC BEADS ARRAY (CBA)	67
3.20.6 Análise estatística	67
4 RESULTADOS.....	68

4.1 Amplificação e clonagem do gene da proteína MSP1 ₄₂ de <i>Plasmodium vivax</i> em fusão com o gene que codifica a cadeia pesada do anticorpo.....	69
4.2 Amplificação e clonagem do gene da proteína MSP1 ₁₉ de <i>Plasmodium vivax</i> em fusão com o gene que codifica a cadeia pesada do anticorpo αDEC205.....	70
4.3 Amplificação e clonagem do gene da proteína MSP1 ₃₃ de <i>Plasmodium vivax</i> no vetor de expressão pET28a.....	71
4.4 Produção da Proteína MSP1 ₃₃ Recombinante.....	73
4.5 Produção da Proteína MSP1 ₁₉ Recombinante.....	74
4.6 Transfecção em células HEK 293T.....	74
4.7 Ensaio de ligação dos mAbs αDEC-MSP1 ₄₂ e αDEC-MSP1 ₁₉ a células CHO transgênicas.....	77
4.8 Ensaio de ligação dos mAbs quiméricos a DCs provenientes do baço de camundongo.....	78
4.9 Análise da resposta humoral em camundongos C57BL/6 ou B10.A imunizados com os mAbs αDEC-MSP1 ₄₂ ou αDEC-MSP1 ₁₉ em presença do adjuvante Poly (I:C)	80
4.10 Imunização induz anticorpos de todas as subclasses de IgGs contra a proteína MSP1 ₁₉ de <i>P. vivax</i>	83
4.11 Resposta humoral anti-MSP1 ₁₉ é abolida na ausência de linfócitos T CD4+.....	85
4.12 Imunização com o anticorpo αDEC-MSP1 ₄₂ e αDEC-MSP1 ₁₉ induz anticorpos que reconhecem a proteína MSP1 ₁₉ na superfície de células HEK 293T.....	86
4.13 A imunização com o mAb αDEC-MSP1 ₄₂ induz a produção de anticorpos contra MSP1 ₁₉ com maior afinidade.....	87
4.14 Análise da resposta celular em camundongos C57BL/6 ou B10.A imunizados com os mAbs quiméricos na presença do adjuvante Poly (I:C).....	88
4.15 Produção das citocinas IFNγ, IL-2 e TNFα ex vivo pelas células dos animais imunizados com αDEC-MSP1 ₄₂ após serem reestimuladas com as proteínas e peptídeos de interesse.....	91
4.16 Imunização de animais com o mAb αDEC-MSP1 ₄₂ induz células T CD4+ polifuncionais.....	95
4.17 Células dos animais imunizados com o anticorpo αDEC-MSP1 ₄₂ proliferam frente a um estímulo com a proteína MSP1 ₃₃ recombinante.....	97

4.18 Análise comparativa da imunização com os mAbs quiméricos e com as proteínas recombinantes.....	103
5 DISCUSSÃO.....	110
6 CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS *	124
APÊNDICES.....	130
A The presence of T cell epitopes is important for induction of antibody responses against antigens directed to DEC205+ dendritic cells (IMPRESS)	131
B Dendritic Cells and Their Multiple Roles during Malaria Infection.....	132
C Antigen Targeting to Dendritic Cells Allows the Identification of a CD4 T-Cell Epitope within an Immunodominant Trypanosoma cruzi Antigen.....	133
D Targeting the non-structural protein 1 from dengue virus to a dendritic cell population confers protective immunity to lethal virus challeng.....	134

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células Dendríticas

Ralph Steinman e Zanvil Cohn (1) (2) descobriram as Células Dendríticas (DCs) no final de 1970, mas a noção de que DCs têm um papel único no sistema imunológico foi recebida após décadas de ceticismo. Quarenta anos mais tarde, a capacidade das DCs em montar respostas imunes adaptativas é indiscutível, e sua contribuição para a indução de tolerância a auto antígenos também está se tornando cada vez mais evidente (3).

As DCs são células migratórias derivadas de precursores da medula óssea e que são encontradas na maioria dos tecidos. Ao contrário de linfócitos B e macrófagos, as DCs expressam altos níveis de moléculas de classe II e são células especializadas na captura e apresentação de antígenos. Elas foram primeiramente identificadas com base na sua morfologia (2), porém mais tarde observou-se que estas células expressam um conjunto único de moléculas de superfície que puderam ser identificadas utilizando-se diferentes anticorpos (4) (5). As DCs foram descritas como potentes estimuladoras de misturas alogeneicas de linfócitos, de respostas de células T antígeno-específicas e de respostas de anticorpos *in vitro* (6) (7, 8) (9).

Além desse importante papel na ativação da resposta imune adaptativa, as DCs estão também envolvidas em processos de desenvolvimento de tolerância, tanto na tolerância central, no processo de seleção negativa dos linfócitos autorreativos no timo (10), quanto no desenvolvimento de tolerância periférica, quando DCs presentes na circulação entram no timo e podem induzir a diferenciação de linfócitos T autorreativos em células regulatórias (11).

Como células centrais na ativação do sistema imune, as DCs identificam a presença de patógenos através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que, quando ativados, desencadeiam sinalizações intracelulares estimulando sua maturação e iniciando a resposta imune adaptativa (12). O processo de maturação resulta em uma série de mudanças fenotípicas que estão ligadas a capacidade aumentada de apresentar antígenos e ativar células T. Estas alterações fenotípicas incluem um aumento na produção de complexos de peptídeos ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade

(MHC) (7), aumento da expressão de moléculas que favorecem a formação da sinapse imunológica com as células T, entre elas CD48 e CD58, além de moléculas co-estimulatórias, como CD80 e CD86 (13), produção de quimiocinas (14), além de grandes quantidades de citocinas como interleucina (IL) -12 e interferons (IFN) do tipo I (15, 16).

1.2 Subtipos de Células Dendríticas

São inúmeros os marcadores moleculares expressos na superfície de DCs (17, 18). Em camundongos, as DCs podem ser subdivididas em diferentes subtipos que possuem geralmente como característica fenotípica a expressão da molécula CD11c. As principais diferenças fenotípicas entre os subtipos de DCs são a expressão diferencial dos marcadores CD11b, CD8 e B220.

As DCs que apresentam B220 e quantidades baixas da molécula CD11c em sua superfície são denominadas células dendríticas plasmocitoides (pDCs). As pDCs representam um pequeno subconjunto de DC que partilham uma origem semelhante, elas se acumulam principalmente no sangue e nos tecidos linfoides e entram nos linfonodos (LNs) através da circulação sanguínea (19, 20). As pDCs expressam níveis mais baixos de MHCII e de moléculas co-estimulatórias. Elas também expressam os receptores de reconhecimento de padrões moleculares (Toll-like receptors, TLRs) 7 e 9 e são bem menos eficientes em induzir a proliferação de linfócitos T (21, 22). No entanto, após o reconhecimento de ácidos nucleicos estranhos elas passam a produzir grande quantidade de IFN do tipo I e adquirem a capacidade de apresentar antígenos, ou seja, em contextos inflamatórios, as pDCs podem ser ativadas e se diferenciar em um subtipo específico no baço com maior capacidade na ativação de linfócitos T (23-25).

As DCs caracterizadas pela alta expressão de CD11c são denominadas células dendríticas convencionais (cDCs). As cDCs refere-se a todos os outros subtipos de DCs, exceto as pDCs. São um subconjunto de células hematopoiéticas que povoam a maioria dos tecidos linfoides e não-linfoides. As cDCs têm uma capacidade aumentada para detectar lesão e inflamação nos tecidos, capturar antígenos, processar e apresentá-los aos linfócitos T. Através desses processos, as cDCs induzem imunidade a quaisquer antígenos estranhos que invadam os tecidos e reforçam a tolerância a auto-antígenos. Essa capacidade das cDCs se dá porque estas células possuem algumas características como: 1. localização em tecidos não-linfoides e na zona marginal do baço e linfonodos, onde adquirem antígenos dos tecidos e do sangue (3), 2. maquinaria superior para processamento e apresentação de antígenos (26), 3. capacidade de migrar carregando antígenos para a zona de células T nos órgãos linfoides (27) e 4. capacidade superior em ativar células T naive (28).

O papel das cDCs como sentinelas exige que elas “sintam” e respondam aos estímulos ambientais. As respostas aos estímulos ambientais manifestam-se na forma de alterações fenotípicas. A definição de um subtipo de cDC deve ser baseada na especificidade do desenvolvimento e na especialização funcional e não simplesmente em um conjunto de diferenças fenotípicas. Abaixo, discutiremos os distintos subtipos de cDCs que foram identificados em tecidos linfoides e não linfoides (3).

1.2.1 Células dendríticas presentes em tecidos não linfoides

Representam 1-5% das células do tecido, dependendo do órgão e consistem em dois subtipos principais: CD103⁺CD11b⁻ e CD11b⁺CD103⁻(3).

1.2.1.1 Células dendríticas CD103⁺CD11b⁻

Compartilham sua origem e função com as DCs CD8 α ⁺ dos tecidos linfoides. As cDCs CD103⁺ co-expressam o marcador CD8 α na superfície da célula, baixos níveis de MHC II e preenchem tecidos mais conjuntivos. A

proporção de CD103⁺ entre as cDCs é cerca de 20-30% e são encontradas nas mucosas intestinal, respiratória, gastrointestinal e no pâncreas (29).

1.2.1.2 Células dendríticas CD11b⁺

O subtipo CD11b⁺ consiste em uma mistura de cDCs dos tecidos e macrófagos, o que contribuiu para a confusão que ainda existe sobre a contribuição exata de DCs e macrófagos na imunidade de tecidos. As cDCs CD11b⁺ não expressam o CD103. Estão presentes na lâmina muscular e surgem a partir de precursores de monócitos. Também estão presentes nas mucosas intestinal, respiratória e gastrointestinal (30-32).

1.2.1.3 Células de Langherans

São células dendríticas abundantes na epiderme, contendo grandes grânulos chamados grânulos de Birbeck. Representam 3-6% de todas as células epidérmicas (33). Estão presentes em linfonodos, podendo ser encontradas em outros órgãos. São células móveis e responsáveis pela imunovigilância cutânea (34). São caracterizadas fenotipicamente por níveis mais baixos de MHC II, níveis de CD11c intermediários e níveis elevados da lectina de tipo C conhecida como langerina (CD207). A langerina está envolvida na formação dos grânulos de Birbeck intracitoplasmáticos, os quais durante muito tempo representaram um marcador visível (33).

1.2.1.4 Células dendríticas migratórias

Elas são cDCs presentes em tecidos não linfoides que migram constantemente através de vasos linfáticos aferentes para áreas de células T nos linfonodos carregando o antígeno (35). A natureza migratória das cDCs depende do local de drenagem dos LNs (36). Embora a maioria das cDCs migratórias morrem nos linfonodos, algumas saem através dos vasos linfáticos eferentes para acessar o sangue e desempenhar um papel na resposta imune

dos tecidos e na tolerância (37). Essa migração é controlada por CCR7 (38). As cDCs migratórias distinguem-se dos cDCs residentes com base na expressão mais elevada de MHC II e na expressão intermediária de CD11c (39).

1.2.3 Células dendríticas residentes em órgãos linfoides.

As cDCs residentes nos tecidos linfoides vem pelo sangue, diferenciam-se e passam toda a sua vida dentro destes tecidos. São enriquecidas em tecidos linfoides associados a mucosa da nasofaringe, placas de Peyer e folículos linfoides no intestino (40). Nos órgãos linfoides secundários, como baço e linfonodos, as cDCs podem ainda ser subdivididas em dois subtipos majoritários $CD8\alpha^+CD11b^-$ e $CD8\alpha^-CD11b^+$.

1.2.3.1 Células Dendríticas $CD8\alpha^+ CD11b^-$

Representam 20-40% das cDCs residentes nos tecidos linfoides e são caracterizadas por expressar a cadeia α da molécula de CD8 e pela expressão simultânea do receptor DEC205 ou CD205 (18). Estas células estão localizadas principalmente nas áreas de células T e na zona marginal do baço e linfonodos. Evidências sugerem que as DCs $CD8\alpha^+CD205^+$ são eficientes na captura de antígenos e na sua apresentação pela via MHC II ativando diretamente linfócitos T $CD4^+$, mas também na apresentação desses antígenos por “cross-presentation”, via moléculas de MHC I, promovendo assim a ativação de linfócitos T $CD8^+$ (41, 42).

1.2.3.2 Células Dendríticas $CD8\alpha^-CD11b^+$

Esse subtipo é caracterizado pela ausência da expressão da molécula $CD8\alpha$ e por apresentar em sua superfície a molécula $CD11b$ (18) e o receptor endocítico DCIR2, sendo encontrado entre as zona de células T e a zona de células B. As células dendríticas $CD11b^+DCIR2^+$ são mais eficientes em ativar

células T auxiliares, polarizando para um perfil de resposta TH2 ou TH17, promovendo assim uma resposta humoral robusta (43).

Ambos os subtipos descritos acima também podem ser encontrados em humanos, onde apresentam outros marcadores de superfície. Por exemplo, em humanos o subtipo de DCs correspondentes às DCs CD8 α ⁺DEC205⁺ murinas expressa CD141 e BDCA3 (CD141⁺BDCA3⁺), enquanto o subtipo CD11b⁺DCIR2⁺ murino corresponde ao subtipo CD1c⁺BDCA1⁺ humano (Figura 1) (44, 45).

Figura 1 - Principais marcadores de células dendríticas e sua localização em humanos e camundongos. As cores indicam se um marcador específico é expresso apenas em seres humanos (laranja), apenas nos camundongos (verde) ou em ambas (azul) Fonte. Amorim KNS 2016.

1.3 Direcionando antígenos para o receptor DEC205 presente na superfície das células dendríticas

Na superfície das DCs existem receptores endocíticos capazes de mediar a captação de antígenos. Muitos destes são lectinas do tipo C (46), que podem ser proteínas transmembrana do tipo II com um único domínio C-terminal do tipo lectina (por exemplo, Langerina/CD207, DC-SIGN/CD209, BDCA-2, Dectina-1 e DCIR-2), ou proteínas transmembrana do tipo I, com múltiplos domínios do tipo lectina (por exemplo, receptor de manose (MR)/CD206 e DEC205/CD205). Existem ainda receptores endocíticos que reconhecem a porção Fc das imunoglobulinas G (FcγRs), os quais medeiam a apresentação de imunocomplexos e de células tumorais revestidas com anticorpos, tanto por moléculas de MHC I quanto por MHC II (47).

Como mencionamos acima, o receptor DEC205/CD205, foco do nosso trabalho, também pertence à família de receptores das lectinas tipo C (Figura 2) (48, 49). Diversos estudos demonstraram que é possível direcionar antígenos para DCs utilizando-se anticorpos monoclonais (mAbs) quiméricos anti-DEC205 acoplados a um antígeno. Essa técnica foi descrita por Hawiger e cols (50) e Bonifaz e cols (9). Nesses estudos iniciais, o mAb anti-DEC205 foi conjugado ou fusionado diretamente a antígenos modelo como a ovalbumina (OVA) e lisozima de ovo de galinha (HEL). A administração desses mAbs híbridos (anti-DEC-OVA e anti-DEC-HEL) foi capaz de direcionar os antígenos ao subtipo de DCs CD8 α ⁺DEC205⁺ *in vivo*. Os antígenos foram então eficientemente processados e apresentados tanto para células T CD4⁺ quanto para células T CD8⁺ e quando o direcionamento ocorreu na presença de um adjuvante (como o anticorpo anti-CD40), houve ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Além disso, houve indução de uma robusta resposta humoral (51). No entanto, quando os mAbs foram administrados na ausência de estímulo inflamatório concomitante, foi observada indução de tolerância periférica (9, 50).

O mAb anti-DEC205 foi também fundido à proteína circunsporozoita (CSP) que é expressa pelas formas esporozoítas do *Plasmodium yoelii*. A administração de uma única dose do mAb quimérico anti-DEC-CSP na presença de um estímulo de maturação para as DCs foi capaz de induzir

células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN γ em diferentes linhagens de camundongos (51). Outro trabalho utilizando apenas uma dose do mAb anti-DEC205 acoplado à proteína GAG do vírus HIV mostrou que a imunização foi capaz de levar à indução de uma forte resposta imune mediada principalmente por células T CD4⁺ produtoras de IFN γ . Esta resposta somente ocorreu quando o mAb quimérico foi administrado na presença de estímulos de maturação para as DCs (52, 53). A eficácia da imunização com DNA também pôde ser aumentada quando se utilizou um plasmídeo codificando para o mAb anti-DEC205 em fusão com a proteína GAG (54).

Além disso, em um modelo utilizando um antígeno de *Yersinia pestis* verificou-se que o direcionamento desse antígeno para o subtipo de células dendríticas DEC205⁺ resultou em um perfil de resposta imune do tipo Th1. Quando o alvo foi o receptor DCIR2, ocorreu o aumento das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, além da produção de IL-13. Foi a primeira vez que houve indução de proteção num modelo murino usando-se um agente patogênico humano (55).

A fim de verificar se células T CD4⁺ podiam ser induzidas para proteínas próprias, um grupo utilizou o anticorpo anti-DEC205 fusionado à proteína survivina que é super expressa em tumores. O direcionamento desse antígeno para o subtipo de células dendríticas DEC205⁺ na presença de anti-CD40 e poly (I:C) induziu células T CD4⁺ específicas e produtoras de IFN γ , TNF α e IL-2. Além disso, essa imunização foi capaz de induzir células T CD8⁺ após a administração de uma segunda dose do mAb de fusão (56).

É interessante ressaltar que os resultados discutidos acima utilizaram concentrações baixas dos mAbs quiméricos (5-10 μ g/camundongo) e foram capazes de induzir respostas imunes tão potentes ou superiores àquelas induzidas por imunizações padrão (51-53).

Também foram realizados experimentos em macacos rhesus (*Macaca mulatta*) utilizando o mAb α DEC205 fundido à proteína circumsporozoíta (CS) de *Plasmodium falciparum* na presença de poly (I:C). Observou-se a indução de células T CD4⁺ polifuncionais e de anticorpos anti-CS que bloquearam a invasão do *P. falciparum in vitro* em cerca de 43% (57).

Além de experimentos *in vivo* utilizando camundongos e macacos, o anticorpo α DEC205 humano também foi utilizado com sucesso para direcionar antígenos para as DCs humanas (58, 59). Bozzacco e cols. mostraram a ativação de linfócitos T CD8⁺ e produção de IFN γ quando o mAb anti-DEC205 humano em fusão com a proteína GAG do vírus HIV foi incubado com DCs provenientes de pacientes aidéticos que depois foram utilizadas para reestimar células T destes mesmos pacientes (58). Outro resultado semelhante foi obtido utilizando-se o mAb anti-DEC205 humano em fusão com o antígeno EBNA-1 do vírus Epstein-Barr. As DCs dos pacientes foram capazes de induzir potente resposta celular (59). Em um outro trabalho utilizando-se o modelo de câncer, o antígeno NY-ESO-1 (expresso em câncer de testículo) foi fusionado mAb anti-DEC205 humano. O direcionamento para DCs *in vitro* foi capaz de induzir células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas para o antígeno em questão (60).

Nosso grupo também vem obtendo resultados promissores com a estratégia de direcionamento de antígenos para DCs. Direcionamos a proteína NS1 do vírus da dengue juntamente com um estímulo de maturação para os subtipos DEC205⁺CD8 α ⁺ e CD11b⁺DCIR2⁺ e avaliamos as respostas imune celular e humoral. Ambos os subtipos de DCs foram capazes de induzir uma potente resposta humoral após a segunda dose. Porém, quando analisamos a resposta celular, apenas o grupo de animais que foi imunizado com α DEC-NS1 induziu resposta celular. Além disso, os camundongos imunizados com o mAb α DEC-NS1 foram significativamente protegidos contra um desafio letal, via intracraniana, com a cepa DENV2 NGC quando comparados com animais imunizados com o mAb α DCIR2-NS1 (61).

Além de direcionar um antígeno do vírus da dengue, nosso grupo também já direcionou a proteína 2 de superfície dos amastigotas (ASP-2) de *Trypanosoma cruzi* para o subtipo de DCs CD8 α ⁺DEC205⁺. Neste caso o mAb α DEC205 foi fusionado a ASP-2 e administrado *in vivo* na presença de poly (I:C) como adjuvante. Por meio dessa estratégia foi possível identificar regiões na proteína que continham epítomos de células T. Além disso, observamos um aumento de células T CD4⁺ produtoras de IFN γ nos animais imunizados com o mAb α DEC-ASP2 quando comparados aos animais que receberam apenas

a proteína ASP-2 recombinante sem o direcionamento (62). O direcionamento dessa proteína possibilitou o reconhecimento de epítomos de células T específicos, ou seja, o direcionamento de antígenos para as DCs é uma estratégia útil para aumentar a resposta de células T específicas, facilitando assim a identificação de novos epítomos.

Os resultados descritos acima abrem a possibilidade de utilizarmos mAbs quiméricos em protocolos de vacinação mais amplos que visem a eventual imunização de seres humanos.

Figura 2 - Lectinas tipo C do tipo I (MMR e DEC205). Contém repetições ricas em cisteínas (S-S) nas porções C-terminais, um domínio fibronectina do tipo II (FN) e 8-10 domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD). Lectinas tipo C do tipo II contém somente um CRD no seu domínio carboxi-terminal. Os domínios citoplasmáticos são bastante diversos e contém vários motivos conservados. Fonte: Figdor et al 2002.

1.4 Malária e Epidemiologia

A malária é um importante problema de saúde pública e ocorre em aproximadamente 100 países. É uma doença causada por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, família *Plasmodidae* e gênero *Plasmodium*, sendo um parasita unicelular transmitido para o homem através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. Existem 5 espécies que infectam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Esta última espécie, conhecida por infectar macacos rhesus, vem sendo diagnosticada no sudeste da Ásia (63). A infecção por *P. knowlesi* é mais rara em seres humanos e difícil de diagnosticar: o primeiro caso registrado foi em 2004 (64). Já o *P. ovale* e o *P. malariae* são responsáveis pelas formas mais brandas da doença e possuem menor prevalência. As espécies mais prevalentes são o *P. falciparum* e o *P. vivax*, sendo que o *P. vivax* é a espécie mais prevalente mundialmente, responsável por mais de 70% dos casos de malária nas Américas Central e do Sul (65).

A história da malária se confunde com a do próprio homem. Existem relatos na bíblia sobre casos de febre intermitente associados com punição divina que parecem ser quadros de malária. Além disso, há algumas evidências que a malária contribuiu para o declínio do império romano onde a doença era tão comum que era conhecida como “febre romana”. Apesar de a doença existir há milhares de anos, somente no século XVIII evidenciou-se a presença de parasitas em hemácias humanas, sendo seu ciclo e transmissão melhor elucidados no século seguinte (66-68).

Atualmente, a malária continua sendo um problema de saúde pública, principalmente para os 97 países com regiões tropicais e subtropicais onde ocorre a maior transmissão da doença (Figura 3), com uma estimativa de que 3,4 bilhões de pessoas estejam expostas e correm o risco de se infectar. Em 2015 ocorreram 214 milhões de casos levando a 438 mil óbitos, sendo que 306 mil eram crianças menores de 5 anos (69).

A malária no Brasil atingiu seu maior índice nos anos 40 quando foram notificados cerca de 6 milhões de casos. Contudo, estratégias de prevenção

e controle do vetor resultaram na diminuição do número de casos. Porém, com a ocupação da Amazônia na década de 60, ocorreu um movimento migratório que levou novamente a um aumento progressivo no número de casos (70). Atualmente, a incidência de malária no Brasil está quase que exclusivamente restrita à região da Amazônia Legal, onde um número de fatores combinados favorece a transmissão de doenças e prejudica a utilização de procedimentos de controle padrão (65).

No Brasil, a malária causada pelo *P. vivax* é responsável por cerca de 83,7% dos casos registrados, enquanto que o *P. falciparum* é responsável por 16,3%. Infecções pelo *P. malariae* são mais raramente descritas (71).

Apesar da malária causada pelo *P. vivax* ser considerada uma doença branda quando comparada com a causada pelo *P. falciparum*, nos últimos anos vem sendo relatadas no Brasil complicações clínicas com casos fatais (71).

Nas últimas seis décadas, a malária tem sido alvo de intensas campanhas que visam erradicar a transmissão do parasito através de medidas de controle de vetores e do uso de quimioterapias. Medidas de controle e de saneamento têm contribuído para a eliminação da malária em algumas áreas. Porém, o *P. vivax* possui formas latentes do parasita (hipnozoitos) que possibilitam recaídas algum tempo depois que a parasitemia inicial foi eliminada (72), dificultando a eliminação dessa espécie.

Figura 3 - Distribuição da malária no mundo em 2014. Mapa esquemático apontando as regiões de áreas endêmicas, demarcadas em tonalidades diferentes, referenciando o número de casos confirmados em cada região por mil habitantes
 Fonte: World Malaria Report 2014, WHO.

1.5 O Ciclo de Vida do Parasita

O ciclo de vida do parasita da malária (Figura 4) se inicia quando a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, ao realizar o repasto sanguíneo, pica o indivíduo contaminado e ingere formas sexuadas do parasita denominadas gametócitos. Os gametócitos vão para o estômago do mosquito e, após diferenciação em gametas, ocorre sua fusão e formação do ovo (zigoto), o qual se transforma em uma oocineto e migra até a parede do intestino médio do inseto, formando o oocisto. No interior do oocisto ocorre o desenvolvimento de esporozoítos. O tempo requerido para que se complete o ciclo esporogônico nos insetos varia com a espécie de *Plasmodium*, geralmente em torno de 10 a 12 dias (73). Os esporozoítos produzidos nos oocistos são liberados na hemolinfa do inseto e migram até as glândulas salivares, de onde são transferidos para o sangue do hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo. Alguns estudos indicam que, uma vez

inoculados na derme, grande parte dos esporozoítos infectantes permanece no local da picada durante horas, com liberação lenta na circulação (74, 75).

Aproximadamente 50% dos esporozoítos deixam a derme, de maneira que, dentre estes, 70% atingem os vasos sanguíneos dirigindo-se para o fígado invadindo hepatócitos, enquanto que os 30% restantes invadem os vasos linfáticos. Estes esporozoítos que são levados através dos vasos linfáticos apresentam um movimento de deslizamento lateral, sendo detectados posteriormente nos linfonodos, onde entram em contato com células do sistema imune, e apenas uma pequena porcentagem se desenvolve na forma exo-eritrocítica. A partir do sistema circulatório, os esporozoítos são transportados para o fígado onde, após a invasão, se replicam no interior dos hepatócitos. Para que esses parasitas consigam sair do fígado e chegar novamente na corrente sanguínea formam estruturas denominadas merossomos, que são vesículas constituídas de parte do citoplasma das células infectadas (76). Após a entrada do parasita na célula hepática, ocorre a diferenciação do esporozoíto em um esquizonte multinucleado e, eventualmente, em milhares de merozoítos que futuramente invadirão as hemácias iniciando assim a fase eritrocítica (8). Nesse estágio, após invadir os glóbulos vermelhos, o parasita se replica originando novos merozoítos que, ao serem liberados após hemólise, irão infectar novas células. Durante a replicação, alguns parasitas se diferenciam em formas gametocíticas capazes de infectar o vetor invertebrado. É esta fase a responsável pelos sintomas clínicos da doença (76).

Alguns estudos mostram que dependendo da espécie, esse ciclo pode ser ligeiramente diferente, sendo o caso do *P. vivax* que possui características biológicas únicas como por exemplo formas latentes, conhecidas como hipnozoítos, no fígado que causam uma subsequente infecção conhecida como recaída, além da sua preferência em invadir somente reticulócitos (77).

Figura 4 - Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento do parasita. Apresentando as duas fases que ocorrem dentro do hospedeiro vertebrado e a fase sexuada que ocorre dentro do hospedeiro invertebrado. Fonte Winzeler EA 2008

1.6 Sistema imune durante a malária

A resposta imune humana contra infecções por parasitas da malária é complexa e varia com o nível de endemidade, composição genética, idade do hospedeiro, fase do parasita e espécies.

A infecção pelo *Plasmodium* causa diversos sintomas clínicos tais como: febre intensa e intermitente que se repete em intervalos característicos associada a prostração, cefaleia, sudorese e vômitos, podendo ser fatais principalmente em infecções por *P. falciparum*. Porém, alguns indivíduos residentes em áreas endêmicas apresentam quadros brandos da doença, também chamados de assintomáticos. Apesar da forte ativação do sistema imune que ocorre durante a infecção pelo *Plasmodium*, a memória imunológica gerada na maioria das vezes é transitória e restrita a pacientes residentes em áreas endêmicas, devido à frequente exposição ao parasita pela picada de mosquitos infectados (78). Ou seja, essa imunidade naturalmente adquirida não é suficiente, necessitando da persistência da carga parasitária para a manutenção das células de memória (79). Diversas

evidências sugerem que a imunidade naturalmente adquirida contra a malária seja obtida após sucessivas infecções (80). Crianças longamente expostas à transmissão apresentam sucessivos episódios clínicos de malária e, com o passar da idade, os sintomas clínicos da doença são menos pronunciados. (81)

De uma maneira geral, a imunidade clínica é parcialmente específica e leva primeiramente a uma redução das complicações da doença e das taxas de mortalidade, posteriormente a uma queda da parasitemia em níveis baixos, ou mesmo indetectáveis, e finalmente a um decréscimo na incidência da doença (82).

Alguns estudos mostraram que essa imunidade clínica pode ser atribuída a resposta humoral e, de fato, experimentos de transferência passiva de anticorpos, realizados nas décadas de 60 e 70, demonstraram claramente que anticorpos contra as formas sanguíneas estão envolvidos na imunidade protetora. Em regiões de transmissão intensa e estável, onde o *P. falciparum* é espécie predominante, os recém-nascidos são resistentes à infecção durante os primeiros três meses de vida. Essa resistência tem sido atribuída principalmente à transferência passiva de anticorpos protetores IgG da mãe imune para o feto durante a gestação (83).

Na resposta contra os estágios sanguíneos, a eliminação do parasita parece ocorrer após desenvolvimento de uma resposta específica de anticorpos a antígenos variantes de superfície (84). Evidências obtidas na última década mostraram que pelo menos dois mecanismos estão envolvidos: 1. participação de anticorpos opsonizantes que promovem a fagocitose de eritrócitos infectados (85) e 2. presença de anticorpos citofílicos (subclasses IgG1 e IgG3, em humanos) que promovem a inibição do crescimento do parasita intra-eritrocítico (86).

Para entender melhor como ocorre o reconhecimento do parasita pelo sistema imune do hospedeiro, iremos discutir a seguir a complexa relação entre esses dois componentes.

No instante em que a forma infectante do parasita, o esporozoíta, entra em contato com o indivíduo, o sistema imune inato do hospedeiro reconhece o parasita e começa a agir através de mecanismos de defesa inicial, tais como: células dendríticas, fagócitos, células “Natural Killer” (NK), NK-T, células T $\gamma\delta$,

além de fatores solúveis como o sistema complemento, proteínas da fase aguda, citocinas e quimiocinas. A resposta imune inata é essencial não somente para limitar a fase inicial de multiplicação do parasita como também para controlar a infecção até que a imunidade adaptativa seja estabelecida. Modelos experimentais indicam que a sobrevivência à malária está intimamente ligada a habilidade de controlar a reprodução dos estágios sanguíneos do parasita nas primeiras semanas após a infecção (79).

A indução dos mecanismos que caracterizam a imunidade inata independe do contato prévio do hospedeiro com o patógeno, indicando que sua ativação é mediada por moléculas conservadas entre as diferentes espécies ou cepas do microrganismo (79). Essas moléculas conservadas, denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), interagem com receptores, os TLRs (“toll like receptors”), presentes nas células do sistema imune. As interações iniciais entre estágios sanguíneos do parasita e as células do sistema imune inato são consideradas importantes para moldar a resposta imune adaptativa contra a infecção (87).

As células NK representam uma importante fonte inicial de IFN γ e são responsáveis pela eliminação das formas pré-eritrocíticas do parasita devido aos processos de citotoxicidade desencadeados em resposta ao parasita (88). Já as células T são encontradas em maior número nas infecções agudas por *P. falciparum* e *P. vivax*, desencadeando também a produção de IFN γ (89). Ambas desempenham papel crucial no desenvolvimento das respostas inata e adaptativa (79). Os macrófagos são capazes de fagocitar eritrócitos parasitados graças a uma interação envolvendo o receptor de superfície CD36 e a proteína PfEMP-1 (“*P. falciparum* encoded erythrocyte membrane protein 1”), além de atuarem como células apresentadoras de antígenos durante a infecção por *Plasmodium* (90).

Acredita-se que a resposta imune contra o *Plasmodium* pode ser desenvolvida especificamente contra cada um dos estágios do parasita (71). De fato, existem alguns componentes do *Plasmodium* capazes de ativar TLRs como as âncoras de GPI (glicofosfatidilinositol) que são expressas na membrana de merozoítos e reconhecidas principalmente por TLR1, TLR2 e TLR4 em células dendríticas, monócitos e células B. Esse reconhecimento induz a uma série de sinalizações intracelulares que levam a produção de

TNF α , IL-1 β e IL-12 em macrófagos de camundongos e em PBMCs de humanos infectados por *Plasmodium* (91). Outro exemplo dessa ativação é a hemozoína, um pigmento insolúvel, que é o produto da degradação da hemoglobina pelo parasita sendo capaz de ativar células dendríticas via interação com TLR9, aumentando a produção de citocinas inflamatórias (92).

Existe um consenso de que a resposta imune efetiva para controlar a infecção por malária seja decorrente da ação de anticorpos e da resposta imune celular (93). De fato, a resposta imune humoral é essencial para o controle da infecção causada pelo *Plasmodium* e diversos trabalhos evidenciam isso. Por exemplo, a transferência de anticorpos IgG de pacientes africanos imunes para pacientes tailandeses infectados por *P. plasmodium* foi capaz de reduzir a carga parasitária destes últimos (94), demonstrando assim que a resposta humoral é de suma importância na fase eritrocítica da malária. Em outro trabalho, verificou-se a presença de anticorpos citofílicos das subclasses IgG1 e IgG3 que foram associados à diminuição dos sintomas e da carga parasitária (95, 96). Esses anticorpos atuam promovendo a opsonização do patógeno ou do eritrócito infectado, ativando a via clássica do sistema complemento ou mediando a citotoxicidade celular dependente de anticorpos, via interação com os receptores Fc da superfície de fagócitos.

Outro grupo de células que parecem ser importantes no controle da malária são as células T $\gamma\delta$. Elas atuam na produção de IFN γ e TNF α nas primeiras 12 horas de infecção. Vários estudos com camundongos nocautes indicaram que o IFN γ desempenha um papel essencial na imunidade protetora contra a infecção por *Plasmodium* (97).

As células T CD8 $^{+}$ também desempenham funções importantes durante a infecção por *Plasmodium*. Estudos vêm mostrando a importância dessas células na imunidade protetora (98, 99). Quando falamos em células T CD8 $^{+}$ se torna imprescindível falar de células T CD4 $^{+}$ uma vez que essas células são essenciais na expansão de células T CD8 $^{+}$. Além disso, um estudo utilizando modelo murino mostrou que a proteção induzida por imunizações com esporozoítos irradiados requer resposta celular com ativação de linfócitos T CD4 $^{+}$ (100). Os primeiros estudos utilizando modelos experimentais demonstraram claramente que a imunidade protetora contra a malária induzida por esporozoítos requer ativação de células T CD8 $^{+}$ (101), sendo seu

papel vital na imunidade na fase pré-eritrocítica da malária (102). Isto também foi observado em seres humanos (103). As células T CD8⁺ eliminam hepatócitos infectados e são capazes de produzir IFN γ e TNF α (104).

Por outro lado, ação exacerbada do sistema imune pode estar associada à patologia da malária. Alguns trabalhos têm associado a malária cerebral com altos níveis circulantes de citocinas inflamatórias, tais como TNF α , IL-1, IL-6 e IFN γ , correlacionando-o inclusive com o início da patologia em camundongos, bem como em seres humanos. Acredita-se que os efeitos prejudiciais do IFN γ são devido à sua capacidade de ativar macrófagos, o que por sua vez produz pirógenos endógenos (TNF α , IL-1 e IL-6) que conduzem a uma cascata inflamatória (105). É importante frisar que o perfil de citocinas, incluindo IFN γ liberado nas primeiras horas após a infecção da malária, prediz o curso da infecção e o resultado (106) .

Contudo, fica claro que é necessária uma regulação do sistema imune evitando uma resposta imune exacerbada. Nossa compreensão a respeito do desenvolvimento da imunidade bem como o processo de imunorregulação na malária permanece incompleta. As DCs, além de atuarem na resposta imune de forma ostensiva, também agem na regulação produzindo citocinas imunossupressoras que podem ter papel fundamental nessa regulação da resposta imune pró-inflamatória exacerbada que ocorre em indivíduos que desenvolvem malária grave. Apesar disso, essas células são pouco exploradas na malária (107-110).

1.7 Desenvolvimentos de Vacinas

Os primeiros trabalhos em busca de uma vacina contra a malária surgiram a partir do estudo experimental de imunização com esporozoítos irradiados (111). Voluntários humanos imunizados com esporozoítos irradiados de *P. falciparum* desenvolveram uma resposta imunitária protetora contra a infecção (112, 113). A princípio, esta observação apoiou a ideia de uma vacina eficaz contra a malária, porém dificuldades na produção de grandes quantidades de esporozoítos irradiados adicionam um obstáculo adicional a utilização desta técnica.

Apesar de intensas pesquisas durante os últimos trinta anos, ainda não existe uma vacina eficaz disponível para o *P. vivax* (114). O desenvolvimento de vacinas contra a malária é considerado a estratégia mais importante no combate à doença, tendo em vista seu alto potencial de prevenção e consequentemente a redução da transmissão. Apesar dos progressos significativos que foram alcançados na procura de antígenos para o *P. falciparum* que poderiam ser usados numa vacina, no caso do *P. vivax* esse progresso tem sido limitado. Isso ocorre principalmente devido à falta de culturas *in vitro* para servir como uma fonte de antígeno e a um financiamento inadequado das pesquisas (115). Além disso, uma vacina para o *P. vivax* é de extrema importância, tendo em vista algumas características: a sua capacidade de recaída devido aos estágios de dormência de longa duração no fígado (os hipnozoítos) (116) e o seu alto potencial de transmissão devido a produção precoce e contínua dos gametócitos, além de alta infectividade aos mosquitos e o seu ciclo de desenvolvimento mais curto no hospedeiro em relação a outras espécies de *Plasmodium* (77).

A vacina em estágio mais avançado contra a malária, a RTS,S/A02A, é baseada na região repetitiva do antígeno CSP de *P. falciparum* fusionada ao antígeno de superfície (S) do vírus da hepatite B (RTS,S) e administrada na presença do adjuvante AS02 (QS-21 + MPL). Ela é desenvolvida pela indústria farmacêutica Glaxo-SmithKline e tem como alvo principal a fase pré-eritrocítica do desenvolvimento do parasita, proporcionando imunidade de longa duração com eficácia de 30 a 50% de proteção em crianças (117). Apesar de promissora, essa vacina destina-se unicamente ao combate da malária causada pelo *P. falciparum*, e já foram concluídos os ensaios da fase III nos quais recebeu parecer científico positivo, o que levou a sua inclusão no calendário vacinal de 13 países africanos (114). O mesmo conceito para o desenvolvimento de uma vacina no modelo de *P. vivax* foi realizado utilizando a região repetitiva da CSP, porém a imunização com essa proteína não induziu proteção estéril (118). Desta forma, o desafio em busca do melhor candidato vacinal para *P. vivax* continua, uma vez que os melhores candidatos vacinais ainda estão em fase pré-clínica ou em fases I e/ou II de ensaios clínicos (Tabela 1).

Por outro lado, a utilização de antígenos de membrana da fase eritrocítica do desenvolvimento do parasita como alvos vacinais parece ser uma boa alternativa, visto que o *Plasmodium* utiliza algumas dessas proteínas como suporte e ancoragem na membrana do eritrócito para realizar a infecção de novas células. Vacinas contra a fase eritrocítica não evitam a infecção, mas podem induzir uma resposta capaz de eliminar completamente os parasitas da fase sanguínea ou que diminua consideravelmente a carga parasitária. Desta forma, pode haver uma redução no tempo de infecção, atenuando os sintomas e, possivelmente, evitando que o doente infecte outro vetor anofelino, o que interromperia o ciclo de vida do *Plasmodium*.

Tabela 1 - Candidatos a vacina para Plasmodium vivax que estão atualmente em desenvolvimento (Tabela adaptada da revisão Mueeler 2015)

Estágio do ciclo de vida	Fase de desenvolvimento	Antígeno	Sistema de entrega
Fígado	Fase I / II	PvCSP	Proteína recombinante-AS01B
Fígado	Pré-clínico	PvCSP	Antígeno de fusão HBsAg -AS01B
Fígado	Fase I	PvCSP	Peptídeo- sintético com adjuvante Montanide ISA 720
Fígado	Fase I	PvTRAP	Prime e Boost com vetores virais
Sangue	Pré-clínico	PvDBP	PGLA
Sangue	Pré-clínico	PvDBP	Proteína recombinante
Sangue	Pré-clínico	PvDBP	Prime e Boost com vetores virais
Sangue	Pré-clínico	PvMSP1	Proteína recombinante Montanide ISA720
Sangue	Pré-clínico	PvAMA1	Prime e Boost com vetores virais
Sangue	Pré-clínico	PvAMA1	Proteína recombinante - adjuvante
Trans etapa	Fase I	Pvs25	Proteína recombinante - Montanide ISA 51
Trans etapa	Pré-clínico	Pvs28	Proteína recombinante - adjuvante
Intestino do mosquito	Pré-clínico	AnAPN1	Proteína recombinante - adjuvante

Abreviações: HBsAg, antígeno de superfície do vírus da hepatite B; CSP, proteína circumsporozoíta; TRAP, proteína anônima relacionada a trombospondina; PGLA, polímero de ácido láctico e glicólico; MSP, proteína de superfície de merozoíto; DBP, proteína ligante de Duffy; AMA-1, antígeno 1 de membrana apical; Pvs25, proteína de superfície 25; Pvs28, proteína de superfície 28.

1.8 Vacinas contra a Fase Eritrocítica

A fase eritrocítica é uma etapa crítica no ciclo biológico do parasita e as proteínas expressas pelos merozoítos são importantes candidatas para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária. Entre as proteínas mais estudadas de merozoítos estão: proteína de ligação ao antígeno Duffy (DBP), Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) e Proteína 1 da Superfície do Merozoíto (MSP1).

Para que os merozoítos invadam o eritrócito são necessárias interações específicas envolvendo proteínas dos parasitas e receptores presentes na superfície da célula hospedeira (119). Na infecção provocada pelo *P. vivax*, a invasão é mediada principalmente pela interação entre a proteína de ligação ao antígeno Duffy (“Duffy Binding Protein” - PvDBP) e seu receptor na superfície dos eritrócitos Duffy-positivos (120). A PvDBP é uma proteína de 140 kDa pertencente a uma família denominada DBL (“Duffy Binding Like”) de proteínas de ligação ao eritrócito (“Erythrocyte Binding Proteins”), localizada nos micronemas dos merozoítos. O bloqueio desta interação oferece um potencial mecanismo para bloquear a invasão (121). Diversos trabalhos vêm mostrando a imunogenicidade da DBP e, além disso, crianças re-expostas à infecção apresentaram forte resposta humoral contra essa proteína (122). A utilização da DBP para imunização de macacos gerou uma potente resposta humoral e indução de anticorpos inibitórios (123). Contudo, apesar de esses dados parecerem promissores, nenhuma vacina eficaz para humanos foi elaborada com ela.

A AMA-1 é uma proteína transmembrana altamente conservada, presente em todas as espécies de *Plasmodium*. A estrutura de AMA-1 é formada por um ectodomínio rico em cisteínas, uma região transmembrana e uma região C-terminal. As pontes dissulfeto formadas pelas cisteínas promovem o dobramento do ectodomínio em uma região N-terminal e três domínios (DI, DII e DIII) (124). Esta proteína está localizada no polo apical do merozoíto, nas organelas roptrias, e acredita-se ter um importante papel durante o processo de invasão. Em 2011, um grupo demonstrou em uma estratégia heteróloga usando prime e boost que a imunização com AMA-1

induziu resposta de anticorpos específicos bem como respostas de células T de memória (125).

Como observamos acima, proteínas expressas na superfície dos merozoítos, como por exemplo, a proteína 1 de superfície do merozoíta (MSP1), são consideradas antígenos prioritários para o desenvolvimento de uma vacina contra os estágios sanguíneos do *Plasmodium*.

1.9 Proteína de superfície de merozoíto (MSP1)

A proteína MSP1 é expressa abundantemente na superfície dos merozoítos e é alvo da resposta humoral adquirida durante a infecção (126). Faz parte de um complexo de proteínas que inclui a MSP-6 e a MSP-7, e é sintetizada durante a esquizogonia como um precursor de aproximadamente 195 kDa, ancorado à membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (127). No momento da invasão, a MSP1 é processada por serino proteases (128) em quatro fragmentos de 83, 30, 38 e 42 kDa, que permanecem ligados à superfície do parasita. O fragmento de 42 kDa (MSP1₄₂) sofre novo processamento resultando em dois fragmentos menores: um de 33 kDa (MSP1₃₃) e outro de 19 kDa (MSP1₁₉) (129, 130). Neste segundo processamento, a MSP1₃₃ é liberada juntamente com os outros fragmentos e a MSP1₁₉ permanece ligada pela âncora de GPI à superfície do merozoíto, sendo então carregada para dentro do eritrócito juntamente com o parasita (131). A figura 5 mostra um esquema representativo das sucessivas clivagens sofridas pela MSP1.

A MSP1 de *P. vivax* é uma proteína polimórfica que consiste de vários domínios dimórficos e conservados (ICBs, do inglês “interspecies conserved blocks”) (132).

A MSP1 é amplamente utilizada em protocolos vacinais. Um exemplo foi um trabalho utilizando a MSP1 de *P. vivax* produzida em *Escherichia coli* que mostrou-se altamente imunogênica em ensaios utilizando camundongos BALB/c e macacos *Aotus* (133). Primatas imunizados com a proteína MSP1 recombinante formulada em Montanide ISA-720 apresentaram forte resposta humoral específica e protetora, determinada em ensaios de desafio com *P. vivax*, com redução da anemia e eliminação dos parasitas (133).

O foco do nosso trabalho é o fragmento C-terminal de 42 kDa da proteína MSP1 (MSP1₄₂). Como explicado acima, a MSP1₄₂ contém os fragmentos de 33 kDa (MSP1₃₃) e de 19 kDa (MSP1₁₉) (134).

A presença de anticorpos contra a MSP1₁₉ tem sido associada com proteção contra malária clínica (135-137). Além disso, anticorpos humanos contra a MSP1₁₉ foram capazes de inibir o crescimento do *P. falciparum in vitro* (138). Transferências passivas de anticorpos monoclonais e policlonais anti-MSP1₁₉ ou anti-MSP1₄₂ têm sido eficientes na proteção contra malária em modelos experimentais (139-141).

Ao contrário da MSP1₁₉, há relativamente poucos estudos sobre a MSP1₃₃. Estes estudos concentram-se em epítomos de células T (142, 143), uma vez que foi demonstrado que MSP1₁₉ não possui epítomos T auxiliares adequados para estimular a resposta imunitária de uma população com diversidade genética (143). Assim, tem-se sugerido que epítomos das células T presentes na MSP1₃₃ auxiliam na produção de anticorpos anti-MSP1₁₉ (142, 143).

Acredita-se que os epítomos de células T presentes na porção de 33 kDa da proteína MSP1 contribuem para a indução de anticorpos anti-MSP1₁₉. Em outros modelos experimentais já está bem estabelecido que epítomos de células T podem influenciar a resposta humoral (144). De fato, estudos anteriores observaram diferenças na especificidade de anticorpos induzidos pela MSP1₁₉ versus MSP1₄₂ (ou seja, MSP1₃₃ + MSP1₁₉). Em uma população geneticamente diversa, a MSP1₄₂ é mais eficaz na indução de anticorpos anti-MSP1₁₉ que inibem o crescimento do parasita (145, 146). Além disso, a MSP1₄₂ induz anticorpos mais amplamente reativos com outras formas alélicas de MSP1₁₉ do que o próprio fragmento MSP1₁₉, o que sugere que MSP1₄₂ pode induzir anticorpos para epítomos adicionais.

Resumidamente a MSP1₄₂ contém um fragmento C-terminal de 19 kDa (MSP1₁₉) que permanece ligado à membrana do merozoíto durante a invasão através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), enquanto ocorre a liberação do fragmento de 33 kDa conhecido como MSP1₃₃. Anticorpos contra a MSP1₁₉ estão associados à redução do crescimento do *P. falciparum in vitro* e a uma diminuição da incidência de malária em populações vivendo em áreas endêmicas. Em estudos de infecção natural, a maioria dos epitopos de células B foi localizada nos domínios altamente conservados da MSP1₁₉. Já os epitopos que induzem a proliferação de subpopulações de células T específicas para MSP1₄₂ foram localizados nas regiões dimórficas da molécula MSP1₃₃. A MSP1₁₉ é um dos principais alvos dos anticorpos protetores e a MSP1₃₃ é alvo tanto de células T CD8⁺ quanto de células T CD4⁺ (147).

Estrutura da Proteína MSP1

Figura 5 - Esquema do gene que codifica a MSP1 e das proteínas resultantes do processo de clivagem. O gene é dividido em blocos não conservados como 1, 3, 5, 12, 17 (branco), em blocos semi-conservados como 7, 9, 11, 13 e 15 (hachurado) e em blocos conservados como 2, 4, 6, 8, 10, 14, e 16 (preto). A MSP1₄₂ corresponde aos blocos 15, 16 e 17. Fonte: Guevera Patino et al, 1997.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho foi direcionar os fragmentos de 42 kDa e de 19 kDa da proteína MSP1 de *Plasmodium vivax* para o subtipo de células dendríticas DEC205⁺CD8α⁺ e analisar as respostas imunes celular e humoral induzidas por esse direcionamento.

2.2 Objetivos específicos

1. Clonagem da sequência de DNA que codifica as proteínas MSP1₄₂ e MSP1₁₉ de *P. vivax* (cepa Belém) em fase com a sequência que codifica a cadeia pesada do mAb αDEC205;
2. Produção dos mAbs híbridos por transfecção transiente de células HEK293T e purificação dos mesmos a partir dos sobrenadantes das culturas;
3. Análise da ligação destes mAbs ao receptor DEC205 expresso DCs murinas;
4. Produção das proteínas recombinantes MSP1₁₉ e MSP1₃₃ de *P. vivax*;
5. Imunização de camundongos com os mAbs híbridos produzidos na presença do adjuvante poly (I:C);
6. Análise das respostas imunes celular e humoral induzidas após aplicação desses protocolos de imunização.

3 MATERIAL e MÉTODOS

3.1 Animais utilizados

Camundongos C57BL/6 ou B10.A fêmeas com idades entre 5-12 semanas foram obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Parasitologia do ICB/USP. Os animais foram mantidos em condições livres de patógenos durante o curso dos estudos. Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pelo comitê de ética de experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédicas da USP sob os protocolos número 82/2008 (folha 59, livro 2) e 124/2014 (folha 25, livro 03).

3.2 Preparação de Bactérias Competentes.

Uma colônia de bactérias *Escherichia coli* DH5 α foi inoculada em 3 mL de meio de cultura LB (Luria-Bertani, Invitrogen), seguindo incubação por 16 horas a 37 °C, sob agitação constante (200 rpm). O inóculo foi então diluído em 200 mL de meio LB e incubado a 37 °C sob agitação constante até que a densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) estivesse entre 0,6-0,8. O recipiente contendo as bactérias foi então incubado em gelo por 30 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 1.400 X g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, as bactérias foram ressuspensas em 75 mL de uma solução de CaCl₂ 0,1 M e incubadas em gelo por 12 horas. Após nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado bacteriano foi ressuspendido em 2 mL de uma solução de CaCl₂ 0,1 M/glicerol 15%. As bactérias foram então dispensadas em alíquotas de 50 μ L, congeladas rapidamente em gelo seco contendo álcool e posteriormente estocadas a -80 °C.

3.3 Transformação de Bactérias Competentes

Para as transformações, 50-100 ng do DNA plasmidial foram adicionados a tubos de microcentrífuga contendo alíquotas de 10 μ L de bactérias competentes e 90 μ L da solução de CaCl₂ 0,1 M. Após incubação em gelo por 30 minutos, os tubos foram colocados a 42 °C por exatamente 40 segundos e

recolocados em gelo por 5 minutos. Em seguida, acrescentaram-se 100 µL de meio LB e os tubos foram incubados a 37 °C durante 1 hora, sob agitação (200 rpm). O volume total da mistura foi semeado em placas de LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina ou 50 µg/mL de kanamicina (dependendo do plasmídeo utilizado) que foram incubadas a 37 °C durante a noite para seleção dos clones resistentes ao antibiótico.

3.4 Amplificação MSP1₄₂ e MSP1₁₉

O plasmídeo contendo o gene que codifica as porções de 42kDa e 19kDa da proteína MSP1 foram sintetizados pela empresa **GenScript**

Para a clonagem utilizamos preferencialmente as enzimas de restrição *XhoI/NotI* (New England Biolabs) exatamente como descrito (50).

A sequência correspondente às proteínas MSP1₄₂ ou MSP1₁₉ foram amplificadas por PCR utilizando-se os seguintes oligonucleotídeos:

MSP1₄₂

Senso : 5'- CTCGAGGAGTTCGGCAGG- 3'

Anti-senso: 5'- CGCGGCCGCTCAAGAGCAAAACACGCCCTCG- 3 '

MSP1₁₉

Senso : 5'-GGCTCGAGGAGTTCGGTAGGTTTCATGAGCTCCGAGCA CACATG - 3 '

Anti-senso: 5'- CCGCGGCCGCTCAGCTACAGAAACTCCCTC-3 '

Os oligonucleotídeos foram obtidos da Invitrogen na escala de síntese de 25 nM e diluídos em estoques de 50 µM em água MilliQ. As reações de PCR foram feitas utilizando-se a enzima "Pfu DNA Polymerase" (Stratagene), seguindo-se as instruções do fabricante. Brevemente, para cada 40 ng de DNA molde adicionou-se tampão phusion 1 X, 0,2 mM de dNTP, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1,25 U da enzima. As reações de amplificação foram feitas da seguinte maneira 98 °C por 3 minutos 1 vez, 98 °C por 10 segundos, 35 vezes, 60 °C por 30 segundos, 35 vezes, 72 °C por 45 segundos, 35 vezes e 72 °C por 10 minutos, 1 vez. Após o término dos ciclos, os tubos foram mantidos a 16 °C. As amostras foram misturadas com tampão de amostra e analisadas imediatamente em géis de agarose 1%.

3.5 Clonagem dos genes MSP1₄₂ e MSP1₁₉ em fusão com o plasmídeo codificando a cadeia pesada do anticorpo anti-DEC205.

Os produtos de PCR foram clonados no vetor pCR2.1 utilizando-se o “TA cloning kit” (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos da ligação foram então transformados em bactérias DH5α e plaqueados em placas de LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina (LB/AMP). Além de ampicilina, cada placa foi também tratada com 40 µL de X-gal (40mg/mL, Sigma) e 40 µL de IPTG (100mM, Amresco). Este tratamento permitiu que as colônias fossem separadas em brancas (contendo inserto) e azuis (sem inserto). Cinco colônias brancas foram então crescidas em meio LB/AMP por 16 horas a 37 °C e sob agitação constante (~200 rpm). Os plasmídeos foram então extraídos por maxi-prep. Cerca de 1-3 µg dos plasmídeos pCR2.1 contendo os genes da MSP1₄₂ e MSP1₁₉ foram digeridos com 5U das combinações das enzimas de restrição *Xho* I/*Not* I (New England Biolabs) na presença de tampão adequado (1X), a 37 °C por 2-16 horas. Os fragmentos de DNA equivalentes aos tamanhos dos genes de interesse foram separados por eletroforese e purificados dos géis utilizando-se o “Qiaquick gel extraction kit” (QIAGEN). Paralelamente, 2 µg do plasmídeo contendo a cadeia pesada do anticorpo αDEC foi digerido com 5U da combinação das enzimas de restrição *Xho* I e *Not* I na presença de tampão adequado (1X), a 37 °C por 2-16 horas. A separação e purificação dos fragmentos de DNA foram feitas conforme descrito acima. Após a purificação, os DNAs foram dosados e as ligações foram realizadas utilizando-se 1U da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs) e 1X tampão de ligação contendo ATP em 10 µl de reação. Considerou-se então uma proporção molar de 3:1 entre inserto: vetor e cerca de 50ng de vetor foram utilizados em cada ligação, seguindo a seguinte fórmula:

$$[\text{tamanho do inserto (pb)} \times \text{quantidade do vetor}] / \text{tamanho do vetor (pb)} = \text{quantidade do inserto (ng)}.$$

As ligações aconteceram a 14 °C pelo período de 16-18 horas e foram transformadas em bactérias DH5α. Cerca de quatro colônias obtidas de cada ligação foram crescidas, tiveram seus plasmídeos extraídos e digeridos com as

enzimas *Xho* I/*Not* I, conforme descrito acima. Os plasmídeos contendo insertos de tamanho correto foram sequenciados. Os plasmídeos contendo as sequências corretas foram designados pDEC-MSP1₄₂ e pDEC-MSP1₁₉.

3.6 Amplificação e clonagem do gene da proteína MSP1₃₃ de *Plasmodium vivax* no vetor de expressão pET28a.

A sequência de DNA correspondente a proteína MSP1₃₃ foi amplificada por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos senso: 5'-GGGATCCGACCAGGTGACCACCGG -3' e anti-senso: 5'-GGCGGCCCGCAGTGGTCAGCAGCTGGGTCTG-3' e utilizando a enzima de alta fidelidade Pfu. Após a amplificação, o fragmento foi clonado no plasmídeo Zero Blunt (Thermo Fisher Scientific) e dois clones diferentes foram sequenciados tendo suas sequências confirmadas (dados não mostrados). Um dos clones foi então digerido com as enzimas *Bam* I e *Not* I e o inserto clonado no vetor de expressão pET28a usando o processo de ligação explicado acima.

3.7 Obtenção de DNA plasmidial em larga escala.

Para a produção de plasmídeos contendo as sequências das cadeias leve e pesada dos mAb híbridos recombinantes, colônias bacterianas transformadas foram inoculadas em 200 mL de meio LB contendo 100 µg/mL (LB/AMP) e incubadas a 37 °C durante 16 horas, sob agitação constante. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o “QIAGEN Plasmid Maxi Kit” (QIAGEN) seguindo a orientação do fabricante. Brevemente, 200 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para tubos de 250 mL e centrifugados a 8.000 X g por 20 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e aos precipitados bacterianos acrescentou-se 10 mL do tampão P1 (contendo RNase A), seguindo homogeneização em “vortex”. Foram adicionados então 10 mL do tampão P2 e os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 5 minutos (com 6 a 8 inversões a cada 2 minutos). Após a adição de 10 mL do tampão P3 previamente gelado, os tubos foram invertidos por 8 vezes e incubados em gelo por 20 minutos. Seguiu-se centrifugação a 20.000 X g por 30 minutos a 4 °C e os

sobrenadantes foram transferidos para colunas QIAGEN Tip-500 previamente equilibradas com 10 mL do tampão QBT. Os sobrenadantes foram despejados na coluna através de uma gaze colocada na abertura. Após a passagem do sobrenadante por gravidade, as colunas foram lavadas duas vezes com 30 mL de tampão QC. A eluição foi feita diretamente em um tubo falcon de 50 mL utilizando-se 15 mL do tampão QF. O DNA plasmidial foi precipitado pela adição de 10,5 mL de isopropanol a temperatura ambiente. Os tubos foram então centrifugados a 8.000 X g por 45 minutos e lavados com 5 mL de etanol 70%. Os precipitados contendo DNA foram secos por 20-30 minutos a temperatura ambiente e ressuspensos em 400 µL de água MilliQ. A concentração foi determinada utilizando-se espectrofotômetro.

3.8 Produção da Proteína MSP1₁₉ Recombinante

O plasmídeo pET14b-MSP1₁₉ *P.vivax* (gentilmente cedido pela Dra. Irene da Silva Soares, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP) foi utilizado para transformar bactérias BL21DE3. Uma colônia foi cultivada a 37 °C sob agitação constante em frascos contendo LB ampicilina (100 µg/mL) ou kanamicina (50 µg/mL). Quando a preparação alcançou DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8, adicionou-se 0,01 mM de IPTG. A cultura foi então incubada a 37 °C por 4 horas sob agitação constante. As bactérias foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em tampão de sonicação (NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7.0, NaCl 120 mM, PMSF 1 mM). A lise ocorreu no gelo com o auxílio de um sonicador (Branson Sonifier Ultrasonic Processor 450, USES). Três ciclos de sonicação foram aplicados consistindo de pulsos de 5 minutos com 5 minutos de intervalo na potência 45. O lisado bacteriano foi centrifugado a 18,000 X g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi incubado sob agitação com uma resina de Ni²⁺-NTA-Agarose (QIAGEN).

Após uma hora, a resina foi aplicada a uma coluna e lavada extensivamente com tampão de sonicação, seguido de tampão de lavagem (57 mM NaH₂PO₄, 128 mM NaCl e 10% glicerol, pH 6.0). As proteínas ligadas foram eluídas com tampão de lavagem contendo imidazol 0,5 M (Sigma) e dialisadas contra 20 mM Tris-HCl, pH 8.0. Após centrifugação a 18,000 X g por 30 minutos a 4 °C e filtração em membrana de 0.22 µm, foi realizada uma cromatografia de

troca iônica utilizando-se uma coluna Mono Q (Pharmacia) equilibrada com 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, acoplada a um sistema de FPLC (Pharmacia). A proteína foi eluída com um gradiente linear de 0-1 M de NaCl em tampão Tris-HCl. As frações eluídas foram analisadas em géis de SDS-PAGE e coradas com Coomassie Blue. As frações contendo a proteína foram dialisadas contra PBS, dosadas novamente e armazenadas a -20 °C.

3.9 Produção da Proteína MSP1₃₃ Recombinante

O plasmídeo pET28a-MSP1₃₃ foi utilizado para transformar bactérias BL21RIL. Uma colônia foi cultivada a 37 °C sob agitação constante em frascos contendo 250 mL de LB kanamicina (50 µg/mL). Quando a preparação alcançou DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8, adicionou-se 0,01 mM de IPTG. A cultura foi então incubada a 37 °C por 4 horas sob agitação constante. As bactérias foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em tampão de sonicação (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, glicerol 10%, PMSF 1 mM, pH 8.0). A lise ocorreu no gelo com o auxílio de um sonicador (Branson Sonifier Ultrasonic Processor 450, USES). Três ciclos de sonicação foram aplicados consistindo de pulsos de 5 minutos com 5 minutos de intervalo na potência 35. O lisado bacteriano foi centrifugado a 18,000 X g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi filtrado em um filtro de 0,45 µm e incubado sob agitação com uma resina de Ni²⁺-NTA-Agarose (QIAGEN).

Após uma hora, a resina foi aplicada a uma coluna e lavada extensivamente com tampão de sonicação, seguido de tampão de lavagem (Tris 50 mM, NaCl 1 M, Imidazol 30 mM glicerol 10% pH 8.0). As proteínas ligadas foram eluídas com tampão de lavagem contendo imidazol 0,5 M (Sigma) e dialisadas contra PBS, dosadas e armazenadas a -20 °C.

3.10 Produção de anticorpos por transfecção de células HEK293T.

Foram utilizadas placas de 150 mM (Costar ou TPP) semeadas com $7,5 \times 10^6$ células HEK293T (gentilmente cedidas pelo Dr. Armando Moraes Ventura, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo) em meio DMEM, acrescido de 2 mM L-glutamina, 10 U/mL antibiótico-antimicótico, 1 mM piruvato de sódio e 5% de soro fetal bovino com baixa concentração de IgG (Invitrogen). Após dois dias em cultura (quando a confluência estava em torno de 70%), o meio das placas foi substituído por meio DMEM contendo os aditivos acima, sendo o soro fetal bovino substituído por 1% de nutridoma (Roche). Em seguida, as células foram transfectadas utilizando-se 10 µg de cada um dos plasmídeos que codificam para as cadeias leve e pesada dos mAbs α DEC205 em fusão com as proteínas MSP1₁₉ ou MSP1₄₂ de *P. vivax* na presença de polietilenimina (0,45 mg/mL, Sigma). Brevemente, os 10 µg de cada plasmídeo foram dissolvidos em 1 mL de uma solução de 150 mM de NaCl. Após curta agitação, 100 µL de uma solução de polietilenimina 0,45 mg/mL foram adicionados e a mistura foi submetida a agitação por 10 segundos, seguida de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. O volume final de 1,1 mL foi então adicionado a cada placa utilizando-se uma pipeta de 1mL. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% CO₂ por 7 dias.

3.11 Precipitação e purificação dos mAbs híbridos.

Passados os sete dias de incubação, os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados e centrifugados 7.500 X g por 20 minutos para precipitação de debris celulares. As proteínas presentes foram então precipitadas adicionando-se (NH₄)₂SO₄ numa relação volume dos sobrenadantes: peso de 60% (ou seja, 1 L de sobrenadante para 600 g de sulfato de amônio). Os sobrenadantes foram então incubados sob lenta agitação a 4 °C por 16-20 horas. Seguiram-se então mais duas centrifugações a 10.000 X g por 45 minutos para coletar as proteínas precipitadas. Os precipitados foram ressuspensos em PBS (50 mL para cada 1 L de cultura inicial) e centrifugados novamente nas mesmas condições anteriores para remoção de qualquer partícula não dissolvida. O sobrenadante desta segunda centrifugação foi então

colocado em membranas de diálise (Pierce) e dialisado contra 2 L de PBS gelado (para cada 50 mL de sobrenadante) por 16-20 horas. O volume removido da membrana de diálise foi incubado com esferas de proteína G (Amersham) na proporção de 1 mL de esferas para 50 mL de sobrenadante, sob rotação, a 4 °C por 16-20 horas. A suspensão foi então centrifugada a 800 X g por 5 minutos e as esferas contendo os mAbs foram adicionadas a colunas de cromatografia (BioRad). Após duas lavagens contendo 5 ml de PBS gelado, a eluição foi realizada em alíquotas de 500 µL utilizando-se tampão glicina 0,1 M, pH 3,0. Para evitar a degradação dos mAbs devido ao pH ácido, acrescentou-se a cada alíquota 50 µL de tampão Tris-HCl 1 M, pH 8,0. A concentração de mAbs em cada alíquota foi então estimada pelo método de Bradford (Amresco) e as alíquotas mais concentradas foram agrupadas e novamente dialisadas contra PBS gelado.

3.12 Quantificação e avaliação da integridade dos mAbs híbridos.

A integridade dos mAbs foi analisada em gel de SDS-PAGE 12% em condições redutoras (aquecimento a 95 °C por 5 minutos na presença de DTT) seguido de coloração por Coomassie Blue. A concentração dos mAbs foi obtida utilizando-se uma curva padrão de IgG (BD biosciences) e o reagente de Bradford (Amresco). Os mAbs híbridos foram então alíquotados e estocados a -20 °C até uso.

Também avaliamos a integridade das proteínas MSP1₄₂ e MSP1₁₉ fusionadas aos mAbs através de sua detecção em ensaio de Western Blot. Brevemente, 1 µg de cada um dos mAbs (αDEC-MSP1₄₂ e DEC-MSP1₁₉) ou de um mAb controle negativo (αDEC) foram aplicados em um gel de SDS-PAGE 12% e submetidos a uma corrente elétrica fixa em uma cuba de eletroforese. O gel foi então retirado e montado sobre uma membrana de nitrocelulose em aparato específico para transferência. Aplicou-se uma corrente fixa de 100V por 2h para que as proteínas do gel migrassem para a membrana de nitrocelulose que foi então recuperada, avaliando-se a eficiência transferência por coloração com corante Ponceau S. A membrana foi então bloqueada por 12h em PBS + 0,05% Tween20 + 5% leite desnatado, e marcada utilizando-se um soro primário

obtido de um paciente infectado (gentilmente cedido pelo Dr. Claudio Romero Farias Marinho, Departamento de Parasitologia, USP) na concentração de 1:2.000. Após lavagem com PBS+Tween20 0,05% a membrana foi incubada com Proteína A ligada a peroxidase (HRP) (Invitrogen) na concentração de 1:8.000. A revelação foi feita por quimioluminescência (Amersham Hyperfilm ECL - GE Healthcare) em filme fotográfico (Kodak).

3.13 Ensaio para detecção de LPS.

Para dosagem de LPS nas amostras contendo os mAbs híbridos utilizou-se o kit QCL-1000 (Lonza). Brevemente, 5 µg de cada mAb foram diluídos em um volume final de 50 µL de água livre de pirógeno. Em seguida, cada amostra foi incubada a 37 °C. Após estabilização da temperatura, foram adicionados 50 µL de lisado de amebócitos de limulus. Após incubação a 37 °C por 10 minutos foram adicionados 100 µL de uma solução cromógena, seguindo incubação por mais 6 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de ácido acético a 25%. As amostras foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nM. Uma curva contendo concentrações conhecidas de LPS (1, 0,5, 0,25 e 0,125 EU/mL) foi utilizada para auxiliar na quantificação de LPS nas amostras testadas.

3.14 Ensaio de ligação dos anticorpos híbridos a células CHO expressando os receptores DEC205 de camundongo e humano.

Os mAbs purificados foram diluídos nas seguintes concentrações: 10, 1, 0,1 µg/mL e incubados com 100.000 células CHO expressando constitutivamente os receptores DEC205 de camundongo ou DEC205 humano (gentilmente cedidas pelo Dr. Michel Nussenzweig, The Rockefeller University). Após 30 minutos de incubação, as células foram lavadas com tampão de FACS (PBS+2% soro fetal bovino) e incubadas com um anticorpo secundário anti-camundongo marcado com PE (Jackson ImmunoResearch) na diluição de 1:2.000. As amostras foram então lidas em citômetro de fluxo (FACS Calibur ou FACS Canto) e analisadas utilizando-se o software FlowJo 9.3 (TreeStar).

3.15 Ensaio de ligação dos mAbs híbridos em DCs provenientes do baço de camundongos.

Os mAbs híbridos foram também incubados nas seguintes concentrações 10, 1 e 0,1 µg/mL com esplenócitos (ver item 3.20.1 para preparação da suspensão celular). Após 30 minutos de incubação, as células foram lavadas com tampão de FACS (PBS+2% soro fetal bovino) e incubadas com anticorpos anti-CD19 (clone 1D3 BD Pharmingen), anti-MHCII (clone 2G9 eBioscience), anti-CD49b (clone HMα2 BD Pharmingen), anti-CD11c (clone N418 eBioscience), e anti-CD8 (clone 53-6.7 BD Pharmingen). Após 30 minutos de incubação, as células foram novamente lavadas com tampão de FACS (PBS+2% soro fetal bovino) e as amostras foram então lidas em citômetro de fluxo (FACS Calibur ou FACS Canto) e analisadas utilizando-se o software FlowJo (TreeStar).

3.16 Imunização de camundongos com os diferentes mAbs híbridos na presença de estímulo de ativação para as DCs e análise da resposta imune celular induzida.

Grupos de 5 camundongos fêmeas C57BL/6 ou B10.A foram imunizados (intraperitonealmente) com 5 µg/animal de cada mAb híbrido na presença de 50 µg/animal do adjuvante poly (I:C) (Invivogen). A mesma imunização foi repetida 30 dias após a administração da primeira dose. Sangrias foram realizadas nos animais 25 dias após a primeira imunização e 14 dias após a administração da segunda dose. Para os experimentos envolvendo cultura celular, os animais foram sacrificados 20 dias após a dose de reforço.

3.17 Ensaio de ELISA.

O ensaio de ELISA para a detecção dos anticorpos presentes no soro dos animais imunizados foi realizado da seguinte maneira:

a) Preparo dos Soros:

Como mencionamos no item anterior, foi coletado sangue dos camundongos 5 dias antes ou 14 dias após a administração da segunda dose. Após duas horas de incubação a temperatura ambiente, os tubos foram

centrifugados a 10.000 X g por 5 minutos à temperatura ambiente. Os soros foram então separados e armazenados em tubos eppendorf de 1,5 mL a -20 °C.

b) Sensibilização das Placas:

Foram utilizadas placas de ELISA ("High binding", Costar). A cada poço foram adicionados 100 ng da proteína MSP1₁₉ ou da proteína MSP1₃₃ de *P. vivax* diluídas em PBS 1X. As placas foram então deixadas à temperatura ambiente por 16-18 horas e posteriormente lavadas três vezes com a solução de PBS-Tween 20 0,02% (PBS-T0,02).

c) Diluição dos Soros e Reação Imunoenzimática:

Cada poço foi então bloqueado com 150 µL de uma solução de bloqueio (PBS-T0,02+ leite desnatado 5%+ BSA 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram incubadas por 2 horas com 100 µL dos soros (diluídos em PBS-T0,2 + leite desnatado 5% + BSA 0,25%) em diluições seriadas (fator de diluição 3). O conteúdo dos poços foi desprezado e as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T0,02. O anticorpo secundário contendo anti-IgG de camundongo ligada a peroxidase (HRP, Jackson ImmunoResearch) diluído em PBS-T0,02+ leite 5%+ BSA 0,25% na proporção de 1:10.000 foi adicionado e incubado por mais 2 horas à temperatura ambiente (50 µL/poço). Após mais três lavagens com PBS-T0,02, cada poço recebeu 100 µL do substrato preparado da seguinte maneira: 10 mg de OPD (Sigma) dissolvidos em 10 mL de uma solução contendo fosfato de sódio 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M (pH 4,7) acrescido de 10 µL de H₂O₂ 30%. Depois de 15 minutos, a reação foi interrompida com 50 µL de uma solução de H₂SO₄ 4 N. As placas foram lidas em leitor BioTek ELx800 (Biotek) em comprimento de onda de 490 nM. Os títulos foram calculados como o logaritmo (log₁₀) considerando-se a diluição em que a DO₄₉₀ estivesse maior que 0,1.

3.18 Elisa de afinidade

A afinidade dos anticorpos produzidos foi determinada por ELISA. O ensaio de ELISA foi realizado de maneira similar ao descrito anteriormente, adicionando-se uma etapa extra. Após a incubação com os pools de soros correspondentes, as placas foram lavadas com 7 M de ureia e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse passo, as placas foram lavadas

novamente com PBS-T0,02 e incubadas com o anticorpo secundário. O índice de avidéz foi calculado como a razão entre a DO₄₉₀ obtida antes e após tratamento com ureia multiplicada por 100.

3.19 Ensaio de ELISA para tipagem das subclasses de imunoglobulinas G.

Para a tipagem, a única modificação feita foi a utilização de anticorpos anti-IgG1, IgG2b, IgG2c ou IgG3 conjugados com peroxidase (Southern Biotech) diluídos 1:2.000, como anticorpos secundários.

3.20 Avaliação da resposta imune celular

3.20.1 *Suspensão celular*

Camundongos C57BL/6 e B10.A imunizados foram sacrificados 20 dias após a última dose e tiveram os baços retirados. As células foram obtidas após maceração do órgão, lavadas com 10 mL de meio RPMI (Gibco) e centrifugadas a 600 x g por 6 minutos à 4 °C. Em seguida, as células foram tratadas com tampão hemolítico ACK (NH₄Cl 0,15 M; KHCO₃ 1 mM; Na₂EDTA 0.1 mM) e lavadas duas vezes com meio RPMI (10 mL por lavagem). Ao final das lavagens, as células foram ressuspensas em 1mL de meio RPMI completo [meio RPMI suplementado com L-glutamina 2 mM (Gibco), solução de aminoácidos não essenciais (1% vol/vol) (Gibco), piruvato de sódio 1 mM (Gibco), 2-Mercaptoetanol 5x10⁻⁵ M (Sigma), 10% vol/vol de soro fetal bovino (Gibco) e os antibióticos Gentamicina (40 µg/mL) e Peflacin (20 µg/mL)].

3.20.2 *Ensaio de ELISPOT.*

Para o ensaio de ELISPOT, utilizou-se o kit “Ready-SET-Go!” (eBioscience) para detecção de IFN γ e placas de nitrocelulose com 96 poços (MAIPS 4510, Millipore). As placas foram cobertas com 100 µL/ poço de tampão estéril contendo o anticorpo monoclonal anti-IFN γ de captura diluído 250 x. Após incubação em período noturno a 4 °C, a solução contendo o anticorpo monoclonal foi removida em ambiente estéril e as placas foram então lavadas 3

vezes com tampão estéril. As placas foram bloqueadas pela incubação dos poços com 200 µL de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino por, pelo menos, 2 horas a 37 °C.

As células respondedoras foram obtidas dos baços de 2-3 camundongos imunizados com os diferentes mAbs híbridos ou controles. As hemácias foram lisadas na presença do tampão ACK, lavadas 3 vezes com meio RPMI e ressuspensas em meio RPMI completo contendo 10% de soro fetal bovino (R10) e 30 U de IL-2 humana recombinante e diluídas para uma concentração de 1 a $1,5 \times 10^6$ células/mL.

Cada suspensão contendo 100 µL de células respondedoras foi pipetada individualmente em cada poço, seguida de mais 100 µL do antígeno diluído na concentração desejada. As placas foram incubadas em condições estáticas por 18-20 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Depois da incubação, as células foram desprezadas. Para remover quaisquer células residuais, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-Tween20 0,05% (PBS-T0,05). Cada poço recebeu então 100 µL do anticorpo monoclonal anti-camundongo biotinilado diluído 250 x em tampão “assay buffer 1x” contido no kit. As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Os anticorpos não ligados foram removidos pela lavagem das placas por 3 vezes com PBS-T0,05. Adicionou-se então estreptavidina-peroxidase diluída 250 x em “assay buffer 1 x” em volume final de 100 µL/ poço. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e então lavadas 3 vezes com PBS-T0,05 e mais 2 vezes com PBS. As placas foram reveladas adicionando-se 100 µL/ poço do substrato cromogênico contido no kit AEC (Becton Dickinson) seguindo por mais 45 minutos de incubação a 37 °C. A reação foi interrompida descartando-se a solução substrato e lavando-se as placas com água corrente. As placas foram então secas à temperatura ambiente e os “spots” foram contados em contador automatizado (AID GmbH).

3.20.3 Marcação intracelular de células produtoras de IFN γ , IL-2 e TNF α .

Após o isolamento, as células respondedoras foram plaqueadas em uma concentração de 1×10^6 células/poço e incubadas com os antígenos específicos, em meio R10 contendo 2 µg/mL do anticorpo agonista α CD28. Alguns poços

foram incubados com 1 µg/mL de αCD3 como controle positivo. Após uma hora de incubação, cada poço recebeu 0,5 µL de Golgi Plug Brefeldina A, (BD Pharmingen) e as placas foram incubadas por mais 12-16 horas. Após este período, as placas foram centrifugadas por 5 minutos a 1.000 x g e os sobrenadantes foram descartados por inversão. Acrescentou-se 150 µL de tampão de FACS e as triplicatas foram combinadas em um único poço. Seguiu-se incubação com os seguintes anticorpos para marcação extracelular: anti-CD4-PerCP-Cy5.5 por 45 minutos em tampão FACS no gelo. Após esse período, as células foram lavadas 3 vezes com tampão FACS e ressuspensas em 200 µL de PharmingenStain buffer (BD Pharmingen) seguida por mais uma centrifugação, posteriormente adicionando-se 100 µL/poço de Cytfix/Cytoperm (BD Pharmingen). As células foram ressuspensas e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram centrifugadas e lavadas por 3 vezes com tampão Permwash (BD Pharmingen). As células foram então incubadas com os seguintes anticorpos para marcação intracelular: anti-CD3-APC-Cy7, anti-IL-2-PE, anti-TNFα-PE-Cy7 e anti-IFNγ-APC por 45 minutos no gelo. Após mais 3 lavagens com tampão Permwash, as células foram ressuspensas em tampão de FACS e lidas no citômetro FACS Canto (BD). Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos da BD Pharmingen.

3.20.4 A análise da resposta imune celular através de proliferação medida pela diluição do corante CFSE.

Os baços dos camundongos foram coletados e processados como descrito no item 3.20.1. Após a lise das hemácias e contagem das células, retirou-se o volume correspondente 50×10^6 células e as mesmas foram colocadas em um volume final de 1 mL. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em PBS previamente aquecido a 37 °C contendo o corante CFDA na concentração de final de 1,25 µM (Vybrant CFDA SE – Cell Tracer Kit, Molecular Probes). As células foram então incubadas a 37 °C por 10 minutos em banho-maria e agitadas a cada 2 minutos para se obter uma marcação homogênea. Após esse período, as células foram centrifugadas a 1.000 X g por 5 minutos e lavadas por 3 vezes com o dobro do volume usado na marcação. Finalmente as células foram ressuspensas em 1 mL de R10 e contadas

novamente. Cada poço recebeu 3×10^5 células e os re-estímulos com 5 µg/ml das proteínas MSP1₁₉ ou MSP1₃₃ ou do peptídeo DYDVVYLKPLAGMYK ou seu controle. As placas foram então incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ por 5 dias. Após este período, as placas foram centrifugadas, lavadas em tampão FACS e as triplicatas foram combinadas em um único poço. A marcação fenotípica foi feita com os seguintes anticorpos: anti-CD4-PerCP-Cy5.5, anti-CD8-PE-Cy7 e anti-CD3-APC-Cy7 por 45 minutos em tampão FACS e no gelo. As placas foram lavadas por 3 vezes com tampão FACS, as amostras lidas no citômetro FACS Canto e analisadas utilizando-se o software FlowJo 9.3 (TreeStar).

3.20.5 CYTOMETRIC BEADS ARRAY (CBA)

Um milhão de células de baço foram incubadas durante 120 horas a 37 °C na presença de 5 µg/mL das proteínas recombinantes ou dos peptídeos. Os sobrenadantes colhidos a partir de culturas foram armazenados à -20 °C até à análise das citocinas. IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, TNF α e IFN- γ foram detectados simultaneamente usando o kit de citometria (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. O alcance de detecção foi de 20-5000 pg/mL para cada uma das citocinas. As amostras foram lidas no citômetro FACS Canto e analisadas utilizando-se o software FCAP ArrayTM (ambos BD Biosciences).

3.20.6 Análise estatística.

Os dados foram analisados utilizando-se o teste ANOVA de uma via seguido do pós teste de Tukey. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Amplificação e clonagem do gene da proteína MSP1₄₂ de Plasmodium vivax em fusão com o gene que codifica a cadeia pesada do anticorpo.

Os plasmídeos contendo as cadeias pesada e leve do anticorpo α DEC foram gentilmente cedidos pelo Dr. Michel Nussenzweig (The Rockefeller University, EUA). As sequências de nucleotídeos correspondentes às porções variáveis das cadeias pesada e leve do mAb foram clonadas em dois plasmídeos a partir do hibridoma original NLDC-145 (50) gerado em rato. As porções variáveis do mAb foram clonadas em fusão com sequências constantes de IgG1 de camundongo, sendo a cadeia pesada mutada no sítio reconhecido pelo receptor de Fc para evitar a ligação do mesmo aos receptores Fc presentes em outras células do sistema imune. Além disso, a substituição da porção constante do mAb de rato pela porção constante de camundongo visou minimizar a geração de resposta imune contra o próprio anticorpo. No plasmídeo contendo a cadeia pesada, acrescentou-se ainda uma sequência “linker” (ASDMAKKETVWRLEEFGRF) que tem a função de dar alguma flexibilidade ao mAb. A sequência de DNA correspondente a proteína MSP1₄₂ foi amplificada por PCR (figura 6A) e posteriormente clonada no plasmídeo pCR2.1 (figura 6B). Dois clones foram então selecionados e enviados para sequenciamento e não detectamos nenhuma mutação (dados não mostrados). Os mesmos foram também digeridos com as enzimas *Xho* I e *Not* I e os insertos clonados em fase no vetor pDEC (figura 6C).

Figura 6 - Clonagem da sequência da proteína MSP1₄₂ de *P. vivax* em fusão com a sequência da cadeia pesada do mAb α DEC205. (A) Amplificação do fragmento de 1.200 pb correspondente a MSP1₄₂. **(B)** O fragmento gerado em A foi clonado no vetor pCR2.1. **(C)** O fragmento gerado em A após ser subclonado no vetor pCR2.1 foi clonado no vetor pDEC. A digestão do plasmídeo foi realizada utilizando as enzimas de restrição *Xho* I e *Not* I. Os fragmentos foram separados em géis de agarose 1%. Os tamanhos de algumas bandas (PM) estão indicados à esquerda em pares de bases (bp).

4.2 Amplificação e clonagem do gene da proteína MSP1₁₉ de *Plasmodium vivax* em fusão com o gene que codifica a cadeia pesada do anticorpo α DEC205.

A sequência de DNA correspondente a proteína MSP1₁₉ foi amplificada por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos descritos em material e métodos. A sequência de DNA correspondente a proteína MSP1₁₉ foi amplificada por PCR (figura 7A) e posteriormente clonada no plasmídeo pCR2.1 (figura 7B). Dois clones foram então selecionados e enviados para sequenciamento e não detectamos nenhuma mutação (dados não mostrados). Os mesmos foram

também digeridos com as enzimas *Xho* I e *Not* I e os insertos clonados em fase no vetor pDEC (figura 7C).

Figura 7 - Clonagem da sequência da proteína MSP1₁₉ de *P. vivax* em fusão com a sequência da cadeia pesada do mAb α DEC205. (A) Amplificação do fragmento de ~300 pb correspondente a MSP1₁₉. **(B)** O fragmento gerado em A foi clonado no vetor pCR2.1 digerido com as enzimas *Xho* I e *Not* I. **(C)** O fragmento gerado em A após ser subclonado no vetor pCR2.1 foi clonado no vetor pDEC. A digestão do plasmídeo foi realizada utilizando as enzimas de restrição *Xho* I e *Not* I. Os fragmentos foram separados em géis de agarose 1%. Os tamanhos de algumas bandas (PM) estão indicados à esquerda em pares de bases (bp).

4.3 Amplificação e clonagem do gene da proteína MSP1₃₃ de *Plasmodium vivax* no vetor de expressão pET28a.

A sequência de DNA correspondente a proteína MSP1₃₃ foi amplificada por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos descritos em material e métodos e a enzima Pfu (figura 8A). Após a amplificação, o fragmento foi clonado no plasmídeo pCR2.1 (figura 8B) e dois clones diferentes foram sequenciados tendo suas sequências confirmadas (dados não mostrados). Um dos clones foi então

digerido com as enzimas *Bam* I e *Not* I (figura 8C) e o inserto clonado no vetor de expressão pET28a.

Figura 8 - Clonagem da sequência da proteína MSP1₃₃ de *P.vivax* no vetor de expressão pET28a. (A) Amplificação do fragmento de 900 pb referente o fragmento de 33kDa da proteína MSP1. **(B)** Digestão do plasmídeo pCR2.1-MSP1₃₃ foi realizada utilizando as enzimas de restrição *Bam* I e *Not* I. Após isso o fragmento foi purificado e clonado no vetor pET28a. **(C)** A digestão do plasmídeo pET28a-MSP1₃₃ foi realizada utilizando as enzimas de restrição *Xho* I e *Not* I. Os fragmentos foram separados em géis de agarose 1%. Os tamanhos de algumas bandas (PM) estão indicados à esquerda em pares de bases (bp).

4.4 Produção da Proteína MSP1₃₃ Recombinante.

O vetor pET28a-MSP1₃₃ foi utilizado para a transformação de bactérias *E. coli* competentes da cepa BL21/RIL. Selecionamos uma colônia após a transformação que foi crescida em meio LB/AMP e induzida com IPTG. A proteína, após sonicação, foi extraída em coluna de Níquel (figura 9A) e não apresentou precipitação após dialise contra PBS 1x (figura 9B).

Figura 9 - Produção da proteína MSP1₃₃. (A) Gel SDS-PAGE 12% em condições redutoras onde 1 corresponde a proteína antes de passar pela coluna de níquel e 2 a 5 correspondem a lavagem com 30 mM de imidazol e 6 a 8 correspondem a eluição com 100 mM de imidazol. (B). As frações 1 a 3 mostram a proteína MSP1₃₃ recombinante purificada e diluída em PBS 1x. O gel SDS-PAGE 12% mostra a banda referente à proteína com aproximadamente (35kDa), em cada poço há cerca de 1 µg da proteína.

4.5 Produção da Proteína MSP1₁₉ Recombinante.

O plasmídeo pET14b-MSP1₁₉ *P.vivax* (gentilmente cedido pela Dra. Irene da Silva Soares, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP) foi utilizado para a transformação de bactérias *E. coli* da cepa BL21/DE3 competentes. Seleccionamos então uma colônia que foi crescida e induzida como descrito em material e métodos. Após a precipitação das culturas, o precipitado bacteriano foi sonificado e a proteína purificada em coluna de níquel (figura 10A) e posteriormente dialisada contra PBS (figura 10B).

Figura 10 - Produção da proteína MSP1₁₉. (A) Gel SDS-PAGE 15% em condições redutoras onde de 1 ao 4 temos a eluições após lavagem. (B) A proteína MSP1₁₉ recombinante em diferentes concentrações após diálise em PBS 1x. O gel SDS-PAGE 15% mostra a banda referente à proteína com aproximadamente 19 kDa.

4.6 Transfecção em células HEK 293T.

Células HEK293T (gentilmente cedidas pelo Dr. Armando Ventura, Departamento de Microbiologia, ICB/USP) foram transfectadas com os plasmídeos que codificam as cadeias leve e pesada do mAb α DEC fusionado às proteínas MSP1₄₂ e MSP1₁₉ ou sem fusão alguma (controle negativo). Uma

semana depois da transfecção, o sobrenadante contendo os mAbs híbridos foi coletado.

Após a purificação utilizando esferas de proteína G, os mAbs híbridos foram quantificados pelo ensaio de Bradford e tiveram suas concentrações confirmadas através de SDS-PAGE. A figura 11A mostra um gel de SDS-PAGE 12% em condições redutoras onde podem-se observar as cadeias leve e pesada dos mAbs α DEC (canaleta 1), α DEC-MSP1₁₉ (canaleta 2) e α DEC-MSP1₄₂ (canaleta 3). As cadeias leves apresentam uma massa molecular de aproximadamente 25 kDa, enquanto que as cadeias pesadas variam de tamanho, de acordo com a proteína fusionada: aproximadamente 50 kDa para α DEC sem fusão alguma, 69 kDa para α DEC-MSP1₁₉ e 92 kDa para α DEC-MSP1₄₂. Neste gel podemos observar também as proteínas recombinantes MSP1₁₉ (canaleta 4) e MSP1₃₃ (canaleta 5) produzidas em bactérias. A figura 11B mostra também um gel SDS-PAGE 7% corrido em condições não redutoras. Neste gel podemos observar que os anticorpos intactos apresentam massa molecular maior.

Para verificar se tanto a proteína MSP1₁₉ quanto a MSP1₄₂ fusionadas ao mAb α DEC estariam sendo reconhecidas por anticorpos produzidos durante a infecção natural com *P. vivax*, os mAbs híbridos foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose que foi incubada com soro de um paciente infectado com *P. vivax* (figura 11C). Neste “western blot” verificamos o reconhecimento das cadeias pesadas dos mAbs α DEC-MSP1₁₉ (canaleta 2) e α DEC-MSP1₄₂ (canaleta 3), além do reconhecimento das proteínas recombinantes MSP1₁₉ (canaleta 4) e MSP1₃₃ (canaleta 5). Esse resultado foi repetido também quando os anticorpos foram corridos em géis não redutores (figura 11D). Demonstramos assim que nossos mAbs híbridos mantêm suas propriedades antigênicas.

Figura 11 - Os mAbs α DEC fusionados com as proteínas MSP1₁₉ e MSP1₄₂ foram produzidos com sucesso e são reconhecidos por soro de pacientes infectados com *P. vivax*. Aproximadamente 1 μ g de cada mAb híbrido ou da proteína recombinante foi separado em condições redutoras (A) e não redutoras (B). Ambos os géis foram corados com Coomassie Blue dye. Western blot em condições redutoras (C) e não redutoras (D). O western blot foi realizado com soro derivado de paciente infectado com *P. vivax*. As membranas foram reveladas após incubação com proteína A conjugada com HRP. Os mAbs híbridos ou proteínas recombinantes são apresentados na seguinte ordem 1) α DEC, 2) α DEC-MSP1₁₉, 3) α DEC-MSP1₄₂, 4) Proteína MSP1₁₉ recombinante e 5) Proteína MSP1₃₃ recombinante. As proteínas recombinantes não foram incluídas nos géis não redutores.

4.7 Ensaio de ligação dos mAbs α DEC-MSP1₄₂ e α DEC-MSP1₁₉ a células CHO transgênicas.

Para verificarmos se a adição das proteínas MSP1₄₂ ou MSP1₁₉ ao mAb α DEC205 afetaria a capacidade de ligação a seu respectivo receptor, os mAbs α DEC-MSP1₄₂ e α DEC-MSP1₁₉ foram testados em um ensaio de ligação utilizando células CHO que expressam os receptores DEC205 de camundongo (figura 12A) ou DEC205 humano (figura 12B). Incubamos as células com três diferentes concentrações (10, 1 e 0,1 μ g/mL) dos anticorpos α DEC, α DEC-MSP1₁₉ e α DEC-MSP1₄₂. Os anticorpos quiméricos ligaram-se ao receptor DEC205 de camundongo (figura 12A), mas não ao receptor DEC205 humano (figura 12B). Sua ligação foi específica e dose dependente.

Figura 12 - Ensaio de ligação dos mAbs α DEC-MSP1₄₂, α DEC-MSP1₁₉ e α DEC a células CHO expressando os receptores DEC205 de camundongo (A) ou humano (B). Cerca de 10⁵ células CHO foram incubadas com 10, 1 e 0,1 μ g/mL dos diferentes mAbs por 30 minutos no gelo. Após duas lavagens, as células foram incubadas com o anticorpo secundário (α IgG de camundongo-PE) por 30 minutos e lavadas mais duas vezes. Trinta mil eventos foram adquiridos usando o aparelho FACS Canto. A análise foi feita utilizando o programa FlowJo (TreeStar).

4.8 Ensaio de ligação dos mAbs quiméricos a DCs provenientes do baço de camundongos.

Para complementar os resultados mostrados acima, avaliamos também se os mAbs α DEC-MSP₁₄₂ e α DEC-MSP₁₁₉ foram capazes de ligar-se diretamente a DCs CD8 α ⁺ que expressam o receptor DEC205. Para tanto, realizamos um ensaio de ligação a DCs extraídas do baço de camundongos. Através de citometria de fluxo (utilizando a estratégia exemplificada na figura 13) selecionamos células CD19⁻DX5⁻MHCII⁺ e depois células CD11c⁺CD8 α ⁺ que devem também expressar o receptor DEC205. Observamos neste experimento a ligação específica e dose dependente dos mAbs α DEC-MSP₁₄₂ e α DEC-MSP₁₁₉ à população de DCs CD8 α ⁺. Importante mencionar que a ligação tanto do mAb α DEC-MSP₁₄₂ quanto do α DEC-MSP₁₁₉ foi bastante similar àquela apresentada pelo mAb α DEC utilizado como controle positivo. Além disso, observamos especificidade para DCs CD8 α ⁺ que são as células que expressam o receptor DEC205. A ligação a DCs CD11c⁺CD8 α ⁻ foi bastante baixa ou inexistente.

Figura 13 - Ensaio de ligação dos anticorpos αDEC-MSP1₄₂ e αDEC-MSP1₁₉ a DCs provenientes do baço de camundongos. Esplenócitos foram purificados e incubados com 10, 1 e 0,1 µg/mL dos mAbs αDEC-MSP1₄₂, αDEC-MSP1₁₉ ou αDEC. Após incubação os esplenócitos foram marcados com anticorpos anti-CD19, anti-MHCII, anti-DX5, anti-CD11c e anti-CD8. Através da estratégia de gating mostrada acima, selecionamos as células CD19⁺DX5⁻MHCII⁺CD11c⁺, que consideramos como DCs clássicas, e subdividimos estas em duas populações, de acordo com a expressão da cadeia alfa da molécula CD8. A ligação das diferentes concentrações dos mAbs às populações de DCs de interesse está mostrada nos histogramas utilizando-se um anticorpo anti-IgG1 de camundongo como secundário.

4.9 Análise da resposta humoral em camundongos C57BL/6 ou B10.A

imunizados com os mAbs α DEC-MSP1₄₂ ou α DEC-MSP1₁₉ em presença do adjuvante Poly (I:C).

Uma vez que mostramos que os mAbs híbridos foram produzidos com sucesso e mantiveram sua capacidade de ligação às DCs, iniciamos os protocolos de imunização utilizando Poly (I:C) como adjuvante. Neste trabalho iremos utilizar duas linhagens distintas de camundongos: C57BL/6 (haplótipo H-2^b) e B10.A (haplótipo H-2^{a(k/d)}). Escolhemos estas linhagens por dois motivos: primeiramente porque é importante validar o efeito do direcionamento de nosso antígeno em diferentes linhagens de camundongos, pois a população humana que será alvo de uma possível vacina não é isogênica e expressa vários haplótipos. O segundo motivo é que Rosa e colaboradores (148) descreveram um epítopo T CD4⁺ (DYDVVYLKPLAGMYK) na porção de 33 kDa da proteína MSP1 que é reconhecido pelo haplótipo do animais B10.A. Desta forma, pretendemos verificar o papel desse epítopo na indução de resposta nos animais imunizados com o anticorpo α DEC-MSP1₄₂.

A figura 14 mostra a resposta humoral medida pela produção de anticorpos IgG contra as proteínas MSP1₁₉ (figura 14A e B) e MSP1₃₃ (figura 14C e D) induzida nos animais C57BL/6 (figura 14A e C) e B10.A (figura 14B e D) imunizados com os mAbs α DEC-MSP1₄₂ e α DEC-MSP1₁₉. Como controle utilizamos animais imunizados com o mAb α DEC. Na figura 14A observamos que animais C57BL/6 imunizados com α DEC-MSP1₄₂ produzem altos títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉. Já nos animais imunizados com α DEC-MSP1₁₉, os títulos de anticorpos apresentados foram 260x mais baixos quando comparados com os títulos obtidos nos animais imunizados com α DEC-MSP1₄₂. Esta resposta parece indicar que existem epítopos reconhecidos por células T CD4⁺ que melhoram a resposta imune humoral anti-MSP1₁₉ e que estão contidos na porção de 33 kDa da proteína MSP1₄₂. Além disso, esses dados corroboram com dados na literatura em modelos de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium yoelli* (143). Em outro trabalho utilizando MSP1₄₂ codificada por um adenovírus foi observada uma potente resposta humoral anti-MSP1₁₉ (149). Essa relação se

manteve na linhagem B10.A como observamos na figura 14B. Neste caso, a diferença na resposta anti-MSP1₁₉ nos animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1₄₂ foi cerca de 40x maior nesses animais quando comparada à resposta obtida nos animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1₁₉ (figura 14B). Porém, ao contrário dos camundongos C57BL/6, detectamos também maior resposta imune anti-MSP1₁₉ nos animais imunizados com o anticorpo α DEC-MSP1₁₉ (comparar figura 14 A e B, triângulos pretos). Esse resultado indica que deve (m) existir epitopo(s) auxiliares dentro da sequência da proteína MSP1₁₉ que são reconhecidos pelo haplótipo H-2^{a(k/d)} e que auxilia(m) a produção de anticorpos nos animais B10.A. No entanto, o aumento na resposta anti-MSP1₁₉ nos animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1₄₂ indica que também nesta linhagem de animais, a presença dos epítopos na proteína MSP1₃₃ auxilia na resposta.

A figura 14 C e D mostra a resposta anti-MSP1₃₃ observada nas linhagens C57BL/6 e B10.A, respectivamente. Como esperávamos, observamos que apenas animais imunizados com α DEC-MSP1₄₂ apresentaram títulos de anticorpos anti-MSP1₃₃ e essa resposta quando comparada a resposta humoral gerada contra o fragmento 19kDa é cerca de 200x menor. Esses experimentos demonstram que a maior parte dos anticorpos gerados com a estratégia de direcionamento é contra a porção de 19kDa da MSP1, independentemente da linhagem de camundongos estudada. Estes resultados corroboram com dados obtidos na literatura que apontam a região de 19 kDa como o alvo para a resposta humoral (150).

Figura 14 - Imunização com o anticorpo α DEC-MSP1₄₂ induz resposta contra a proteína MSP1₁₉. Grupos de camundongos C57BL/6 (**A e C**) e B10.A (**B e D**) foram imunizados com 5 μ g dos mAbs híbridos α DEC-MSP1₄₂, α DEC-MSP1₁₉ ou α DEC na presença de 50 μ g de Poly (I:C). Trinta dias após a administração da primeira dose, os animais receberam uma dose de reforço com a mesma quantidade de anticorpo. A resposta de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉ (**A e B**) e anti-MSP1₃₃ (**C e D**) foi analisada por ELISA 5 dias antes da segunda dose (pré-boost, símbolos brancos) e 14 dias após a administração da dose de reforço (pós-boost, símbolos pretos). Os gráficos mostram o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizados em escala log₁₀ e os animais estão representados individualmente. As barras horizontais representam a média de cada grupo. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ns= não significante. **(A)** Imunização de animais C57BL/6 e placa de ELISA coberta com 2 μ g/ml de MSP1₁₉ recombinante. **(B)** Imunização de animais B10.A e placa de ELISA coberta com 2 μ g/ml de MSP1₁₉ recombinante. **(C)** Imunização de animais C57BL/6 e placa de ELISA coberta com 6 μ g/ml MSP1₃₃ recombinante. **(D)** Imunização de animais B10.A e placa de ELISA coberta com 6 μ g/ml MSP1₃₃ recombinante. Experimento representativo de 4 realizados separadamente. N= 10 animais/grupo.

4.10 Imunização induz anticorpos de todas as subclasses de IgGs contra a proteína MSP1₁₉ de *P.vivax*.

Para obtermos maiores informações sobre a qualidade da resposta humoral, decidimos analisar os subtipos de IgGs presentes nos soros dos animais imunizados. A figura 15 mostra a subtipagem de IgGs e também a relação IgG1/IgG2c obtida em cada grupo e em ambas as linhagens de camundongos. Nos animais C57BL/6, as subclasses de IgGs anti-MSP1₁₉ diferem nos animais imunizados com os anticorpos α DEC-MSP1₄₂ e α DEC-MSP1₁₉ (figura 15A). A análise da razão IgG1/IgG2c pode indicar se a resposta imune humoral teria um padrão mais Th1 ou mais Th2. Uma razão ao redor de 1 indica que há um balanço entre os dois tipos de resposta, enquanto que uma razão menor do que 1 indica que temos uma predominância de uma resposta Th1 e o contrário indica predominância de resposta do tipo Th2. Observamos que a resposta está mais direcionada para um padrão Th2 nos animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1₁₉ (razão IgG1/IgG2c igual a 1,6 e Th1 nos animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1₄₂ (razão IgG1/IgG2c igual a 0,24). O mesmo padrão de resposta observado nos camundongos C57BL/6 foi observado nos camundongos B10.A (figura 15B). A imunização com o mAb α DEC-MSP1₄₂ levou a indução de uma resposta com padrão mais direcionado para Th1.

Figura 15 - Imunização de camundongos C57BL/6 ou B10.A com o mAb αDEC-MSP1₄₂ induz anticorpos de todas as subclasses de IgGs contra a proteína MSP1₁₉ de *P. vivax*. Grupos de camundongos C57BL/6 (A) ou B10.A (B) foram imunizados como descrito na figura 14. As subclasses de IgGs foram determinadas 14 dias após a administração do reforço utilizando-se anticorpos específicos para cada subclasse. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizado em escala log₁₀. As médias ± desvios padrão estão representadas para cada subclasse e cada grupo.

4.11 Resposta humoral anti-MSP1₁₉ é abolida na ausência de linfócitos T CD4⁺

Para estudar mais a fundo o papel dos epítomos de células T CD4⁺ na resposta humoral induzida, decidimos imunizar camundongos “knockout” (KO) para as moléculas CD4 (CD4 KO) e MHC II (MHCII KO) que, portanto, não possuem linfócitos T CD4⁺. Esses camundongos somente estão disponíveis no “background” da linhagem C57BL/6 e, portanto, utilizamos esses animais como controles (WT). A figura 16 mostra a resposta humoral anti-MSP1₁₉ nestes animais comparados àquela gerada em camundongos C57BL/6 WT. Como podemos observar no grupo imunizado com α DEC-MSP1₄₂, a alta resposta humoral foi abolida nos animais CD4 e MHC II KO. Este resultado mostrou claramente que a resposta humoral é dependente de linfócitos T CD4⁺.

Figura 16 - Resposta humoral anti-MSP1₁₉ é abolida na ausência de linfócitos T CD4⁺. Grupos de camundongos C57BL/6 (símbolos pretos), CD4 KO (símbolos cinza) ou MHCII KO (símbolos cinza claros) foram imunizados como descrito na figura 14. A resposta de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉ foi analisada por ELISA 5 dias antes da segunda dose (pré-boost, símbolos vazados) e 14 dias após a administração da dose de reforço (pós-boost, símbolos cheios). Os gráficos mostram o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizados em escala log10 e os animais estão representados individualmente. As barras horizontais representam a média de cada grupo.

4.12 Imunização com o anticorpo α DEC-MSP1₄₂ e α DEC-MSP1₁₉ induz anticorpos que reconhecem a proteína MSP1₁₉ na superfície de células HEK 293T.

Células HEK 293T foram transfectadas com os plasmídeos que codificam a proteína MSP1₁₉ e a proteína DBP que foi utilizada como controle (gentilmente cedido pela Dra. Irene da Silva Soares, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP). Uma semana depois da transfecção, essas células foram desprendidas da placa e contadas. Cem mil células transfectadas com as proteínas MSP1₁₉ ou DBP foram incubadas com diferentes diluições dos soros dos animais imunizados com os mAbs quiméricos conforme mostrado na figura 17. Após 30 minutos de incubação, as células foram lavadas com tampão de FACS (PBS+2% soro fetal bovino) e incubadas com um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com PE. As amostras foram então lidas em citômetro de fluxo e analisadas utilizando-se o software FlowJo (TreeStar).

Como podemos observar na figura 17, o soro de animais C57BL/6 (17 A e B) e B10.A (17 C e D) imunizados com o α DEC-MSP1₄₂ foi capaz de reconhecer a proteína MSP1₁₉ na superfície de células HEK mesmo com alta diluição (figura 17A e 17C) enquanto animais imunizados com α DEC-MSP1₁₉ tivemos que usar uma diluição menor dos soros, ou seja, tivemos que usar uma quantidade maior de anticorpo para que obtivesse o mesmo resultado (figura 17A e 17C). Como esperado (figura 17B e 17D), os anticorpos induzidos nos animais imunizados com α DEC-MSP1₄₂ e α DEC-MSP1₁₉ não se ligaram a células HEK que expressavam a proteína DBP.

Figura 17 - Imunização com os mAbs α DEC-MSP1₄₂ e α DEC-MSP1₁₉ induz anticorpos que reconhecem a proteína MSP1₁₉ na superfície de células HEK293T transfectadas. (A) Células HEK 293T expressando a proteína MSP1₁₉ incubadas com diferentes diluições de soros de animais C57BL/6 imunizados com anticorpos quiméricos. **(B)** Células HEK 293T expressando a proteína DBP incubadas com diferentes diluições de soros de animais C57BL/6 imunizados com anticorpos quiméricos. **(C)** Células HEK 293T expressando a proteína MSP1₁₉ incubadas com diferentes diluições de soros de animais B10.A imunizados com anticorpos quiméricos. **(D)** Células HEK 293T expressando a proteína DBP incubadas com diferentes diluições de soros de animais B10.A imunizados com anticorpos quiméricos.

4.13 A imunização com o mAb α DEC-MSP1₄₂ induz a produção de anticorpos contra MSP1₁₉ com maior afinidade.

A detecção de todas as subclasses de IgG em ambas as linhagens de camundongos e especialmente nos animais que foram imunizados α DEC-MSP1₄₂ sugeriram que as células B sofreram mudança de classe e provavelmente maturação por afinidade. Por esse motivo resolvemos realizar usar um experimento que determina a avidéz por ELISA utilizando ureia (151).

Como podemos observar na figura 18, os anticorpos anti-MSP1₁₉ induzidos em camundongos C57BL/6 ou em camundongos B10.A imunizados

com α DEC-MSP1₄₂ mostraram um índice de averse superior quando comparados aos dos animais imunizados com α DEC-MSP1₁₉.

Em resumo, os resultados até aqui demonstram que a imunização com α DEC-MSP1₄₂ é capaz de induzir uma resposta imune humoral forte e mais completa quando comparada com a imunização com α DEC-MSP1₁₉. Para elucidar melhor como essa resposta foi gerada partiremos agora para os ensaios celulares.

Figura 18 - O direcionamento da proteína MSP1₄₂ para o subtipo de células dendríticas CD8⁺DEC205⁺ induz anticorpos de alta averse. (A) A averse foi detectada por ELISA utilizando 7 M de ureia durante 5 min. O índice de averse foi calculado como a razão entre a DO₄₉₀ obtida depois e antes do tratamento com ureia, multiplicada por 100. Os resultados são expressos em média $\pm$ SD de dois experimentos diferentes realizados em triplicada. One-way ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. ** Refere-se a $p < 0,01$ e * refere-se a $p < 0,05$.

4.14 Análise da resposta celular em camundongos C57BL/6 ou B10.A

imunizados com os mAbs quiméricos na presença do adjuvante Poly (1:C).

Além da análise da resposta humoral, decidimos também verificar se seria possível detectar alguma resposta imune celular induzida nos animais imunizados com os diferentes mAbs quiméricos. Dados na literatura utilizando MSP1₄₂ de *P. falciparum* e *P. yoelii* vem mostrando que os epítomos de células T CD4⁺ estão presentes na porção de 33 kDa desta molécula. Para analisar a

resposta imune celular nas duas linhagens de camundongos, utilizamos as proteínas recombinantes MSP1₁₉ e MSP1₃₃.

A figura 19 mostra o número de células produtoras de IFN γ por milhão no baço de camundongos C57BL/6 (figura 19A) ou B10.A (figura 19B). Podemos observar claramente um número maior de células produtoras de IFN γ em ambas as linhagens quando os animais foram imunizados com o mAb α DEC-MSP1₄₂ e tiveram suas células reestimuladas *in vitro* com a proteína MSP1₃₃ (comparar barras pretas na figura 19A e 19B). Quando as mesmas células foram reestimuladas com a proteína MSP1₁₉, o número de células produtoras de IFN γ não foi diferente do número encontrado nos animais controle imunizados com o mAb α DEC vazio ou com aqueles imunizados com o mAb α DEC-MSP1₁₉ nos animais B10.A (figura 19B, barras cinzas). Baseados nos resultados apresentados na figura 19, podemos especular que essa quantidade de células produtoras de IFN γ parece responder a epítomos presentes na porção de 33 kDa. Para testar o epítomo descrito por Rosa *et al.* (148) realizamos experimentos (figura 19C) com 1 μ g/mL do peptídeo DYDVVYLKPLAGMYK na linhagem B10.A. Observamos nos ensaios celulares com o peptídeo descrito por Rosa *et al.* que a quantidade de células produtoras de IFN γ foi quase 3 vezes menor quando comparada à quantidade obtida com a reestimulação com a proteína MSP1₃₃. Com isso concluímos que devem haver outros epítomos nesta proteína capaz de ativar células T.

Figura 19 - Esplenócitos derivados de animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1₄₂ produzem IFN γ quando reestimulados com a proteína MSP1₃₃ em duas linhagens diferentes de camundongos. Grupos de camundongos C57BL/6 **(A)** e B10.A **(B)** foram imunizados como descrito na figura 14. A resposta imune celular foi avaliada por ELISPOT 20 dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos totais foram estimulados com 1 μ g/mL das proteínas recombinantes MSP1₃₃ (barras pretas) ou MSP1₁₉ (barras cinzas). **(C)** Os esplenócitos de animais B10.A foram estimulados com 1 μ g/mL do peptídeo DYDVVYLKPLAGMYK (barras pretas) ou peptídeo não relacionado (barras cinzas). O gráfico mostra o número de células produtoras de IFN γ por milhão de células totais descontando-se o número de spots formados na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam a média $\pm$ desvio padrão. Experimento representativo de dois realizados independentemente. One-way ANOVA seguida do pós-teste de Tukey . *** Refere-se a $p < 0,001$ e ns refere-se a não significativo.

4.15 Produção das citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α ex vivo pelas células dos animais imunizados com α DEC-MSP1₄₂ após serem reestimuladas com as proteínas e peptídeos de interesse.

Analizamos pelo método de *Intracellular Staining* (ICS) a expressão de algumas citocinas por linfócitos T CD4⁺ tipicamente associadas a uma resposta imune tipo Th1 no baço dos camundongos imunizados com os diferentes mAbs quiméricos na presença de Poly I:C. Dessa forma, analisamos a porcentagem de células produtoras de IFN γ , IL-2 e TNF α . Fizemos uma marcação intracelular para cada uma das citocinas e separamos as células em linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD4⁻ (provavelmente células T CD8⁺). A figura 20 mostra a porcentagem de células T CD3⁺CD4⁺ produtoras de cada uma das citocinas nos diferentes grupos reestimulados com as proteínas MSP1₁₉, MSP1₃₃ e com o peptídeo DYDVVYLKPLAGMYK. Não detectamos nenhuma resposta nas células T CD3⁺CD4⁻ (dados não mostrados). Na figura 20A temos células de camundongos C57BL/6 reestimuladas com as proteínas MSP1₃₃ e MSP1₁₉ e como podemos observar que os animais imunizados com α DEC-MSP1₄₂ e reestimulados com a proteína MSP1₃₃ foram capazes de produzir IFN γ , IL-2 e TNF α de forma significativa. Além disso, nos animais C57BL/6 fomos capazes de acompanhar essa resposta 6 meses após a imunização (figura 21) quando observamos que, mesmo após esse período, as células dos camundongos

imunizados com α DEC-MSP1₄₂ e reestimulados com a proteína MSP1₃₃ ainda foram capazes de produzir quantidade expressivas dessas citocinas. Verificamos também a produção de citocinas na linhagem de animais B10.A (figura 20B), porém nesses animais não acompanhamos a longevidade da resposta celular. Além disso, resolvemos verificar a resposta celular nos animais B10.A reestimulados com o peptídeo DYDVVYLKPLAGMYK (figura 20C) e, mais uma vez, apenas animais imunizados com α DEC-MSP1₄₂ foram capazes de responder. Esse dado já era esperado uma vez que o peptídeo DYDVVYLKPLAGMYK é descrito como parte do fragmento de 33 kDa e já havíamos detectado a produção de IFN γ por ELISPOT. Os dados apresentados acima indicam que as células T CD4⁺ de animais imunizados com α DEC-MSP1₄₂ são capazes de produzir IFN γ , IL-2 e TNF α quando entram em contato com a proteína MSP1₃₃ recombinante. Esse dado é muito interessante uma vez que essas citocinas exercem inúmeras funções no controle da resposta imune em camundongos infectados com *Plasmodium* (152).

Figura 20 - Produção das citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α *ex vivo* pelas células dos animais imunizados com α DEC-MSP1₄₂ após serem reestimuladas com as proteínas MSP1₁₉ e MSP1₃₃ ou com peptídeo específico. Grupos de camundongos C57BL/6 (A) e B10.A (B e C) foram imunizados como descrito na figura 14. Os esplenócitos foram incubados com 5 μ g/mL das proteínas recombinantes MSP1₁₉ e MSP1₃₃ (A e B), com o peptídeo DYDVVYLKPLAGMYK (C) e as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α foram detectadas por marcação intracelular. O gráfico mostra as porcentagem de células produtoras de IFN γ , IL-2 e TNF α no gate de células CD3⁺CD4⁺.

Figura 21 - Produção das citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α *ex vivo* pelas células dos animais imunizados há 6 meses com α DEC-MSP1₄₂. Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados como descrito na figura 14. Os esplenócitos foram retirados 6 meses após imunização e incubados com 5 μ g/mL das proteínas recombinantes MSP1₁₉ e MSP1₃₃ e as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α foram detectadas por marcação intracelular. O gráfico mostra a porcentagem de células produtoras de IFN γ , IL-2 e TNF α no gate de células CD3⁺CD4⁺.

4.16 Imunização de animais com o mAb α DEC-MSP1₄₂ induz células T CD4⁺ polifuncionais.

Alguns trabalhos usando o modelo de direcionamento de antígenos para a população de células dendríticas DEC205⁺CD8 α ⁺ mostraram uma resposta polifuncional de linfócitos T CD4⁺ (com produção simultânea de IL-2, IFN γ e TNF α) bastante duradoura e também protetora (53). Por esse motivo, resolvemos avaliar a presença dessas células polifuncionais em nosso modelo. Dessa maneira, analisamos a porcentagem de células produtoras de IFN γ , IL-2 e TNF α simultaneamente. Fizemos uma marcação intracelular para cada uma das citocinas e as detectamos na população de linfócitos T CD3⁺CD4⁺. A figura 22 mostra a porcentagem de células T CD3⁺CD4⁺ que são triplo, duplo ou que produzem somente uma citocina nos camundongos C57BL/6 (figura 22A) e B10.A (figura 22B). Neste caso, as células dos animais foram reestimuladas somente com a proteína MSP1₃₃. Não detectamos nenhuma resposta nas células T CD3⁺CD4⁻ (dados não mostrados). Desta forma, estes dados indicam que a fonte destas citocinas são células T CD4⁺. Evidenciamos de forma clara que o direcionamento do fragmento de 42 kDa para a população DEC205⁺CD8 α ⁺ nos animais C57BL/6 e B10.A induz um número significativo de células polifuncionais.

Figura 22 - Imunização de camundongos com o mAb α DEC-MSP1₄₂ induz células T CD4⁺ polifuncionais que produzem IFN γ , IL-2 e TNF α quando reestimuladas com a proteína MSP1₃₃. Grupos de camundongos C57BL/6 (A) e B10.A (B) foram imunizados como descrito na figura 14. Os esplenócitos foram incubados com 5 μ g/mL da proteína MSP1₃₃ e as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α foram detectadas por marcação intracelular. O gráfico mostra as porcentagem de células produtoras de todas as combinações das três citocinas no gate de células CD3⁺CD4⁺. O ensaio foi feito em duplicata e as barras indicam a média $\pm$ desvio padrão. Experimento representativo de dois realizados independentemente.

4.17 Células dos animais imunizados com o anticorpo α DEC-MSP1₄₂ proliferam frente a um estímulo com a proteína MSP1₃₃ recombinante.

Analizamos também a proliferação de linfócitos T CD4⁺ através da técnica de CFSE. Além da produção de citocinas, as células T CD4⁺ dos animais C57BL/6 (figura 23A) e B10.A (figura 23B) imunizados com o mAb α DEC-MSP1₄₂ foram capazes de proliferar quando reestimuladas com a proteína MSP1₃₃. Quando essas mesmas células de animais B10.A (figura 23C) foram reestimuladas com o peptídeo DYDVVYLKPLAGMYK, houve proliferação, mas esta foi quase 3x menor do que a obtida com o re-estímulo com a proteína MSP1₃₃. Além disso, no caso dos animais C57BL/6, analisamos também a resposta celular 6 meses após a imunização e verificamos que, mesmo após esse período, conseguimos detectar células T CD4⁺ capazes de proliferar em contato com a proteína MSP1₃₃ recombinante nos animais imunizados com anticorpo α DEC-MSP1₄₂ (figura 24).

Figura 23 - Células dos animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1₄₂ proliferam frente a um estímulo com a proteína MSP1₃₃ recombinante. Grupos de camundongos C57BL/6 (A) e B10.A (B e C) foram imunizados como descrito na figura 14. A resposta imune celular foi avaliada através de proliferação por diluição de CFSE. Os esplenócitos foram incubados com 5 μ g/mL da proteínas recombinantes MSP1₁₉, MSP1₃₃ (A e B) e peptídeo DYDVVYLKPLAGMYK (C). O gráfico mostra a porcentagem de células T CD3⁺CD4⁺ que perderam CFSE (CFSElow) descontando-se a porcentagem de células que proliferaram na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam a média $\pm$ desvio padrão. One-way ANOVA seguida do pós-teste de Tukey . *** Refere-se a $p < 0,001$ e ns refere-se a não significativo.

Figura 24 - Células dos animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1₄₂ proliferam frente a um estímulo com a proteína MSP1₃₃ recombinante 6 meses após imunização. Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados como descrito na figura 14. A resposta imune celular foi avaliada através de proliferação por diluição de CFSE. Seis meses após a imunização, os esplenócitos foram incubados com 5 μ g/mL das proteínas recombinantes MSP1₃₃ e MSP1₁₉. O gráfico mostra a porcentagem de células T CD3⁺CD4⁺ que perderam CFSE (CFSElow) descontando-se a porcentagem de células que proliferaram na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam a média $\pm$ desvio padrão.

Decidimos também avaliar a secreção de citocinas nos sobrenadantes das culturas de linfócitos. Para tanto, utilizamos o kit *CBA mouse Th1/Th2/Th17*. Conseguimos detectar somente IFN γ , IL-10 e TNF α no sobrenadante das células derivadas de animais imunizados com α DEC-MSP1₄₂ e reestimulados com a proteína MSP1₃₃ após 5 dias de cultura nos animais C57BL/6 (figura 25A) ou B10.A (figura 25B). Nos animais B10.A reestimulados com o peptídeo DYDVVYLKPLAGMYK (figura 25C) detectamos principalmente a presença de IFN γ e níveis mais baixos de IL-10. Esses dados indicam que a imunização com o mAb α DEC-MSP1₄₂ induz, além de uma forte resposta Th1, também a citocina IL-10 que tem caráter mais regulatório.

Figura 25 - A imunização com α DEC-MSP1₄₂ induz maior produção das citocinas IFN γ , TNF α e IL-10 após 5 dias de cultura. Os esplenócitos de camundongos C57BL/6 (A) ou B10.A.(B e C) imunizados com α DEC-MSP1₄₂ foram incubados com a proteína MSP1₃₃ (A e B) ou com o peptídeo DYDVVYLKPLAGMYK (C). Após 120 horas, os níveis de IFN γ , TNF α e IL-10 nos sobrenadantes da cultura foram medidos utilizando o kit CBA Th1/Th2/Th17. O ensaio foi feito em duplicata e as barras indicam a média $\pm$ desvio padrão. O experimento foi lido usando o aparelho FACS Canto. A análise foi feita utilizando o programa FlowJo (TreeStar).

Os dados descritos até o momento demonstram que o mAb α DEC-MSP1₄₂ foi produzido com sucesso e manteve sua capacidade de ligação ao receptor DEC205. Fomos também capazes de utilizá-lo em experimentos de imunização na presença de Poly (I:C) (ligante de TLR3 e MDA5) em duas linhagens diferentes de camundongos: C57BL/6 (H-2^b) e B10.A (H-2^{a(k/d)}). Ficou bastante claro que o direcionamento da proteína MSP1₄₂ para as células dendríticas DEC205⁺ em ambas as linhagens utilizadas induziu uma forte resposta humoral anti-MSP1₁₉.

Em camundongos C57BL/6, demonstramos que esta resposta foi dependente de linfócitos T CD4⁺ pois, na ausência destas células, quase não detectamos uma resposta de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉. Além disso, esse direcionamento foi capaz de induzir uma potente resposta celular contra o fragmento de 33 kDa da proteína MSP1₄₂ em ambas linhagens.

No caso dos camundongos B10.A, Rosa *et al.* já haviam descrito um epítipo para células T CD4⁺ presente na porção de 33 kDa da MSP1₄₂ (148). Nós fomos capazes de detectar células produtoras de três citocinas inflamatórias capazes de proliferar frente ao reestímulo com o epítipo DYDVVYLKPLAGMYK descrito. No entanto, quando os linfócitos dos animais B10.A imunizados com o mAb α DEC-MSP1₄₂ foram reestimulados com a proteína MSP1₃₃, detectamos uma resposta celular mais robusta do que a detectada com o peptídeo. Desta forma, acreditamos que existem outros epítopos na porção de 33 kDa que sejam responsáveis por essa resposta.

4.18 Análise comparativa da imunização com os mAbs quiméricos e com as proteínas recombinantes.

Em uma tentativa de comparar o efeito do direcionamento com o não direcionamento, decidimos imunizar camundongos C57BL/6 com os mAbs α DEC-MSP1₄₂ e α DEC-MSP1₁₉ e compará-los com animais imunizados com as proteínas recombinantes MSP1₃₃, MSP1₁₉ ou com uma combinação de MSP1₃₃+MSP1₁₉. É importante mencionar que fizemos várias tentativas de produzir a proteína MSP1₄₂ recombinante em bactérias e nunca obtivemos sucesso (dados não mostrados). Por esse motivo, imunizamos um grupo de animais com as duas proteínas recombinantes juntas.

As imunizações foram realizadas da mesma forma que nos experimentos anteriores, sendo que cada animal recebeu 5 μ g de cada mAb quimérico ou uma concentração de proteína equivalente à quantidade de MSP1₃₃ (1,5 μ g) e MSP1₁₉ (1 μ g) contida em 5 μ g do anticorpo.

A figura 26 mostra a resposta humoral medida pela produção de anticorpos IgG contra a proteína MSP1₁₉ nos grupos de animais imunizados com os mAbs quiméricos ou com as proteínas recombinantes. Podemos observar que tanto os animais que foram imunizados com a proteína MSP1₁₉ quanto aqueles imunizados com a combinação das proteínas MSP1₃₃+MSP1₁₉ apresentaram altos títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉. De fato, os níveis de anticorpos anti-MSP1₁₉ não foram diferentes daqueles encontrados nos animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1₄₂.

Figura 26 - Imunização com o mAb híbrido αDEC-MSP1₄₂ ou com a proteína MSP1₁₉ recombinante induz resposta semelhante contra a proteína MSP1₁₉. Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados com os mAbs αDEC-MSP1₄₂ e αDEC-MSP1₁₉ ou com as proteínas recombinantes MSP1₃₃, MSP1₁₉ ou MSP1₃₃+MSP1₁₉ na presença de 50 µg de Poly (I:C). Trinta dias após a administração da primeira dose, os animais receberam uma dose de reforço. A resposta humoral foi analisada por ELISA 5 dias antes da segunda dose (pré-boost, símbolos brancos) e 14 dias após a administração da dose de reforço (pós-boost, símbolos pretos). Os gráficos mostram o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizados em escala log10 e os animais estão representados individualmente. As barras horizontais representam a média de cada grupo. * p<0,05, *** p<0,001, ns= não significante

Para obtermos maiores informações sobre a qualidade da resposta humoral nos novos grupos imunizados realizamos subtipagem de IgGs e também a calculamos a razão IgG1/IgG2c obtida em cada grupo, assim como feito nos experimentos anteriores.

Na figura 27 comparamos a resposta induzida pela imunização com os mAbs quiméricos e com as proteínas recombinantes MSP1₁₉ bem como MSP1₃₃+MSP1₁₉. Podemos observar que a imunização com o mAb quimérico αDEC-MSP1₄₂ apresentou uma razão IgG1/IgG2c menor que 1 enquanto na imunização com as proteínas recombinantes, a razão foi bem maior que 1. Com esse resultado, podemos especular que a imunização com αDEC-MSP1₄₂ induz maior mudança de classe para IgG2c enquanto que na imunização com as proteínas recombinantes encontramos mais células B fazendo IgG1.

Figura 27 - Avaliação de subclasses de IgGs contra a proteína MSP1₁₉ de *P. vivax* em diferentes grupos. Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados como descrito na figura 26. As subclasses de IgGs foram determinadas 14 dias após a administração do reforço utilizando-se anticorpos específicos para cada subclasse. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizado em escala log10. As médias $\pm$ desvios padrão estão representadas para cada subclasse e cada grupo. Acima dos gráficos estão mostradas as razões IgG1/IgG2c para cada grupo imunizado.

Como observamos nos experimentos anteriores, a imunização com α DEC-MSP1₄₂ é capaz de induzir uma resposta imune humoral forte e mais completa quando comparada com a imunização com α DEC-MSP1₁₉. Observamos essa diferença também quando avaliamos a avidéz nos soros de animais imunizados com mAbs e com as proteínas recombinantes (Figura 28).

Figura 28 - O direcionamento da proteína MSP1₄₂ para a subpopulação de células dendríticas CD8⁺DEC205⁺ induz anticorpos de alta avidéz. (A) A afinidade foi detectada por ELISA anti-MSP1₁₉ utilizando 7 M de ureia durante 5 minutos. O índice de avidéz foi calculado como a razão entre a DO₄₉₀ obtida depois e antes do tratamento com ureia, multiplicado por 100. Os resultados são expressos pela média ± SD de dois experimentos diferentes realizados em triplicada.. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey . ** Refere-se a $p < 0,001$. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes.

Além da resposta humoral, avaliamos também a resposta celular nos animais imunizados com os mAbs quiméricos e proteínas recombinantes. A Figura 29 mostra o número de células produtoras de IFN γ por milhão no baço de camundongos C57BL/6. Podemos observar claramente um número maior de células produtoras de IFN γ , nos animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1₄₂ e que tiveram suas células reestimuladas *in vitro* com a proteína MSP1₃₃. No entanto, observamos que animais imunizados com proteína MSP1₁₉ e reestimulados com a mesma produzem IFN γ , o que pode indicar que há alguns epítomos para células T mais fracos na própria sequência da proteína MSP1₁₉.

Figura 29 - Esplenócitos derivados de animais imunizados com o mAb αDEC-MSP1₄₂ produzem IFN γ quando reestimulados com a proteína MSP1₃₃. Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados como descrito na figura 26. A resposta imune celular foi avaliada por ELISPOT 20 dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos totais foram estimulados com 1 μ g/mL das proteínas recombinantes MSP1₃₃ ou MSP1₁₉. O gráfico mostra o número de células produtoras de IFN γ por milhão de células totais descontando-se o número de spots formados na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam a média $\pm$ desvio padrão. Experimento representativo de dois realizados independentemente.

Como fizemos nos experimentos anteriores resolvemos analisar a resposta imune celular avaliando a produção das citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α . Na figura 30 temos células de camundongos C57BL/6 reestimulados com 5 μ g das proteínas MSP1₃₃ e MSP1₁₉ e podemos observar que os animais que foram imunizados com αDEC-MSP1₄₂ e reestimulados com a proteína MSP1₃₃ foram capazes de produzir IFN γ , IL-2 e TNF α de forma significativa. O mesmo não ocorreu com os animais imunizados com as proteínas recombinantes.

Figura 30 - Produção das citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α *ex vivo* pelas células dos animais imunizados com α DEC-MSP1₄₂ após serem reestimuladas com as proteínas MSP1₁₉ e MSP1₃₃. Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados como descrito na figura 27. Os esplenócitos foram incubados com 5 μ g/mL das proteínas recombinantes MSP1₁₉ e MSP1₃₃. As citocinas IFN γ , IL-2 e TNF α foram detectadas por marcação intracelular. O gráfico mostra as porcentagem de células produtoras de IFN γ , IL-2 e TNF α no gate de células CD3⁺CD4⁺.

Finalmente, também avaliamos a capacidade de proliferação dos linfócitos T CD4⁺ de animais imunizados com os diferentes mAbs quiméricos e proteínas recombinantes. A figura 31 mostra intensa proliferação de linfócitos T CD4⁺ somente nos animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1₄₂ pulsado com a proteína MSP1₃₃. Mas uma vez, esses resultados indicam que a imunização de animais com o mAb α DEC-MSP1₄₂ induz respostas humoral e celular superiores do que quando usamos o anticorpo α DEC-MSP1₁₉ ou mesmo as proteínas recombinantes.

Figura 31 - Células dos animais imunizados com o mAb αDEC-MSP1₄₂ proliferam frente a um estímulo com a proteína MSP1₃₃ recombinante. Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados como descrito na figura 26. A resposta imune celular foi avaliada através de proliferação por diluição de CFSE. Os esplenócitos foram incubados com 5 µg/mL das proteínas recombinantes MSP1₁₉ e MSP1₃₃. O gráfico mostra a porcentagem de células T CD3⁺CD4⁺ que perderam CFSE (CFSE_{low}) descontando-se a porcentagem de células que proliferaram na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam a média ± desvio padrão.

5 DISCUSSÃO

O direcionamento de antígenos para a população de DCs CD8 α^+ através da utilização de mAbs híbridos α DEC205 tem sido utilizado com sucesso em diferentes modelos e se mostrou induzir células T CD8 $^+$ e CD4 $^+$ (51-53, 55-57, 60, 153-158). Além disso, a indução de anticorpos contra o antígeno fundido também foi relatada anteriormente (51, 159). Todos estes estudos utilizaram antígenos anteriormente descritos como imunogênicos. No entanto, até onde sabemos, ninguém ainda direcionou diferentes fragmentos do mesmo antígeno para as DCs DEC205 $^+$ e perguntou qual seria o resultado da resposta imune. Para começar a responder esta questão, produzimos dois mAbs contendo fragmentos da proteína MSP1 derivada de *P. vivax*. O mAb α DEC-MSP1₁₉ contém o fragmento C-terminal de 19 kDa, que é normalmente alvo de anticorpos em indivíduos infectados (160-162), enquanto que o mAb α DEC-MSP1₄₂ contém o fragmento de 19 kDa (MSP1₁₉) fundido com o fragmento 33 kDa (MSP1₃₃) que foi capaz de induzir respostas de células T no campo (143). É importante ressaltar que neste estudo, não foi avaliado se os epitopos de células T foram reconhecidos pelas células T CD4 $^+$ ou CD8 $^+$, além de que a sequência da MSP1₃₃ era derivada de *P. falciparum* ao invés de *P. vivax* (143). Ambos os mAbs híbridos foram produzidos com sucesso, conservaram sua antigenicidade e foram capazes de ligar-se ao receptor DEC205 expresso na superfície do subtipo de DCs CD8 α^+ . Esta não é a primeira vez que um antígeno derivado de *Plasmodium* é fundido com o mAb α DEC205. Anteriormente, a proteína circunsporozoítica (CSP) de *P. yoelii* e de *P. falciparum* também foi utilizada para imunizar camundongos (51) e primatas não humanos (57). Contudo, até onde sabemos, é a primeira vez que um antígeno expresso pelo estágio eritrocítico (merozoítos) é fundido com o mAb α DEC205. Nós nos aproveitamos do fato de que a MSP1₄₂ contém a MSP1₁₉ e imunizamos camundongos com ambos os mAbs híbridos numa tentativa de estudar a resposta de anticorpos anti-MSP1₁₉ induzida quando a MSP1₁₉ era direcionada sozinha ou fusionada com a MSP1₃₃. O uso do Poly (I:C) como um estímulo de maturação para as DCs está bem documentado na literatura e ele parece ser muito potente quando administrado em conjunto com mAbs de fusão contendo o α DEC205 (53, 57, 61, 157, 159, 163). Observamos um aumento nos títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉ ou anti-MSP1₃₃ após a administração da segunda dose, o que tem sido

consistentemente observado em outros modelos (51, 61) . De forma interessante, os títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉ aumentaram cerca de 100x quando a MSP1₄₂ foi direcionada para a população de DCs CD8 α ⁺ em duas linhagens diferentes de camundongos. Este resultado sugeriu que a presença de fragmento MSP1₃₃ estava ajudando a aumentar a resposta de anticorpos anti-MSP1₁₉, possivelmente devido à presença de epítopos de células T adicionais na região de 33 kDa. No entanto, para nossa surpresa, a imunização com a proteína MSP1₁₉ recombinante ou com as proteínas. MSP1₃₃+MSP1₁₉ foi capaz de induzir títulos elevados de anticorpos anti-MSP1₁₉ nos camundongos C57BL/6 que não foram diferentes dos títulos induzidos pelo mAb α DEC-MSP1₄₂. Este resultado foi inesperado, mas pode refletir uma maior persistência da proteína MSP1₁₉ recombinante na circulação, levando a um aumento na captação de antígeno por células B. Também não podemos excluir a possibilidade de que a proteína MSP1₁₉ possa conter epítopos de células T CD4⁺ minoritários e que possam ser responsáveis por auxiliar as células B a produzir anticorpos quando a proteína não é direcionada diretamente para as DCs DEC205⁺.

A dependência de células T auxiliares para a indução de respostas de anticorpos após o direcionamento para as DCs DEC205⁺ foi demonstrada depois da imunização de camundongos CD4 e MHCII KO, quando foi observado a completa redução da resposta de anticorpos nos animais. Para caracterizar mais detalhadamente a resposta de anticorpos anti-MSP1₁₉, analisamos cuidadosamente as subclasses de IgG induzidas quando os mAbs híbridos ou as proteínas recombinantes foram utilizadas. Surpreendentemente, a imunização com o mAb α DEC-MSP1₄₂ induziu um perfil muito diferente de subclasses de IgG quando comparado com perfil observado após a imunização com o mAb α DEC-MSP1₁₉ ou com as proteínas recombinantes. A proporção de IgG1 / IgG2c em animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1₄₂ foi <1, indicando uma resposta de tipo Th1 em ambas as linhagens de camundongos analisadas. Por outro lado, os grupos imunizados com o mAb α DEC-MSP1₁₉ ou com as proteínas recombinantes apresentaram uma maior razão IgG1 / IgG2c (> 1) em ambas as linhagens. Artigos anteriores demonstraram que o direcionamento de antígenos através do receptor DEC205 é capaz de induzir títulos elevados de IgG2c (ou IgG2a, dependendo da linhagem do camundongo) (51, 61, 158). Estes

resultados também sugeriram que a imunização com α DEC-MSP1₄₂ poderia estar induzindo uma mudança mais pronunciada de classes de IgG, o que implicaria em aumento na maturação por afinidade. Medimos então o índice de avides dos soros policlonais obtidos de camundongos imunizados com α DEC-MSP1₄₂, α DEC-MSP1₁₉ ou com as proteínas recombinantes. Em ambas as linhagens de camundongos, o índice de avides foi maior nos soros de animais imunizados com o mAb α DEC-MSP1₄₂, sugerindo que as células B específicas anti-MSP1₁₉ estavam sofrendo maturação por afinidade particularmente neste grupo de camundongos.

Por outro lado, a capacidade de se ligar à MSP1₁₉ expressa na superfície de células HEK293T transfectadas foi semelhante entre os grupos imunizados com mAbs α DEC-MSP1₄₂ ou α DEC-MSP1₁₉, quando consideramos as diluições em que ambos os soros apresentavam valores de DO semelhantes. Apesar da ligação semelhante observada quando foram utilizadas quantidades semelhantes de anticorpos anti-MSP1₁₉, o fato de a imunização com α DEC-MSP1₄₂ induzir títulos de anticorpos mais elevados com avides aumentada pode ser favorável nas áreas endêmicas, em que títulos mais elevados de anti-MSP1₁₉ foram associados à proteção contra a malária (138).

Os resultados envolvendo a resposta de anticorpos anti-MSP1₁₉ descrita acima indicaram que as células T CD4⁺ estavam a ser ativadas durante a imunização com o mAb α DEC-MSP1₄₂, uma vez que a interação inicial das células T-B conduz à formação do centro germinativo, maturação por afinidade e mudança de isotipo. O aumento da produção de IgG2c nos levou a investigar se as células T eram capazes de produzir IFN- γ , uma citocina associada à produção desta subclasse (164). Pudemos detectar um elevado número de células T produtoras de IFN- γ em ambas as linhagens de camundongos imunizadas com o MAb α DEC-MSP1₄₂ apenas quando os esplenócitos foram pulsados com a proteína MSP1₃₃ recombinante. Isto indicou que os epitopos imunodominantes estavam restritos ao fragmento de 33 kDa da molécula. Curiosamente, não observamos uma resposta perceptível quando a proteína MSP1₃₃ foi utilizada como imunógeno. Por outro lado, foi possível detectar células T produtoras de IFN- γ em animais imunizados com a proteína MSP1₁₉ quando as células foram pulsadas com a mesma proteína. Além disso, verificamos que as células T CD4⁺ induzidas pela imunização com o mAb α DEC-

MSP1₄₂ foram capazes de produzir diferentes combinações de três citocinas inflamatórias (IFN γ , IL-2 e TNF α) e proliferaram quando pulsadas com a proteína recombinante MSP1₃₃. Estes resultados mostraram que a presença de epítomos imunodominantes no fragmento de 33 kDa de MSP1 ativam células T CD4⁺ polifuncionais e a resposta de anticorpos anti-MSP1₁₉. Em camundongos B10.A, foi possível detectar uma resposta específica contra o epítomo DYDVVYLKPLAGMYK previamente definido (148), mas mais epítomos estão provavelmente presentes na sequência MSP1₃₃, uma vez que esta resposta foi mais fraca do que a observada quando as células foram pulsadas com a MSP1₃₃ recombinante. Para mapear completamente os epítomos imunodominantes, serão necessários experimentos adicionais utilizando bibliotecas de peptídeos. A indução da proliferação de células T CD4⁺ e produção de citocinas após imunização com um mAb α DEC205 híbrido na presença de poly (I: C) foi relatada anteriormente por Trumpfheller e cols (53). A utilização do mAb α DEC205 fusionado a uma proteína de HIV induziu principalmente células T CD4⁺ que proliferaram e produziram as três citocinas inflamatórias (IFN γ , IL-2 e TNF α). Em nosso caso, detectamos células T CD4⁺ que proliferaram vigorosamente após pulso com a MSP1₃₃ recombinante e foram capazes de produzir não só três citocinas simultaneamente, mas também duas ou uma. Por outro lado, a imunização com o mAb α DEC-MSP1₁₉ ou com as proteínas recombinantes foi extremamente ineficiente na indução quer de proliferação quer de produção de citocinas. Estes resultados reforçam a importância da escolha do antígeno quando se direciona para o receptor DEC205 na superfície de DCs CD8⁺.

Vale ressaltar que, ao contrário de outros resultados anteriormente relatados na literatura (51, 52, 153, 156, 157), nós não detectamos a proliferação de células T CD8⁺ ou a produção de citocinas quando a MSP1₄₂ ou MSP1₁₉ foram direcionadas para as DCs DEC205⁺. A explicação mais simples pode ser que a sequência da MSP1₄₂ de *P. vivax* não contenha epítomos de células T CD8⁺ ou que esses epítomos não sejam reconhecidos pelos haplótipos dos animais C57BL/6 e B10.A. Não foi possível encontrar na literatura quaisquer relatos anteriores que tenham mapeado epítomos de células T CD8⁺ tanto na MSP1₄₂ de *P. vivax* quanto na MSP1₁₉. No entanto, encontramos um relato que descrevia epítomos de células T CD8⁺ na sequência da proteína MSP1₄₂ de *P. yoelii*. No entanto, é importante mencionar que as sequências de aminoácidos

das proteínas MSP1 de *P. vivax* e *P. yoelii* são bastante distintas e que as células T CD8⁺ foram detectadas em camundongos BALB/c após a imunização com um adenovírus recombinante. Além disso, as células T CD8⁺ foram detectadas após o pulso dos esplenócitos com pools de peptídeos (147). De fato, quase todas as vezes que células T CD8⁺ foram detectadas após o direcionamento do antígeno para DCs DEC205⁺, a detecção foi medida utilizando bibliotecas de peptídeos sobrepostos ou peptídeos previamente descritos também células T CD8⁺ previamente enriquecidas (51, 52, 156, 157). Neste trabalho, não usamos bibliotecas de peptídeos sobrepostos ou enriquecimento de células T CD8⁺. Em vez disso, os esplenócitos foram pulsados diretamente com as proteínas recombinantes. A ausência de detecção de células T CD8⁺ pode também ter a ver com o momento da análise. Aqui analisamos as respostas imunes celulares no dia 20 após o reforço, enquanto que outros grupos normalmente analisam as respostas das células T em tempos mais curtos (165). Numa tentativa de maximizar a nossa janela de detecção, analisamos os animais no dia 5 após o reforço e ainda não conseguimos detectar a proliferação de células T CD8⁺ ou a produção de citocinas (dados não apresentados). No entanto, ainda não podemos descartar a possibilidade de ativação de células T CD8⁺ porque não enriquecemos as células T ou usamos bibliotecas de peptídeos. Na verdade, planejamos explorar essas possibilidades no futuro.

Finalmente, é importante ressaltar que a MSP1₄₂ é um antígeno expresso durante a fase eritrocitária do ciclo de vida de *Plasmodium*, e evidências apontam para um papel de anticorpos e células T CD4⁺ na proteção, enquanto que células T CD8⁺ teriam um papel mais pronunciado durante a fase pré-eritrocítica, antes que os parasitas alcancem o sangue.

Analisados em conjunto, os nossos resultados mostram que a escolha do antígeno pode ser importante na concepção de vacinas direcionadas para o subtipos de DCs DEC205⁺.

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados nos permitem concluir que:

- ✓ A produção dos mAbs quiméricos em fusão com as proteínas MSP1₄₂ e MSP1₁₉ foi realizada com sucesso. Os anticorpos se mantiveram íntegros e sua capacidade de ligação específica ao receptor DEC205 foi preservada;
- ✓ O direcionamento da proteína MSP1₄₂ para as células dendríticas DEC205⁺ induziu uma forte resposta humoral anti-MSP1₁₉ nas duas linhagens imunizadas;
- ✓ Em camundongos C57BL/6, demonstramos que esta resposta foi dependente de linfócitos T CD4⁺ pois, na ausência destas células, quase não detectamos uma resposta de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉.
- ✓ Animais imunizados com o anticorpo α DEC-MSP1₄₂ produziram diferentes subclasses de IgGs. Além disso, a resposta humoral parece ter padrão Th1.
- ✓ Células de animais C57BL/6 e B10.A imunizados com α DEC-MSP1₄₂ foram capazes de produzir três citocinas inflamatórias e de proliferar frente ao reestímulo a proteína MSP1₃₃.

Referências*

Referência*

1. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med.* 1974 Jun 1;139(6):1431-45. PubMed PMID: 4598015. Pubmed Central PMCID: 2139680.
2. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine.* 1973;137(5):1142-62.
3. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology.* 2013;31:563-604. PubMed PMID: 23516985. Pubmed Central PMCID: 3853342.
4. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(6673):245-52.
5. Steinman RM. The dendritic cell advantage: New focus for immune-based therapies. *Drug news & perspectives.* 2000 Dec;13(10):581-6. PubMed PMID: 12879129.
6. Inaba K, Koide S, Steinman RM. Properties of memory T lymphocytes isolated from the mixed leukocyte reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1985 Nov;82(22):7686-90. PubMed PMID: 2933743. Pubmed Central PMCID: 391398.
7. Nussenzweig MC, Steinman RM. Contribution of dendritic cells to stimulation of the murine syngeneic mixed leukocyte reaction. *J Exp Med.* 1980 May 1;151(5):1196-212. PubMed PMID: 6445399. Pubmed Central PMCID: 2185855.
8. Nussenzweig MC, Steinman RM, Gutchinov B, Cohn ZA. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1980;152(4):1070-84.
9. 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. PubMed PMID: 12486105.
10. Brouckema T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *The Journal of experimental medicine.* 1997;185(3):541-50.

11. Bonasio R, Scimone ML, Schaerli P, Grabie N, Lichtman AH, von Andrian UH. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nature immunology*. 2006;7(10):1092-100.
12. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/Cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86(6):973-83.
13. Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, et al. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med*. 1994 Nov 1;180(5):1849-60. PubMed PMID: 7525841. Pubmed Central PMCID: 2191729.
14. Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, et al. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *European journal of immunology*. 1999 May;29(5):1617-25. PubMed PMID: 10359116.
15. Edwards AD, Manickasingham SP, Sporri R, Diebold SS, Schulz O, Sher A, et al. Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *Journal of immunology*. 2002 Oct 1;169(7):3652-60. PubMed PMID: 12244157.
16. Dalod M, Salazar-Mather TP, Malmgaard L, Lewis C, Asselin-Paturel C, Briere F, et al. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med*. 2002 Feb 18;195(4):517-28. PubMed PMID: 11854364. Pubmed Central PMCID: 2193614.
17. Bursch LS, Wang L, Igyarto B, Kissenpfennig A, Malissen B, Kaplan DH, et al. Identification of a novel population of Langerin⁺ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(13):3147-56.
18. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C, Yamazaki S, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science (New York, NY)*. 2007;315(5808):107-11.
19. Naik SH, Metcalf D, van Nieuwenhuijze A, Wicks I, Wu L, O'Keeffe M, et al. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nature immunology*. 2006;7(6):663-71.
20. Diao J, Winter E, Cantin C, Chen W, Xu L, Kelvin D, et al. In situ replication of immediate dendritic cell (DC) precursors contributes to conventional DC homeostasis in lymphoid tissue. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(12):7196-206.
21. Nakano H, Yanagita M, Gunn MD. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(8):1171-8.
22. Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, et al. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nature immunology*. 2001;2(12):1144-50.

23. O'Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, Caminschi I, Miller JL, Anders EM, et al. Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(10):1307-19.
24. Schlecht G, Garcia S, Escriou N, Freitas AA, Leclerc C, Dadaglio G. Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8⁺ T-cell responses in vivo after viral stimulation. *Blood*. 2004;104(6):1808-15.
25. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(7):543-55.
26. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jul 13;12(8):557-69. PubMed PMID: 22790179.
27. Forster R, Braun A, Worbs T. Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends in immunology*. 2012 Jun;33(6):271-80. PubMed PMID: 22459312.
28. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52. PubMed PMID: 9521319.
29. del Rio ML, Bernhardt G, Rodriguez-Barbosa JI, Forster R. Development and functional specialization of CD103⁺ dendritic cells. *Immunological reviews*. 2010 Mar;234(1):268-81. PubMed PMID: 20193025.
30. Ginhoux F, Liu K, Helft J, Bogunovic M, Greter M, Hashimoto D, et al. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103⁺ DCs. *J Exp Med*. 2009 Dec 21;206(13):3115-30. PubMed PMID: 20008528. Pubmed Central PMCID: 2806447.
31. Langlet C, Tamoutounour S, Henri S, Luche H, Ardouin L, Gregoire C, et al. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *Journal of immunology*. 2012 Feb 15;188(4):1751-60. PubMed PMID: 22262658.
32. Schulz O, Jaensson E, Persson EK, Liu X, Worbs T, Agace WW, et al. Intestinal CD103⁺, but not CX3CR1⁺, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med*. 2009 Dec 21;206(13):3101-14. PubMed PMID: 20008524. Pubmed Central PMCID: 2806467.
33. Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12):935-47. PubMed PMID: 19029989.
34. Ginhoux F, Merad M. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunology and cell biology*. 2010 May-Jun;88(4):387-92. PubMed PMID: 20309014.
35. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol*. 2005 Aug;5(8):617-28. PubMed PMID: 16056255.
36. Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M, Abel M, Leboeuf M, Helft J, et al. Blood-derived dermal langerin⁺ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med*. 2007 Dec 24;204(13):3133-46. PubMed PMID: 18086862. Pubmed Central PMCID: 2150983.

37. Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annual review of immunology*. 2008;26:293-316. PubMed PMID: 18045026.
38. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):279-88. PubMed PMID: 15308107.
39. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jun;6(6):476-83. PubMed PMID: 16691244.
40. Iwasaki A. Mucosal dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2007;25:381-418. PubMed PMID: 17378762.
41. Belz GT, Behrens GMN, Smith CM, Miller JFAP, Jones C, Lejon K, et al. The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(8):1099-104.
42. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(12):1685-96.
43. Vu Manh TP, Bertho N, Hosmalin A, Schwartz-Cornil I, Dalod M. Investigating Evolutionary Conservation of Dendritic Cell Subset Identity and Functions. *Frontiers in immunology*. 2015;6:260. PubMed PMID: 26082777. Pubmed Central PMCID: 4451681.
44. Idoyaga J, Suda N, Suda K, Park CG, Steinman RM. Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8alpha+ dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(5):1524-9.
45. Amorim KN, Chagas DC, Sulczewski FB, Boscardin SB. Dendritic Cells and Their Multiple Roles during Malaria Infection. *Journal of immunology research*. 2016;2016:2926436. PubMed PMID: 27110574. Pubmed Central PMCID: 4823477.
46. Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol*. 2002 Feb;2(2):77-84. PubMed PMID: 11910898.
47. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan;8(1):34-47. PubMed PMID: 18064051.
48. 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. PubMed PMID: 7753172. Epub 1995/05/11. eng.
49. 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. PubMed PMID: 11062267.
50. 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. PubMed PMID: 11560993.

51. 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. PubMed PMID: 16505139. Epub 2006/03/01. eng.
52. 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. PubMed PMID: 16505141. Pubmed Central PMCID: 2118242.
53. Trumpfheller C, Caskey M, Nchinda G, Longhi MP, Mizenina O, Huang Y, et al. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Feb 19;105(7):2574-9. PubMed PMID: 18256187. Pubmed Central PMCID: 2268178.
54. Nchinda G, Kuroiwa J, Oks M, Trumpfheller C, Park CG, Huang Y, et al. The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells. *J Clin Invest*. 2008 Apr;118(4):1427-36. PubMed PMID: 18324335. Epub 2008/03/08. eng.
55. Do Y, Koh H, Park CG, Dudziak D, Seo P, Mehandru S, et al. Targeting of LcrV virulence protein from *Yersinia pestis* to dendritic cells protects mice against pneumonic plague. *European journal of immunology*. 2010 Oct;40(10):2791-6. PubMed PMID: 20812236.
56. Charalambous A, Oks M, Nchinda G, Yamazaki S, Steinman RM. Dendritic cell targeting of survivin protein in a xenogeneic form elicits strong CD4+ T cell immunity to mouse survivin. *Journal of immunology*. 2006 Dec 15;177(12):8410-21. PubMed PMID: 17142738.
57. Tewari K, Flynn BJ, Boscardin SB, Kastenmueller K, Salazar AM, Anderson CA, et al. Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4+ T cell responses to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP) and alphaDEC-CSP in non human primates. *Vaccine*. 2010 Oct 21;28(45):7256-66. PubMed PMID: 20846528. Pubmed Central PMCID: 3004225.
58. Bozzacco L, Trumpfheller C, Siegal FP, Mehandru S, Markowitz M, Carrington M, et al. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007 Jan 23;104(4):1289-94. PubMed PMID: 17229838. Pubmed Central PMCID: 1783096.
59. Gurer C, Strowig T, Brilot F, Pack M, Trumpfheller C, Arrey F, et al. Targeting the nuclear antigen 1 of Epstein-Barr virus to the human endocytic receptor DEC-205 stimulates protective T-cell responses. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1231-9. PubMed PMID: 18519810. Epub 2008/06/04. eng.
60. Tsuji T, Matsuzaki J, Kelly MP, Ramakrishna V, Vitale L, He LZ, et al. Antibody-targeted NY-ESO-1 to mannose receptor or DEC-205 in vitro elicits dual human CD8+ and CD4+ T cell responses with broad antigen specificity. *Journal of immunology*. 2011 Jan 15;186(2):1218-27. PubMed PMID: 21149605.
61. Henriques HR, Rampazo EV, Goncalves AJ, Vicentin EC, Amorim JH, Panatieri RH, et al. Targeting the non-structural protein 1 from dengue virus to a dendritic cell population confers

protective immunity to lethal virus challenge. PLoS neglected tropical diseases. 2013;7(7):e2330. PubMed PMID: 23875054. Pubmed Central PMCID: 3715404.

62. Rampazo EV, Amorim KN, Yamamoto MM, Panatieri RH, Rodrigues MM, Boscardin SB. Antigen targeting to dendritic cells allows the identification of a CD4 T-cell epitope within an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. PLoS one. 2015;10(2):e0117778. PubMed PMID: 25679777. Pubmed Central PMCID: 4332658.

63. Millar SB, Cox-Singh J. Human infections with *Plasmodium knowlesi*--zoonotic malaria. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2015 Jul;21(7):640-8. PubMed PMID: 25843504.

64. Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. Clinical microbiology reviews. 2013 Apr;26(2):165-84. PubMed PMID: 23554413. Pubmed Central PMCID: 3623376.

65. WHO. World Malaria Report 2011. Geneva: WHO, 2011.

66. Cox FEG. History of human parasitology. 2002. p. 595-612.

67. Harper K, Armelagos G. The changing disease-scape in the third epidemiological transition. 2010. p. 675-97.

68. Brown PJ. Malaria and Rome: A History of Malaria in Ancient Italy (review). 2004. p. 208-10.

69. World Health O. World Malaria Report 2015. 2015 9789241565158.

70. Barata RC. [Malaria in Brazil: trends in the last ten years]. Cadernos de saude publica. 1995 Jan-Mar;11(1):128-36. PubMed PMID: 14528364. Malaria no Brasil: panorama epidemiologico na ultima decada.

71. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. Malaria journal. 2010;9:115. PubMed PMID: 20433744. Pubmed Central PMCID: 2891813.

72. Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. Nature. 2008 Oct 9;455(7214):757-63. PubMed PMID: 18843361. Pubmed Central PMCID: 2651158.

73. Cowman AF, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. J Cell Biol. 2012 Sep 17;198(6):961-71. PubMed PMID: 22986493. Pubmed Central PMCID: 3444787.

74. Yamauchi Lucy M LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. Cellular Microbiology. 2007;9(5):1215-22.

75. Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. Nature medicine. 2006;12(2):220-4.

76. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science (New York, NY)*. 2006;313(5791):1287-90.
77. Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases*. 2009;9(9):555-66.
78. Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, Marsh K. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nature medicine*. 1998;4(3):358-60.
79. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(3):169-80.
80. Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, Bangs MJ, Basri H, et al. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991;45(1):65-76.
81. Egan AF, Morris J, Barnish G, Allen S, Greenwood BM, Kaslow DC, et al. Clinical Immunity to *Plasmodium falciparum* Malaria Is Associated with Serum Antibodies to the 19-kDa C-Terminal Fragment of the Merozoite Surface Antigen, PfMSP-I. *Journal of Infectious Diseases*. 1996;173(3):765-8.
82. Webster D, Hill AVS. Progress with new malaria vaccines. 2003. p. 902-9.
83. Hogg B, Marbiah NT, Burghaus Pa, Andersen PK. Relationship between maternally derived anti-*Plasmodium falciparum* antibodies and risk of infection and disease in infants living in an area of Liberia, West Africa, in which malaria is highly endemic. *Infection and Immunity*. 1995;63(10):4034-8.
84. Good MF. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. 2005. p. 29-34.
85. Garraud O, Perraut R, Gysin J, Behr C, Dubois P, Bonnemains B, et al. Manipulating blood T cells and B cells from squirrel monkeys: some technical considerations. *J Immunol Methods*. 1994;173(2):165-73.
86. Lunel F, Druilhe P. Effector cells involved in nonspecific and antibody-dependent mechanisms directed against *Plasmodium falciparum* blood stages in vitro. *Infection and Immunity*. 1989;57(7):2043-9.
87. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med*. 2005 Jan 3;201(1):19-25. PubMed PMID: 15630134. Pubmed Central PMCID: 2212757.
88. 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. *Journal of immunology*. 2002 Sep 15;169(6):2956-63. PubMed PMID: 12218109.

89. Hensmann M, Kwiatkowski D. Cellular basis of early cytokine response to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 2001 Apr;69(4):2364-71. PubMed PMID: 11254594. Pubmed Central PMCID: 98166.
90. Serghides L, Smith TG, Patel SN, Kain KC. CD36 and malaria: Friends or foes? 2003. p. 461-9.
91. Nebl T, De Veer MJ, Schofield L. Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors. *Parasitology*. 2005;130 Suppl:S45-S62.
92. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(6):1919-24.
93. Walther M, Jeffries D, Finney OC, Njie M, Ebonyi A, Deininger S, et al. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS pathogens*. 2009;5(4).
94. Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1990;172(6):1633-41.
95. Stanisie DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, et al. Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. 2009. p. 1165-74.
96. Lazarou M, Guevara Patiño JA, Jennings RM, McIntosh RS, Shi J, Howell S, et al. Inhibition of erythrocyte invasion and *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 processing by human immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies. *Infection and Immunity*. 2009;77(12):5659-67.
97. Inoue SI, Niikura M, Mineo S, Kobayashi F. Roles of IFN- γ and $\gamma\delta$ T cells in protective immunity against blood-stage malaria. *Frontiers in immunology*. 2013.
98. Weiss WR, Sedegah M, Beaudoin RL, Miller LH, Good MF. CD8⁺ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(2):573-6.
99. Weiss WR, Jiang CG. Protective CD8⁺ T lymphocytes in primates immunized with malaria sporozoites. *PloS one*. 2012;7(2).
100. Overstreet MG, Chen YC, Cockburn IA, Tse SW, Zavala F. CD4⁺ T cells modulate expansion and survival but not functional properties of effector and memory CD8⁺ T cells induced by malaria sporozoites. *PloS one*. 2011;6(1):e15948. PubMed PMID: 21245909. Pubmed Central PMCID: 3014941.

101. Rodrigues EG, Claassen J, Lee S, Wilson JM, Nussenzweig RS, Tsuji M. Interferon-gamma-independent CD8+ T cell-mediated protective anti- malaria immunity elicited by recombinant adenovirus. *Parasite Immunol.* 2000;22(3):157-60.
102. Tsuji M. A retrospective evaluation of the role of T cells in the development of malaria vaccine. *Experimental Parasitology.* 2010;126(3):421-5.
103. Wizel B, Houghten RA, Parker KC, Coligan JE, Church P, Gordon DM, et al. Irradiated sporozoite vaccine induces HLA-B8-restricted cytotoxic T lymphocyte responses against two overlapping epitopes of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. *The Journal of experimental medicine.* 1995;182(5):1435-45.
104. Butler NS, Schmidt NW, Harty JT. Differential effector pathways regulate memory CD8 T cell immunity against *Plasmodium berghei* versus *P. yoelii* sporozoites. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2010;184(5):2528-38.
105. Kern P, Hemmer CJ, Van Damme J, Gruss HJ, Dietrich M. Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *The American journal of medicine.* 1989;87(2):139-43.
106. De Souza JB, Williamson KH, Otani T, Playfair JHL. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood- stage malaria. *Infection and Immunity.* 1997;65(5):1593-8.
107. Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: Immunity, immunoregulation and immunopathology. 2003. p. 145-52.
108. Wykes M, Good MF. A case for whole-parasite malaria vaccines. *International Journal for Parasitology.* 2007;37(7):705-12.
109. Hansen DS, Schofield L. Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies? 2010.
110. Langhorne J, Albano FR, Hensmann M, Sanni L, Cadman E, Voisine C, et al. Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. 2004. p. 35-47.
111. Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *plasmodium berghei*. *Nature.* 1967 Oct 14;216(5111):160-2. PubMed PMID: 6057225.
112. Clyde DF. Immunization of man against *falciparum* and *vivax* malaria by use of attenuated sporozoites. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1975 May;24(3):397-401. PubMed PMID: 808142.
113. Rieckmann KH, Carson PE, Beaudoin RL, Cassells JS, Sell KW. Letter: Sporozoite induced immunity in man against an Ethiopian strain of *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1974;68(3):258-9. PubMed PMID: 4608063.
114. WHO. World Malaria Report 2015. 2015. p. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/en/>.

115. Valencia SH, Rodriguez DC, Acero DL, Ocampo V, Arevalo-Herrera M. Platform for *Plasmodium vivax* vaccine discovery and development. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106 Suppl 1:179-92. PubMed PMID: 21881773. Pubmed Central PMCID: 4832982.
116. White NJ, Imwong M. Relapse. *Advances in parasitology*. 2012;80:113-50. PubMed PMID: 23199487.
117. Alonso PL. Malaria: deploying a candidate vaccine (RTS,S/AS02A) for an old scourge of humankind. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*. 2006 Jun;9(2):83-93. PubMed PMID: 16835838.
118. Bennett JW, Yadava A, Tosh D, Sattabongkot J, Komisar J, Ware LA, et al. Phase 1/2a Trial of *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016 Feb;10(2):e0004423. PubMed PMID: 26919472. Pubmed Central PMCID: 4769081.
119. Fraser TS, Kappe SH, Narum DL, VanBuskirk KM, Adams JH. Erythrocyte-binding activity of *Plasmodium yoelii* apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. *Molecular and biochemical parasitology*. 2001 Sep 28;117(1):49-59. PubMed PMID: 11551631.
120. Karunaweera ND, Wijesekera SK, Wanasekera D, Mendis KN, Carter R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends in parasitology*. 2003 Apr;19(4):188-93. PubMed PMID: 12689650.
121. Grimberg BT, Udomsangpetch R, Xainli J, McHenry A, Panichakul T, Sattabongkot J, et al. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. *PLoS medicine*. 2007 Dec;4(12):e337. PubMed PMID: 18092885. Pubmed Central PMCID: 2140086.
122. King CL, Michon P, Shakri AR, Marcotty A, Stanisic D, Zimmerman PA, et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Jun 17;105(24):8363-8. PubMed PMID: 18523022. Pubmed Central PMCID: 2448842.
123. Moreno A, Caro-Aguilar I, Yazdani SS, Shakri AR, Lapp S, Strobert E, et al. Preclinical assessment of the receptor-binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein as a vaccine candidate in rhesus macaques. *Vaccine*. 2008 Aug 12;26(34):4338-44. PubMed PMID: 18573299. Pubmed Central PMCID: 2532489.
124. Pizarro JC, Vulliez-Le Normand B, Chesne-Seck ML, Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F, et al. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science*. 2005 Apr 15;308(5720):408-11. PubMed PMID: 15731407.
125. Bouillet LE, Dias MO, Dorigo NA, Moura AD, Russell B, Nosten F, et al. Long-term humoral and cellular immune responses elicited by a heterologous *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 protein prime/adenovirus boost immunization protocol. *Infect Immun*. 2011 Sep;79(9):3642-52. PubMed PMID: 21730090. Pubmed Central PMCID: 3165491.
126. Riley EM, Allen SJ, Wheeler JG, Blackman MJ, Bennett S, Takacs B, et al. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen

(PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunol.* 1992 May;14(3):321-37. PubMed PMID: 1625908.

127. 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. *The Journal of experimental medicine.* 1990;172(1):379-82.

128. Koussis K, Withers-Martinez C, Yeoh S, Child M, Hackett F, Knuepfer E, et al. A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. *The EMBO journal.* 2009 Mar 18;28(6):725-35. PubMed PMID: 19214190. Pubmed Central PMCID: 2647770.

129. 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. PubMed PMID: 7516416. Pubmed Central PMCID: 2191569.

130. 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. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1992;87 Suppl 3:37-42. PubMed PMID: 1343716.

131. Holder AA. The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria. *Parasitology.* 2009 Oct;136(12):1445-56. PubMed PMID: 19627632.

132. del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991 May 1;88(9):4030-4. PubMed PMID: 2023952. Pubmed Central PMCID: 51587.

133. Valderrama-Aguirre A, Quintero G, Gomez A, Castellanos A, Perez Y, Mendez F, et al. Antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of *Plasmodium vivax* MSP1 PV200I: a potential malaria vaccine subunit. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2005 Nov;73(5 Suppl):16-24. PubMed PMID: 16291762.

134. Blackman MJ, Whittle H, Holder AA. Processing of the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein-1: identification of a 33-kilodalton secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion. *Molecular and biochemical parasitology.* 1991 Nov;49(1):35-44. PubMed PMID: 1723148. Epub 1991/11/01. eng.

135. al-Yaman F, Genton B, Kramer KJ, Chang SP, Hui GS, Baisor M, et al. Assessment of the role of naturally acquired antibody levels to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in protecting Papua New Guinean children from malaria morbidity. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1996 May;54(5):443-8. PubMed PMID: 8644896. Epub 1996/05/01. eng.

136. Egan AF, Morris J, Barnish G, Allen S, Greenwood BM, Kaslow DC, et al. Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. *J Infect Dis.* 1996 Mar;173(3):765-9. PubMed PMID: 8627050. Epub 1996/03/01. eng.

137. Perraut R, Marrama L, Diouf B, Sokhna C, Tall A, Nabeth P, et al. Antibodies to the conserved C-terminal domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 and to the merozoite extract and their relationship with in vitro inhibitory antibodies and protection against clinical malaria in a Senegalese village. *J Infect Dis.* 2005 Jan 15;191(2):264-71. PubMed PMID: 15609237. Epub 2004/12/21. eng.
138. Egan AF, Burghaus P, Druilhe P, Holder AA, Riley EM. Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro. *Parasite Immunol.* 1999 Mar;21(3):133-9. PubMed PMID: 10205793. Epub 1999/04/17. eng.
139. Daly TM, Long CA. Humoral response to a carboxyl-terminal region of the merozoite surface protein-1 plays a predominant role in controlling blood-stage infection in rodent malaria. *Journal of immunology.* 1995 Jul 1;155(1):236-43. PubMed PMID: 7602100. Epub 1995/07/01. eng.
140. Eslava I, Payares G, Pernia BM, Holder AA, Spencer LM. Suppressive and additive effects in protection mediated by combinations of monoclonal antibodies specific for merozoite surface protein 1 of *Plasmodium yoelii*. *Malaria journal.* 2010;9:46. PubMed PMID: 20146804. Epub 2010/02/12. eng.
141. Spencer Valero LM, Ogun SA, Fleck SL, Ling IT, Scott-Finnigan TJ, Blackman MJ, et al. Passive immunization with antibodies against three distinct epitopes on *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 1 suppresses parasitemia. *Infect Immun.* 1998 Aug;66(8):3925-30. PubMed PMID: 9673281. Epub 1998/07/23. eng.
142. Malhotra I, Wamachi AN, Mungai PL, Mzungu E, Koech D, Muchiri E, et al. Fine specificity of neonatal lymphocytes to an abundant malaria blood-stage antigen: epitope mapping of *Plasmodium falciparum* MSP1(33). *Journal of immunology.* 2008 Mar 1;180(5):3383-90. PubMed PMID: 18292564. Epub 2008/02/23. eng.
143. Udhayakumar V, Anyona D, Kariuki S, Shi YP, Bloland PB, Branch OH, et al. Identification of T and B cell epitopes recognized by humans in the C-terminal 42-kDa domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein (MSP)-1. *Journal of immunology.* 1995 Jun 1;154(11):6022-30. PubMed PMID: 7538540. Epub 1995/06/01. eng.
144. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature.* 1985 Apr 11;314(6011):537-9. PubMed PMID: 3157869. Epub 1985/04/11. eng.
145. Hui G, Hashimoto C. *Plasmodium falciparum* anti-MSP1-19 antibodies induced by MSP1-42 and MSP1-19 based vaccines differed in specificity and parasite growth inhibition in terms of recognition of conserved versus variant epitopes. *Vaccine.* 2007 Jan 15;25(5):948-56. PubMed PMID: 17023096. Epub 2006/10/07. eng.
146. Yuen D, Leung WH, Cheung R, Hashimoto C, Ng SF, Ho W, et al. Antigenicity and immunogenicity of the N-terminal 33-kDa processing fragment of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1, MSP1: implications for vaccine development. *Vaccine.* 2007 Jan 5;25(3):490-9. PubMed PMID: 16949181. Epub 2006/09/05. eng.
147. Draper SJ, Goodman AL, Biswas S, Forbes EK, Moore AC, Gilbert SC, et al. Recombinant viral vaccines expressing merozoite surface protein-1 induce antibody- and T cell-mediated

multistage protection against malaria. *Cell host & microbe*. 2009 Jan 22;5(1):95-105. PubMed PMID: 19154991. Pubmed Central PMCID: 2663714.

148. 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. PubMed PMID: 16797207. Epub 2006/06/27. eng.

149. Goodman AL, Epp C, Moss D, Holder AA, Wilson JM, Gao GP, et al. New candidate vaccines against blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria: prime-boost immunization regimens incorporating human and simian adenoviral vectors and poxviral vectors expressing an optimized antigen based on merozoite surface protein 1. *Infect Immun*. 2010 Nov;78(11):4601-12. PubMed PMID: 20713623. Pubmed Central PMCID: 2976338.

150. Pusic K, Clements D, Kobuch S, Hui G. Antibody and T cell responses in reciprocal prime-boost studies with full-length and truncated merozoite surface protein 1-42 vaccines. *PloS one*. 2013;8(9):e75939. PubMed PMID: 24098747. Pubmed Central PMCID: 3786974.

151. Prince HE, Wilson M. Simplified assay for measuring *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2001 Sep;8(5):904-8. PubMed PMID: 11527801. Pubmed Central PMCID: 96169.

152. Mohan K, Moulin P, Stevenson MM. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Journal of immunology*. 1997 Nov 15;159(10):4990-8. PubMed PMID: 9366426.

153. Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med*. 2004 Mar 15;199(6):815-24. PubMed PMID: 15024047.

154. 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. PubMed PMID: 17204652.

155. Wang B, Zaidi N, He LZ, Zhang L, Kuroiwa JM, Keler T, et al. Targeting of the non-mutated tumor antigen HER2/neu to mature dendritic cells induces an integrated immune response that protects against breast cancer in mice. *Breast Cancer Res*. 2012;14(2):R39. PubMed PMID: 22397502. Epub 2012/03/09. eng.

156. Mahnke K, Qian Y, Fondel S, Brueck J, Becker C, Enk AH. Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice. *Cancer Res*. 2005 Aug 1;65(15):7007-12. PubMed PMID: 16061687. Epub 2005/08/03. eng.

157. Idoyaga J, Lubkin A, Fiorese C, Lahoud MH, Caminschi I, Huang Y, et al. Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 8;108(6):2384-9. PubMed PMID: 21262813. Epub 2011/01/26. eng.

158. 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. PubMed PMID: 18081041. Epub 2007/12/18. eng.

159. Lahoud MH, Ahmet F, Kitsoulis S, Wan SS, Vremec D, Lee CN, et al. Targeting antigen to mouse dendritic cells via Clec9A induces potent CD4 T cell responses biased toward a follicular helper phenotype. *Journal of immunology*. 2011 Jul 15;187(2):842-50. PubMed PMID: 21677141. Epub 2011/06/17. eng.
160. Blackman MJ, Holder AA. Use of a recombinant baculovirus product to measure naturally-acquired human antibodies to disulphide-constrained epitopes on the *P. falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1). *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1993 Apr;6(4):307-15. PubMed PMID: 7684635.
161. Soares IS, Levitus G, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infect Immun*. 1997 May;65(5):1606-14. PubMed PMID: 9125537. Epub 1997/05/01. eng.
162. Shi YP, Sayed U, Qari SH, Roberts JM, Udhayakumar V, Oloo AJ, et al. Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Infect Immun*. 1996 Jul;64(7):2716-23. PubMed PMID: 8698500. Pubmed Central PMCID: PMC174131.
163. Longhi MP, Trumpfheller C, Idoyaga J, Caskey M, Matos I, Kluger C, et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J Exp Med*. 2009 Jul 6;206(7):1589-602. PubMed PMID: 19564349. Epub 2009/07/01. eng.
164. Stavnezer J. Molecular processes that regulate class switching. *Current topics in microbiology and immunology*. 2000;245(2):127-68. PubMed PMID: 10533321.
165. Iwai Y, Hemmi H, Mizenina O, Kuroda S, Suda K, Steinman RM. An IFN-gamma-IL-18 signaling loop accelerates memory CD8+ T cell proliferation. *PLoS One*. 2008;3(6):e2404. PubMed PMID: 18545704. Pubmed Central PMCID: PMC2408965.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

APÊNDICES

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

The presence of T cell epitopes is important for induction of antibody responses against antigens directed to DEC205⁺ dendritic cells

Received: 02 October 2015

Accepted: 22 November 2016

Published: xx xx xxxx

Kelly N. S. Amorim¹, Eline V. Rampazo¹, Renan Antonialli¹, Marcio M. Yamamoto¹,
Maurício M. Rodrigues^{2,3}, Irene S. Soares^{3,4} & Silvia B. Boscardin^{1,3}

In vivo antigen targeting to dendritic cells (DCs) has been used as a way to improve immune responses. Targeting is accomplished with the use of monoclonal antibodies (mAbs) to receptors present on the DC surface fused with the antigen of interest. An anti-DEC205 mAb has been successfully used to target antigens to the DEC205⁺CD8 α ⁺ DC subset. The administration of low doses of the hybrid mAb together with DC maturation stimuli is able to activate specific T cells and induce production of high antibody titres for a number of different antigens. However, it is still not known if this approach would work with any fused protein. Here we genetically fused the α DEC205 mAb with two fragments (42-kDa and 19-kDa) derived from the ~200 kDa *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 (MSP1), known as MSP1₄₂ and MSP1₁₉, respectively. The administration of two doses of α DEC-MSP1₄₂, but not of α DEC-MSP1₁₉ mAb, together with an adjuvant to two mouse strains induced high anti-MSP1₁₉ antibody titres that were dependent on CD4⁺ T cells elicited by peptides present in the MSP1₃₃ sequence, indicating that the presence of T cell epitopes in antigens targeted to DEC205⁺ DCs increases antibody responses.

DCs are an important bridge between innate and adaptive immune responses. They are able to sense infection and inflammation, and efficiently present pathogen-derived epitopes to T cells¹. Once activated, T cells produce cytokines and can help activate antibody producing B cells. In addition, DCs are also able to directly activate B cells to mature and produce high affinity antibodies².

Because of their central role in the induction of immunity, manipulation of DCs is an interesting strategy to induce adaptive immune responses. Among these strategies, the use of mAbs to directly target DCs *in situ* has been tested with success in different models^{3–7}. This is accomplished by the use of mAbs that target different DC surface receptors fused to antigens derived from pathogens, cancer cells, etc.⁸. The C-type lectin DEC205 (CD205) has been used with success to induce both cellular and humoral immune responses^{5,6}. Despite its expression by other cell types as B cells and epithelial cells^{9,10}, the DEC205 expression in DCs is responsible for T cell activation when the antigen is targeted *in vivo* through a hybrid α DEC205 mAb^{11,12}. The use of a DC maturation stimulus together with the hybrid α DEC205 mAb induces long lasting T cell immunity that can even lead to protection in some mouse models of infection^{13,14}. In addition, the induction of specific antibodies against the targeted antigen has also been observed^{5,5}.

In summary, there is extensive data in the literature showing that antigen targeting to DCs through the DEC205 receptor elicits CD4⁺ and CD8⁺ T cell activation as well as antibody responses when the hybrid mAb is administered in the presence of a DC maturation stimulus such as α CD40, polyriboinosinic: polyribocytidylic acid (poly (I:C)) or CpG oligodeoxynucleotides^{3,5,6,13,15}. Among the many antigens delivered to the DEC205⁺ DC subset we can cite the model antigen ovalbumin^{13,16,17}, the tumor antigens survivin¹⁸, HER2/neu¹⁹, NY-ESO-1²⁰ and melanoma TRP2²¹, and different pathogen-derived antigens such as HIV gag^{6,7,15}, *Yersinia pestis* LcrV^{22,23}, and

¹Laboratory of Antigen Targeting to Dendritic Cells, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 05508-000, Brazil. ²CTCMol, Federal University of São Paulo, São Paulo, 04044-010, Brazil. ³National Institute for Science and Technology in Vaccines, Belo Horizonte, 31270-910, Brazil. ⁴Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 05508-900, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.B.B. (email: sbboscardin@usp.br)

Plasmodium yoelii CSP^{5,24}. In all cases, strong CD4⁺ T cell responses were obtained against previously described peptides or against peptides derived from overlapping peptide libraries. CD8⁺ T cell activation was also detected when α DEC205 mAb was fused to ovalbumin, NY-ESO-1, TRP2, HIV gag, or CSP, especially when the CD8⁺ T cells were purified and re-stimulated with single peptides^{5–7,13,21}. However, in some cases, the activation of these cells was not detected^{18,23}. Taken together, these results indicated that all these antigens possessed antigenic epitopes recognized by the immune system.

Although much has been published with the use of different proteins, the choice of the antigen has not been fully explored. Would any antigen be able to induce strong T cell and antibody responses if targeted to the DEC205⁺ DC subpopulation? To start addressing this question, we fused the α DEC205 mAb with two fragments of the merozoite surface protein 1 (MSP1) derived from *Plasmodium vivax*, the most prevalent species that causes human malaria. MSP1 is expressed during the erythrocytic phase of *Plasmodium* life cycle and participates in parasite invasion²⁵. It is expressed as an ~200 kDa precursor on the surface of the merozoite, and undergoes successive proteolytic cleavages generating a 42-kDa fragment (MSP1₄₂) that is further cleaved into two products: a soluble 33-kDa fragment (MSP1₃₃) that corresponds to the N-terminal region of MSP1₄₂ and is shed from the free merozoite surface²⁶, and a membrane-bound 19-kDa C-terminal fragment (MSP1₁₉), which is the only MSP1 fragment carried with the invading merozoite into the new red blood cell²⁷.

Infection with *Plasmodium* sp. leads to the induction of antibodies that bind mainly to the MSP1₁₉ protein^{28–30} while MSP1₄₂ is thought to contain T cell epitopes³¹ that help B cells to produce anti-MSP1₁₉ antibodies^{32,33}. Antibodies and CD4⁺ T cells directed to MSP1 were shown to be associated with protection against malaria in mice^{33–35} and humans³⁶.

To study the differences in terms of antibody induction and T cell activation in the context of DEC205⁺ DC targeting, we delivered MSP1₁₉ or MSP1₄₂ proteins to this subset through two hybrid mAbs, α DEC-MSP1₁₉ and α DEC-MSP1₄₂. Analysis of the immune response induced by immunization with the two hybrid mAbs in the presence of poly (I:C) showed that T cell epitopes are indeed present in the MSP1₃₃ portion of the molecule and that induction of high titres of anti-MSP1₁₉ antibodies is obtained mainly when MSP1₄₂ is targeted to the DEC205⁺ DC population.

Results

The hybrid α DEC mAbs containing MSP1₁₉ or MSP1₄₂ fused proteins were successfully produced and capable of binding to the DEC205 receptor. For the production of α DEC-MSP1₄₂ and α DEC-MSP1₁₉ mAbs, the open reading frames from *msp1₁₉* or *msp1₄₂* genes were cloned in frame with the carboxyl-terminal portion of the heavy chain of the α DEC205 mAb exactly as described in methods and in ref. 14. As a control, we also produced the α DEC205 mAb without any fused antigen. Of note, all our attempts to produce an isotype control fused with the MSP1₄₂ protein failed, as the hybrid mAb came out very degraded (data not shown). After transient transfection, the α DEC hybrid mAbs were purified and their integrity was evaluated by SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions. The recombinant proteins MSP1₁₉ and MSP1₃₃ were also produced and evaluated in the same manner (Fig. 1). A reduced gel showed that the heavy chains of the hybrid mAbs had the expected electrophoretic mobilities (~92 kDa for α DEC-MSP1₄₂, ~69 kDa for α DEC-MSP1₁₉ and ~50 kDa for α DEC, Fig. 1A). All light chains migrated at ~25 kDa. Recombinant (rec.) MSP1₁₉ and MSP1₃₃ proteins migrated at ~19 kDa and ~33 kDa, respectively. The non-reduced gel showed mainly the presence of a single band for each of the mAbs (Fig. 1B).

In an attempt to verify if both hybrid mAbs and recombinant proteins retained antigenicity, a western blot was performed using sera from a *P. vivax* infected patient. Figure 1 shows that the patient's serum recognized the heavy chains (Fig. 1C), or the entire hybrid mAbs (Fig. 1D) containing MSP1₄₂ or MSP1₁₉. Recognition was also observed for the rec. MSP1₁₉ and rec. MSP1₃₃ proteins (Fig. 1C).

To verify if the addition of either MSP1₄₂ or MSP1₁₉ to the α DEC205 mAb altered its binding to the DEC205 receptor, different concentrations (10, 1 and 0.1 μ g/mL) of the α DEC-MSP1₄₂ or α DEC-MSP1₁₉ mAbs were incubated with splenic CD11c⁺CD8 α ⁺ (DCs that express the DEC205 receptor¹⁷) or with CD11c⁺CD8 α ⁻ DCs (Fig. 1E), or with CHO cells expressing either the murine or the human DEC205 receptors (Supplementary Fig. 1). The empty α DEC205 mAb was used as control. All mAbs bound specifically and in a dose dependent manner to the CD11c⁺CD8 α ⁺ DCs in the spleen (Fig. 1E, CD11c⁺CD8 α ⁺ panel) or to CHO cells expressing the murine DEC205 receptor (Supplementary Fig. 1A). No binding was observed to the CD11c⁺CD8 α ⁻ DCs that do not express the DEC205 receptor (Fig. 1E, CD11c⁺CD8 α ⁻ panel) or to CHO cells expressing the human DEC205 (Supplementary Fig. 1B).

Targeting of the MSP1₄₂ protein to the DEC205⁺ DC population increases the anti-MSP1₁₉ antibody response, is dependent on CD4⁺ T cell help and promotes class switch and affinity maturation. In an attempt to study the anti-MSP1₁₉ antibody response elicited when both hybrid mAbs were administered to mice, two different strains were used throughout this study: C57BL/6 (H-2b haplotype) and B10.A (H-2a(k/d) haplotype). Groups of C57BL/6 or B10.A mice received two doses containing 5 μ g of each hybrid mAb or the empty α DEC administered in a 30-day interval in the presence of poly (I:C). Figure 2A shows a schematic representation of the immunization protocol. Five days before or 14 days after the administration of the second dose, mice were bled and anti-MSP1₁₉ or anti-MSP1₃₃ antibody titres were measured by ELISA (Fig. 2B–E). In both mouse strains, the antibody titres against MSP1₁₉ increased after the administration of the second dose (Fig. 2B and C) in mice immunized either with α DEC-MSP1₄₂ or α DEC-MSP1₁₉. No anti-MSP1₁₉ titres were detected in the group immunized with α DEC. Of note was the fact that in both mouse strains, the amount of anti-MSP1₁₉ antibodies induced in mice that received α DEC-MSP1₄₂ mAb was approximately 100x higher than in mice that received α DEC-MSP1₁₉ mAb. As expected, anti-MSP1₃₃ antibodies were only detected in mice immunized with α DEC-MSP1₄₂ (Fig. 2D and E). To compare the anti-MSP1₁₉ antibody response in the

Plasmodium yoelii CSP^{5,24}. In all cases, strong CD4⁺ T cell responses were obtained against previously described peptides or against peptides derived from overlapping peptide libraries. CD8⁺ T cell activation was also detected when α DEC205 mAb was fused to ovalbumin, NY-ESO-1, TRP2, HIV gag, or CSP, especially when the CD8⁺ T cells were purified and re-stimulated with single peptides^{5–7,13,21}. However, in some cases, the activation of these cells was not detected^{18,23}. Taken together, these results indicated that all these antigens possessed antigenic epitopes recognized by the immune system.

Although much has been published with the use of different proteins, the choice of the antigen has not been fully explored. Would any antigen be able to induce strong T cell and antibody responses if targeted to the DEC205⁺ DC subpopulation? To start addressing this question, we fused the α DEC205 mAb with two fragments of the merozoite surface protein 1 (MSP1) derived from *Plasmodium vivax*, the most prevalent species that causes human malaria. MSP1 is expressed during the erythrocytic phase of *Plasmodium* life cycle and participates in parasite invasion²⁵. It is expressed as an ~200 kDa precursor on the surface of the merozoite, and undergoes successive proteolytic cleavages generating a 42-kDa fragment (MSP1₄₂) that is further cleaved into two products: a soluble 33-kDa fragment (MSP1₃₃) that corresponds to the N-terminal region of MSP1₄₂ and is shed from the free merozoite surface²⁶, and a membrane-bound 19-kDa C-terminal fragment (MSP1₁₉), which is the only MSP1 fragment carried with the invading merozoite into the new red blood cell²⁷.

Infection with *Plasmodium* sp. leads to the induction of antibodies that bind mainly to the MSP1₁₉ protein^{28–30} while MSP1₄₂ is thought to contain T cell epitopes³¹ that help B cells to produce anti-MSP1₁₉ antibodies^{32,33}. Antibodies and CD4⁺ T cells directed to MSP1 were shown to be associated with protection against malaria in mice^{33–35} and humans³⁶.

To study the differences in terms of antibody induction and T cell activation in the context of DEC205⁺ DC targeting, we delivered MSP1₁₉ or MSP1₄₂ proteins to this subset through two hybrid mAbs, α DEC-MSP1₄₂ and α DEC-MSP1₁₉. Analysis of the immune response induced by immunization with the two hybrid mAbs in the presence of poly (I:C) showed that T cell epitopes are indeed present in the MSP1₃₃ portion of the molecule and that induction of high titres of anti-MSP1₁₉ antibodies is obtained mainly when MSP1₄₂ is targeted to the DEC205⁺ DC population.

Results

The hybrid α DEC mAbs containing MSP1₁₉ or MSP1₄₂ fused proteins were successfully produced and capable of binding to the DEC205 receptor. For the production of α DEC-MSP1₄₂ and α DEC-MSP1₁₉ mAbs, the open reading frames from *mSP1₁₉* or *mSP1₄₂* genes were cloned in frame with the carboxyl-terminal portion of the heavy chain of the α DEC205 mAb exactly as described in methods and in ref. 14. As a control, we also produced the α DEC205 mAb without any fused antigen. Of note, all our attempts to produce an isotype control fused with the MSP1₄₂ protein failed, as the hybrid mAb came out very degraded (data not shown). After transient transfection, the α DEC hybrid mAbs were purified and their integrity was evaluated by SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions. The recombinant proteins MSP1₁₉ and MSP1₃₃ were also produced and evaluated in the same manner (Fig. 1). A reduced gel showed that the heavy chains of the hybrid mAbs had the expected electrophoretic mobilities (~92 kDa for α DEC-MSP1₄₂, ~69 kDa for α DEC-MSP1₁₉ and ~50 kDa for α DEC, Fig. 1A). All light chains migrated at ~25 kDa. Recombinant (rec.) MSP1₁₉ and MSP1₃₃ proteins migrated at ~19 kDa and ~33 kDa, respectively. The non-reduced gel showed mainly the presence of a single band for each of the mAbs (Fig. 1B).

In an attempt to verify if both hybrid mAbs and recombinant proteins retained antigenicity, a western blot was performed using sera from a *P. vivax* infected patient. Figure 1 shows that the patient's serum recognized the heavy chains (Fig. 1C), or the entire hybrid mAbs (Fig. 1D) containing MSP1₄₂ or MSP1₁₉. Recognition was also observed for the rec. MSP1₁₉ and rec. MSP1₃₃ proteins (Fig. 1C).

To verify if the addition of either MSP1₄₂ or MSP1₁₉ to the α DEC205 mAb altered its binding to the DEC205 receptor, different concentrations (10, 1 and 0.1 μ g/mL) of the α DEC-MSP1₄₂ or α DEC-MSP1₁₉ mAbs were incubated with splenic CD11c⁺CD8 α ⁺ (DCs that express the DEC205 receptor¹⁷) or with CD11c⁺CD8 α [−] DCs (Fig. 1E), or with CHO cells expressing either the murine or the human DEC205 receptors (Supplementary Fig. 1). The empty α DEC205 mAb was used as control. All mAbs bound specifically and in a dose dependent manner to the CD11c⁺CD8 α ⁺ DCs in the spleen (Fig. 1E, CD11c⁺CD8 α ⁺ panel) or to CHO cells expressing the murine DEC205 receptor (Supplementary Fig. 1A). No binding was observed to the CD11c⁺CD8 α [−] DCs that do not express the DEC205 receptor (Fig. 1E, CD11c⁺CD8 α [−] panel) or to CHO cells expressing the human DEC205 (Supplementary Fig. 1B).

Targeting of the MSP1₄₂ protein to the DEC205⁺ DC population increases the anti-MSP1₁₉ antibody response, is dependent on CD4⁺ T cell help and promotes class switch and affinity maturation. In an attempt to study the anti-MSP1₁₉ antibody response elicited when both hybrid mAbs were administered to mice, two different strains were used throughout this study: C57BL/6 (H-2b haplotype) and B10.A (H-2a(k/d) haplotype). Groups of C57BL/6 or B10.A mice received two doses containing 5 μ g of each hybrid mAb or the empty α DEC administered in a 30-day interval in the presence of poly (I:C). Figure 2A shows a schematic representation of the immunization protocol. Five days before or 14 days after the administration of the second dose, mice were bled and anti-MSP1₁₉ or anti-MSP1₃₃ antibody titres were measured by ELISA (Fig. 2B–E). In both mouse strains, the antibody titres against MSP1₁₉ increased after the administration of the second dose (Fig. 2B and C) in mice immunized either with α DEC-MSP1₄₂ or α DEC-MSP1₁₉. No anti-MSP1₁₉ titres were detected in the group immunized with α DEC. Of note was the fact that in both mouse strains, the amount of anti-MSP1₁₉ antibodies induced in mice that received α DEC-MSP1₄₂ mAb was approximately 100x higher than in mice that received α DEC-MSP1₁₉ mAb. As expected, anti-MSP1₃₃ antibodies were only detected in mice immunized with α DEC-MSP1₄₂ (Fig. 2D and E). To compare the anti-MSP1₁₉ antibody response in the

Figure 1. The hybrid α DEC antibodies fused to *P. vivax* MSP1₁₉ and MSP1₄₂ were successfully produced and recognized by serum from a *P. vivax* infected patient, and retained their ability to bind to DCs expressing the DEC205 receptor. Approximately 1 μ g of each hybrid mAb or recombinant protein was separated under reduced (A) and non-reduced (B) conditions. Both gels were stained with Coomassie Blue dye. A western blot under reduced (C) and non-reduced (D) conditions was performed with serum derived from one patient infected with *P. vivax*. The membranes were revealed after incubation with goat anti-human total IgG conjugated to HRP. The hybrid mAbs or recombinant proteins are presented in the following order: (1) α DEC, (2) α DEC-MSP1₁₉, (3) α DEC-MSP1₄₂, (4) recombinant MSP1₁₉ protein, and (5) recombinant MSP1₃₃ protein. Note that the recombinant proteins were not included in the non-reducing gels. The numbers displayed on the left of each gel indicate the molecular weights in kDa that were cropped out of the final figure. (E) Five million splenocytes from C57BL/6 mice were incubated on ice with 10, 1 or 0.1 μ g/mL of the hybrid α DEC-MSP1₄₂, α DEC-MSP1₁₉ or α DEC mAbs. Splenocytes were then incubated with a pool of fluorescent antibodies and gated as singlets and CD19⁺DX5⁻. DCs were selected as CD11c⁺MHCII⁺, and subsequently divided in CD8⁺ (DEC205 expressing subset) and CD8⁻. Binding was detected on 1×10^6 cells using an anti-mouse IgG1-PE antibody. One experiment representative of three is shown. Analysis was performed using FlowJo software.

presence or absence of DEC205⁺ DC targeting, we immunized groups of C57BL/6 mice with α DEC-MSP1₄₂, α DEC-MSP1₁₉, α DEC, rec. MSP1₁₉, rec. MSP1₃₃ or with a combination of rec. MSP1₃₃ and MSP1₁₉ (Fig. 3). To our surprise, mice immunized with rec. MSP1₁₉ were able to produce anti-MSP1₁₉ antibodies that, despite slightly lower, were not statistically different from those observed in mice immunized with α DEC-MSP1₄₂ (Fig. 3A). No difference was also observed between the α DEC-MSP1₄₂ and rec. MSP1₁₉+MSP1₃₃ groups. To better characterize the anti-MSP1₁₉ response, the IgG subtypes were analysed in both mouse strains and the IgG1/IgG2c ratio was

Figure 2. Immunization with hybrid α DEC-MSP1₄₂ mAb induces higher anti-MSP1₁₉ antibody titres when compared to immunization with α DEC-MSP1₁₉ mAb. (A) Groups of C57BL/6 or B10.A mice ($n = 10$) were immunized with $5 \mu\text{g}$ of hybrid α DEC-MSP1₄₂, α DEC-MSP1₁₉ or α DEC in the presence of $50 \mu\text{g}$ of poly (I:C). Thirty days after the first dose, the animals received a booster dose in the same conditions as priming. The anti-MSP1₁₉ or anti-MSP1₃₃ IgG responses were measured by ELISA 5 days before (pre-boost) and 14 days after administration of the booster dose (post-boost). Total anti-MSP1₁₉ IgG antibodies were detected in C57BL/6 (B) and B10.A (C) mice. Anti-MSP1₃₃ antibody detection was also performed in C57BL/6 (D) and B10.A (E) mice. Graphs show the antibody titres of different groups normalized in log10 scale. Animals are represented individually ($n = 10/\text{group}$). Experiments were analysed by one-way ANOVA followed by the post-test HSD Tukey. P-value indicators * and *** refer to $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively, while ns = not significant.

calculated (Fig. 3B). Both C57BL/6 and B10.A mice presented detectable levels of all IgGs in the group immunized with α DEC-MSP1₄₂ mAb. An analysis of the IgG1/IgG2c ratio showed that the response in both mouse strains was prone to Th1 (IgG1/IgG2c < 1). On the other hand, in the group immunized with α DEC-MSP1₁₉ (in both mouse strains) or with rec. MSP1₁₉ or rec. MSP1₁₉+MSP1₃₃ (in C57BL/6 mice), a more Th2 type of response was observed (IgG1/IgG2c > 1).

The detection of all IgG subclasses in the anti-MSP1₁₉ antibody response in both mouse strains, and especially in the α DEC-MSP1₄₂ immunized group, suggested that B cells were undergoing class switching and probably affinity maturation. To test this hypothesis, we measured the avidity index of the anti-MSP1₁₉ antibodies in C57BL/6 and B10.A mice immunized with the hybrid mAbs or with the rec. proteins (Fig. 3C). We observed that anti-MSP1₁₉ antibodies induced in both mouse strains immunized with α DEC-MSP1₄₂ showed a higher avidity index when compared to the group immunized with α DEC-MSP1₁₉ (Fig. 3C). More importantly, the avidity index presented by C57BL/6 mice immunized with α DEC-MSP1₄₂ was higher than the observed in groups that received rec. MSP1₁₉ or rec. MSP1₃₃+MSP1₁₉ proteins (Fig. 3C). Taken together, these results suggest that MSP1₄₂ targeting to the DEC205⁺ DC subset is able to alter the quality of the anti-MSP1₁₉ humoral immune response.

It was previously shown that antigen targeting to the DEC205⁺ DCs induces an antibody response that requires T cell help⁵. To confirm this requirement in our model, we immunized WT, CD4 KO and MHCII KO

Figure 3. Immunization with α DEC-MSP1₄₂ promotes class switch and affinity maturation. (A) Groups (n = 5) of C57BL/6 mice were immunized as described in Fig. 2 with α DEC-MSP1₄₂, α DEC-MSP1₁₉, α DEC, rec. MSP1₁₉, rec. MSP1₃₃, or with a combination of rec. MSP1₃₃-MSP1₁₉ in the presence of poly (I:C). The anti-MSP1₁₉ antibody titres were measured by ELISA before and after the administration of the booster dose. Graph shows the antibody titres of different groups normalized in log10 scale, and animals are represented individually. (B) The anti-MSP1₁₉ antibody titres for each IgG subclass (IgG1, IgG2b, IgG2c and IgG3) were determined 14 days after the administration of the booster dose in groups of C57BL/6 or B10.A mice. Graphs show the antibody titres plotted in log10 scale. Each bar represents the mean values $\pm$ SD of the antibody titres obtained for 5 mice. Numbers above the bars indicate the IgG1/IgG2c ratio calculated for α DEC-MSP1₄₂ and α DEC-MSP1₁₉ immunized groups. Results are representative of 2 independent experiments. (C) ELISA assessed anti-MSP1₁₉ antibody avidities using 7 M urea for 5 min. The avidity index was calculated as the ratio between the OD₄₉₀ obtained after and before urea treatment multiplied by 100. Results are expressed by the mean $\pm$ SD of two distinct experiments performed in triplicates. One-way ANOVA followed by the post-test HSD Tukey was performed. *** Refers to $p < 0.001$ and ns = not significant. Results are representative of 2 independent experiments.

Figure 4. The anti-MSP1₁₉ antibody response induced by the immunization with hybrid mAbs is dependent on CD4⁺ T cell help. Groups (n = 5) of C57BL/6, CD4 KO and MHCII KO mice were immunized as described in Fig. 2. The anti-MSP1₁₉ antibody titres were measured by ELISA before and after the administration of the booster dose. Graph shows the antibody titres of different groups normalized in log10 scale, and animals are represented individually. Results are representative of 2 independent experiments.

mice (C57BL/6 background) with our hybrid mAbs (Fig. 4). As expected, the anti-MSP1₁₉ response was abolished in the absence of CD4⁺ T cells or MHCII presentation.

To test if the anti-MSP1₁₉ antibodies could bind to the MSP1₁₉ protein on the surface of cells, we transfected HEK293T cells with a plasmid capable of expressing the MSP1₁₉ as a transmembrane protein (Supplementary Fig. 2A). As a negative control, HEK293T cells were also transfected with a plasmid containing the unrelated Duffy binding protein II (DBPII, Supplementary Fig. 2B). Besides MSP1₁₉ or DBPII proteins, both plasmids also expressed the green fluorescence protein (GFP). GFP⁺ cells were gated for the analysis (Supplementary Fig. 2C and D). We observed that anti-MSP1₁₉ antibodies induced in mice immunized with either αDEC-MSP1₄₂ or αDEC-MSP1₁₉ in both mouse strains (Supplementary Fig. 2E for C57BL/6, and 2G for B10.A) bound to the MSP1₁₉ expressing cells while no significant ligation was observed in the DBPII transfected cells (Supplementary Fig. 2F for C57BL/6, and 2H for B10.A). It is important to mention that to perform this assay we normalized the amount of anti-MSP1₁₉ antibodies present in the sera.

In summary, the results presented above show that immunization with αDEC-MSP1₄₂ is able to induce stronger and broader humoral immune response when compared with αDEC-MSP1₁₉, in two different mouse strains.

MSP1₄₂ targeting to DEC205⁺ DCs induces activation and proliferation of CD4⁺ T cells specific for the 33-kDa fragment. The results described above suggested that MSP1₄₂ sequence carried epitopes that might provide help for the B cell mediated antibody production when targeted to the DEC205⁺ DCs. To start mapping the important MSP1₄₂ regions, we performed ELISPOT assays to detect IFN-γ producing cells using splenocytes from C57BL/6 mice immunized with αDEC-MSP1₄₂, αDEC-MSP1₁₉, αDEC, rec. MSP1₁₉, rec. MSP1₃₃ or with rec. MSP1₃₃+MSP1₁₉ (Fig. 5A), or from B10.A immunized with αDEC-MSP1₄₂, αDEC-MSP1₁₉ or αDEC (Fig. 5B). We detected large numbers of IFN-γ producing cells only in splenocytes derived from mice immunized with αDEC-MSP1₄₂ mAb and pulsed with recombinant MSP1₃₃. This was observed in C57BL/6 (Fig. 5A) and in B10.A (Fig. 5B) mice. Pulse with rec. MSP1₁₉ induced fewer IFN-γ producing cells in C57BL/6 and in B10.A, indicating that the immunodominant T cell epitopes are probably present in the 33-kDa portion of MSP1₄₂. Of note, we were able to detect a reasonable number of IFN-γ producing cells in C57BL/6 mice immunized with the rec. MSP1₁₉ but not in the animals immunized with αDEC-MSP1₁₉ when the splenocytes were pulsed with the same protein. To further analyse the response, we took advantage of the fact that T cells from B10.A mice recognize peptide DYDVVYLKPLAGMYK previously described³⁷. We then pulsed splenocytes from αDEC-MSP1₄₂, αDEC-MSP1₁₉ or αDEC immunized mice with the DYDVVYLKPLAGMYK peptide and observed that only cells derived from αDEC-MSP1₄₂ mice were able to produce IFN-γ (Fig. 5C). However, the number detected (~380 per 10⁶ total splenocytes) was smaller than the number obtained when the pulse was performed with the recombinant MSP1₃₃ protein (~1,100 per 10⁶ total splenocytes), indicating that there are probably other epitopes that still need to be mapped.

To further investigate the cellular immune response induced in mice immunized with αDEC-MSP1₄₂ mAb, we evaluated the production of three inflammatory cytokines: IFN-γ, IL-2 and TNFα by CD4⁺ (Supplementary Fig. 3) and CD8⁺ T cells (data not shown). CD4⁺ T cells derived from either C57BL/6 or B10.A mice immunized with αDEC-MSP1₄₂ were able to produce the three cytokines when restimulated only with MSP1₃₃ recombinant protein. Restimulation with recombinant MSP1₁₉ was unable to elicit significant percentages of CD4⁺ T cells producing IFN-γ, IL-2 or TNFα in C57BL/6 (Supplementary Fig. 3A) or B10.A mice (Supplementary Fig. 3B). Interestingly, very low levels of CD4⁺ T cells producing any cytokine were observed in C57BL/6 immunized with rec. MSP1₁₉ or rec. MSP1₃₃ (Supplementary Fig. 3A). Although surprising, we did not detect specific responses elicited in CD8⁺ T cells (data not shown). Using boolean gating analysis, we were able to detect the simultaneous production of the inflammatory cytokines IFN-γ, IL-2 and TNFα by CD4⁺ T cells

Figure 5. Splenocytes from α DEC-MSP1₄₂ immunized mice produce IFN- γ in response to MSP1₃₃ recombinant protein. Groups of C57BL/6 (A) and B10.A (B and C) mice ($n = 3$) were immunized as described in Fig. 2. The cellular immune response was evaluated by ELISPOT 20 days after administration of the booster dose. Total splenocytes were stimulated with 1 μ g/ml of recombinant MSP1₃₃ or MSP1₁₉ proteins (A and B) or with the DYDVVYLKPLAGMYK or a control unrelated peptide (C). Graphs show the number of IFN- γ producing cells per million cells after subtracting the number of IFN- γ producing cells obtained in the absence of any stimulus. The experiment was performed in triplicates using samples from pooled mice. Bars indicate mean $\pm$ SD and the experiment was analysed by one-way ANOVA followed by the post-test HSD Tukey. P-value indicators ** and *** refer to $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, while ns = not significant. Results are representative of 3 independent experiments.

Figure 6. Immunization with the α DEC-MSP1₄₂ mAb induces the polyfunctional CD4⁺ T cells after restimulation with MSP1₃₃ recombinant protein in C57BL/6 and B10.A mice. Groups of mice ($n = 3$) were immunized as described in Fig. 2. IFN- γ , IL-2 and TNF α were detected by intracellular staining 20 days after the administration of the booster dose in C57BL/6 (A) and B10.A (B) mice. Splenocytes were stimulated with 5 μ g/ml of MSP1₃₃ recombinant protein. Graphs show the percentage of cells producing IFN- γ , IL-2 and/or TNF α in the CD3⁺CD4⁺ gate after subtracting the values obtained in the absence of any stimulus. Boolean combinations were created using FlowJo software to determine the frequency of each cytokine production based on all possible combinations of cytokine expression. The experiment was performed in duplicates using samples from pooled mice. Results are representative of 2 independent experiments.

(Fig. 6). We observed that CD4⁺ T cells derived from mice immunized with α DEC-MSP1₄₂ mAb were able to produce combinations of the three tested cytokines in both mouse strains (Fig. 6A, C57BL/6 and 6B, B10.A) when pulsed with MSP1₃₃ recombinant protein. In fact, in both mouse strains we were able to detect polyfunctional CD4⁺ T cells producing all combinations of the three cytokines tested (Fig. 6), especially those producing all three at the same time. To access T cell proliferation, splenocytes from mice immunized with the hybrid mAbs or rec. proteins were stained with CFSE and pulsed with either recombinant MSP1₁₉ or MSP1₃₃ proteins (Fig. 7). CD4⁺ T cell proliferation was observed in both mouse strains (Fig. 7A, C57BL/6 and 7B, B10.A) mainly in the animals immunized with α DEC-MSP1₄₂ pulsed with recombinant MSP1₃₃. CD8⁺ T cell proliferation was not observed in any case (data not shown). In addition, we observed that CD4⁺ T cells from B10.A mice also proliferated in response to the DYDVVYLKPLAGMYK peptide (Fig. 7C). However, the percentage of CD3⁺CD4⁺ T cells that responded to this peptide was smaller than that obtained when recombinant MSP1₃₃ was used (Fig. 7B) indicating the presence of other T cell epitopes in the MSP1₃₃ protein sequence.

Figure 7. MSP1₄₂ targeting to the DEC205⁺ DC population stimulates CD4⁺ T cell proliferation in response to MSP1₃₃ protein. Groups of mice (n = 3) were immunized as described in Fig. 2. Twenty days after the administration of the second dose, total splenocytes from C57BL/6 (A) and B10.A (B and C) mice were labelled with CFSE and placed in culture in the presence or absence of 5 µg/ml of MSP1₃₃ or MSP1₁₉ recombinant proteins. Graphs show the percentage of CD3⁺CD4⁺ T cells that lost CFSE (CFSE low) after subtracting the values obtained in the absence of any stimulus. The experiment was performed in triplicates using samples from pooled mice. Bars indicate mean ± SD and the experiment was analysed by one-way ANOVA followed by the post-test HSD Tukey. *** Refers to p < 0.001, ns = not significant. Results are representative of 2 independent experiments.

The results presented above show that antigen targeting to the DEC205⁺ DC population in the presence of poly (I:C) is effective in inducing potent antibody and CD4⁺ T cell responses when epitopes are present in the protein structure. In the absence of such epitopes, the response is weak.

Discussion

Antigen targeting to the CD8 α ⁺ DC population through the use of α DEC205 hybrid mAbs has been successfully used in different models, and was shown to induce both CD8⁺ and CD4⁺ T cells^{5–7,13,15,17–24}. In addition, the induction of antibodies against the fused antigen was also reported previously^{3,5}. All these studies used antigens previously described as immunogenic. However, to our knowledge, no one has yet targeted different fragments of the same antigen to the DEC205⁺ DCs, and asked what would be the immune response outcome. To start addressing that question, we produced two mAbs containing fragments of the MSP1 protein derived from *P. vivax*. The α DEC-MSP1₁₉ mAb contains the C-terminal 19-kDa fragment, which is normally target of antibodies in infected individuals^{28,36,38}, while the α DEC-MSP1₄₂ mAb contains the 19-kDa fragment (MSP1₁₉) fused with the 33-kDa (MSP1₃₃) fragment that was shown to elicit T cell responses in the field³¹. Of note, it was not evaluated which epitopes were recognized by CD4⁺ or CD8⁺ T cells³¹. Both hybrid α DEC-derived mAbs were produced successfully, retained antigenicity and were able to target the DEC205 receptor expressed on the surface of CD8 α ⁺ DC population. This is not the first time a *Plasmodium* derived antigen is fused to the α DEC205 mAb. Previously, the circumsporozoite protein (CSP) from *P. yoelii* and *P. falciparum* was also used to immunize mice⁵ and non-human primates²⁴. However, to our knowledge, this is the first time an antigen expressed by the erythrocytic stage (merozoites) is fused to the α DEC205 mAb. We took advantage of the fact that MSP1₄₂ contains MSP1₁₉, and immunized mice with both α DEC-derived hybrid mAbs in an attempt to study the anti-MSP1₁₉ antibody response elicited when MSP1₁₉ was targeted alone or fused to MSP1₃₃. As mentioned previously, we were unable to produce an isotype control fused to the MSP1₄₂ protein, and then used the recombinant proteins as non-targeted controls. The use of poly (I:C) as a DC maturation stimulus is well documented in the literature and it seems to be very potent when administered together with α DEC205 fusion mAbs^{3,7,14,15,24,39}. An increase in either anti-MSP1₁₉ or anti-MSP1₃₃ antibody titres was observed after the administration of the second dose, which has been consistently observed in other models^{5,14}. Interestingly, the anti-MSP1₁₉ antibody titres were increased about 100x when MSP1₄₂ was targeted to the CD8 α ⁺ DC population in two different mouse strains. This result suggested that the presence of MSP1₃₃ fragment was helping to increase the anti-MSP1₁₉ antibody response possibly because of the presence of additional T cell epitopes in the region of 33 kDa. However, to our surprise, immunization with rec. MSP1₁₉ or with rec. MSP1₃₃+MSP1₁₉ was able to induce high anti-MSP1₁₉ antibody titres in C57BL/6 mice that were not different from those induced by α DEC-MSP1₄₂. This result was unexpected but may reflect a longer persistence of rec. MSP1₁₉ in the circulation leading to an increase in the antigen uptake by B cells. We also cannot rule out the possibility that MSP1₁₉ contains minor CD4⁺ T cell epitopes responsible for helping B cells to produce antibodies when the protein is not directly targeted to the DEC205⁺ DCs. The dependency of T cell help for the induction of antibody responses after targeting to DEC205⁺ DCs was shown after immunization of CD4 and MHCII KO mice, when complete abrogation of the antibody response was observed in the animals. To characterize in more detail the anti-MSP1₁₉ antibody response, we carefully analysed the IgG subclasses induced when the hybrid mAbs or the rec. proteins were used. Surprisingly, immunization with the α DEC-MSP1₄₂ mAb induced a very different profile of IgG subclasses when compared to either α DEC-MSP1₁₉ or rec. proteins immunized mice. The IgG1/IgG2c ratio in animals immunized with α DEC-MSP1₄₂ was <1, indicating a more prone Th1-type of response in both mouse strains analysed. On the other hand, the group immunized with α DEC-MSP1₁₉ or with the rec. proteins showed a higher IgG1/IgG2c ratio (>1) in both mouse strains. Previous reports have shown that antigen targeting through DEC205 is able to elicit high titres of IgG2c (or IgG2a, depending on the mouse strain)^{5,14,23}. These results also suggested that immunization with α DEC-MSP1₄₂ could be inducing a more pronounced class switch that would imply in an increase in affinity maturation. We then measured the avidity index of the polyclonal sera induced in mice immunized with α DEC-MSP1₄₂, α DEC-MSP1₁₉ or with the rec. proteins. In both mouse strains, the avidity index was higher in the sera of animals immunized with the α DEC-MSP1₄₂ mAb, suggesting that the anti-MSP1₁₉ specific B cells were undergoing affinity maturation particularly in this group of mice. On the other hand, the ability to bind to MSP1₁₉ expressed on the surface of transiently transfected HEK293T cells was similar between the groups immunized with either α DEC-MSP1₄₂ or α DEC-MSP1₁₉ mAbs, when we considered dilutions where both sera presented similar OD values. Despite the similar binding observed when similar amounts of anti-MSP1₁₉ antibodies were used, the fact that immunization with α DEC-MSP1₄₂ induces higher antibody titres with increased avidity may be favourable in the field where higher anti-MSP1₁₉ titres have been associated with protection against malaria⁴⁰.

The results involving the anti-MSP1₁₉ antibody response described above indicated that CD4⁺ T cells were being activated during immunization with the α DEC-MSP1₄₂ mAb, as the initial T-B cell interaction leads to germinal centre formation, affinity maturation, and isotype switching. The increased production of IgG2c prompted us to investigate if T cells were able to produce IFN- γ , a cytokine associated with the production of this subclass⁴¹. We were able to detect high numbers of IFN- γ producing T cells in both mouse strains immunized with α DEC-MSP1₄₂ mAb only when splenocytes were pulsed with the recombinant MSP1₃₃ protein. This indicated that the immunodominant epitopes were restricted to the 33-kDa fragment of the molecule. Interestingly, we did not observe a noticeable response when the rec. MSP1₃₃ was used as immunogen. On the other hand, we were able to detect IFN- γ producing T cells in animals immunized with rec. MSP1₁₉ whose splenocytes were pulsed with the same protein. In addition, we found that CD4⁺ T cells induced by immunization with α DEC-MSP1₄₂ mAb were able to produce different combinations of three inflammatory cytokines (IFN- γ , IL-2 and TNF α), and proliferate, when pulsed with the MSP1₃₃ recombinant protein. These results showed that the presence of immunodominant epitopes in the 33-kDa fragment of MSP1 activate polyfunctional CD4⁺ T cells and the anti-MSP1₁₉ antibody response. In B10.A mice, we were able to detect a specific response against the previously

defined DYDVVYLKPLAGMYK epitope³⁷, but more epitopes are probably present on the MSP1₃₃ sequence as this response was weaker than that observed with the recombinant MSP1₃₃ pulse. To completely map the immunodominant epitopes, additional experiments using peptide libraries will be necessary. Induction of CD4⁺ T cell proliferation and cytokine production after immunization with a hybrid α DEC205 mAb in the presence of poly (I:C) has been reported previously by Trumpheller *et al.*¹⁵. The use of a α DEC205 mAb fused to a HIV protein elicited mainly CD4⁺ T cells that proliferated and produced the three inflammatory cytokines (IFN- γ , IL-2 and TNF α). In our case, we detected CD4⁺ T cells that proliferated vigorously after recombinant MSP1₃₃ pulse and were capable of producing not only three cytokines simultaneously, but also two or one. On the other hand, immunization with α DEC-MSP1₁₉ mAb or with the rec. proteins was extremely inefficient in inducing either proliferation or cytokine production. These results highlight the importance of the antigen choice when targeting the DEC205 receptor on the surface of CD8 α ⁺ DCs.

Of note, we have to mention that contrary to other results previously reported on the literature^{5–7,13,21}, we did not detect CD8⁺ T cell proliferation or cytokine production when MSP1₄₂ or MSP1₁₉ were targeted to the DEC205⁺ DCs. The simpler explanation may be that *P. vivax* MSP1₄₂ sequence does not contain CD8⁺ T cell epitopes or those epitopes are not recognized by C57BL/6 and B10.A haplotypes. We were unable to find in the literature any previous reports mapping CD8⁺ T cell epitopes to both *P. vivax* MSP1₄₂ and MSP1₁₉ proteins. However, we found one report that described CD8⁺ T cell epitopes in the sequence of the murine *P. yoelii* MSP1₄₂³⁵. It is important to mention that the amino acid sequences of MSP1 from *P. vivax* and *P. yoelii* are quite distinct, and that the CD8⁺ T cells were detected in BALB/c mice after immunization with a recombinant adenovirus. Besides, CD8⁺ T cells were detected after splenocytes were pulsed with peptide pools³³. Indeed, almost every time CD8⁺ T cells were detected after antigen targeting to CD8 α ⁺DEC205⁺ DCs, detection was measured using overlapping peptide libraries or previously described peptides, and frequently previously enriched CD8⁺ T cells^{5–7,21}. In this work, we did not use overlapping peptide libraries or CD8⁺ T cell enrichment. Instead, bulk splenocytes were pulsed directly with the rec. proteins. Another explanation that may account for the absence of CD8⁺ T cell detection may have to do with the timing of analysis. Here we analysed cellular immune responses on day 20 after boost while others normally analyse T cell responses at earlier time points¹⁶. In an attempt to maximize our window of detection, we analysed the animals on day 5 after the boost, and still could not detect CD8⁺ T cell proliferation or cytokine production (data not shown). However, we still cannot rule out the possibility of CD8⁺ T cell activation because we did not enrich the T cells or used peptide libraries. In fact, we plan to explore those possibilities in the future. Finally, it is important to point out that MSP1₄₂ is an antigen expressed during the erythrocytic phase of *Plasmodium* life cycle, and the evidence points to a role of antibodies and CD4⁺ T cells in protection, while CD8⁺ T cells would have a more pronounced role during the pre-erythrocytic phase, before the parasites reach the blood.

Taken together, our results show that the choice of the antigen may be important when designing vaccines targeted to the CD8 α ⁺DEC205⁺ DC subset.

Material and Methods

Mice. Six- to 8-week-old female C57BL/6 and C57BL/6 CD4 KO mice were bred at the Isogenic Mouse Facility of the Parasitology Department, University of São Paulo, Brazil. Female B10.A mice were obtained from the Isogenic Mouse Facility of the Immunology Department, University of São Paulo, Brazil. Female C57BL/6 MHCII KO mice were obtained from the Division of Immunology, Federal University of São Paulo (UNIFESP). All protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA) of the University of São Paulo (protocol number 082) and all the animals were handled according to the Brazilian College of Animal Experimentation guidelines. In addition, all experimental methods were performed in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian National Law (11.794/2008).

Plasmid generation. The sequence encoding aminoacids 1326 to 1705 from the *P. vivax* MSP1 protein (Belem strain, accession number AF435594.1⁴²) was synthesized by GenScript (Piscataway, NJ, USA) with codon optimization for expression in mammalian cells. This sequence corresponds to the 42 kDa portion of the MSP1 protein (MSP1₄₂). The three putative glycosylation sites (NIT, NES and NVT) were substituted by NII, EES and DVT. Amplification was accomplished using the Phusion High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions. A 1,140 bp fragment was amplified, cloned into the pJET 1.2/blunt vector (ThermoScientific) and then digested with the restriction enzymes *Xho*I and *Not*I (New England Biolabs). After digestion, the fragment was ligated in frame with the carboxyl terminus of the heavy chain of mouse α DEC205 (NLDC145 clone) or with an isotype control (GL117 clone) mAb (kindly provided by Dr. Michel C. Nussenzweig, The Rockefeller University), as previously described¹⁴. In addition, a 267 bp fragment (amino acids 1617 to 1705) corresponding to the 19 kDa portion of the MSP1 protein (MSP1₁₉) was also amplified and cloned as described above. The final plasmids were named pDEC-MSP1₄₂, Iso-MSP1₄₂, pDEC-MSP1₁₉ and Iso-MSP1₁₉, and sequenced to confirm the presence of either MSP1₄₂ or MSP1₁₉ sequences in frame.

For the production of the recombinant MSP1₁₉ protein, we used the plasmid pET14b-MSP1₁₉ previously described by ref. 43, while the sequence corresponding to amino acids 1326 to 1616 was amplified by PCR as described above and cloned into the pET28a vector. Plasmid pET28a-MSP1₃₃ was then generated.

Expression of recombinant hybrid mAbs and proteins. Plasmids containing the heavy chain of the mouse α DEC205 mAbs (pDEC-MSP1₁₉, pDEC-MSP1₄₂, or pDEC without any fused antigen) or the isotype controls and the respective light chains (pDEC kappa, kindly provided by Dr. Michel C. Nussenzweig, The Rockefeller University, New York, USA) were amplified in DH5 α bacteria, and subsequently purified in large scale using the QIAGEN Maxi Prep kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions.

Transient transfection in human embryonic kidney (HEK) 293T (ATCC No CRL-11268) cells was performed exactly as described in ref. 14. The recombinant fusion mAbs were purified with the aid of Protein G beads (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. After purification, all the fractions containing antibodies were pooled together, dialysed against 2 L cold PBS, and sterilized filtered through 0.2 μ m membranes (TPP). The fusion mAbs α DEC-MSP1₄₂, α DEC-MSP1₁₉ and α DEC had their concentrations estimated by Bradford assay (Pierce), and an assay for the detection of LPS (QCL -1000, Lonza) was performed after purification of each batch. Samples containing less than 1 EU/mL were considered clean, and aliquots were stored at -20°C until use. We were unable to produce the fusion mAb Iso-MSP1₄₂ as all our attempts resulted in degradation.

The recombinant MSP1₁₉ protein was produced according to the protocol described in ref. 43. A different protocol was developed for the production of the recombinant MSP1₃₃ protein. Briefly, a 125 ml bacterial pellet was dissolved in 5 ml of lysis buffer (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10% glycerol, pH 8.0). Next, PMSF to a final concentration of 1 mM was added and the solution was centrifuged at $28,000 \times g$ for 45 minutes. The supernatant was incubated with 5 ml of Ni-NTA (Qiagen) previously equilibrated in lysis buffer for 2 hours at 4°C , under rotation. After 4 washes with 10 ml of wash buffer 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 30 mM imidazole, pH 8.0, the protein was eluted from the Ni-NTA matrix using 5 ml of elution buffer (50 mM Tris, 1 M NaCl, 10% glycerol, 500 mM imidazole pH 8.0) for 1 hour at 4°C .

Immunoblots. Approximately 1 μ g of each fusion mAb or the recombinant protein were resolved on 7 or 12% SDS-PAGE gels under non-reducing or reducing conditions, respectively. Gels were either stained with Coomassie Blue (Amresco) or transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Coomassie Blue stained gels were then scanned using a Lexmark 3600–4600 series scanner and transformed into grayscale using Adobe Photoshop CC software (Adobe Systems Incorporated 2013). Nitrocellulose membranes were blocked for an 1 hour at room temperature (rt) in 0.05% PBS-Tween 20 (PBS-T), 5% non-fat milk and 1% BSA, and then incubated with serum (1:2,000 dilution) derived from a patient previously infected with *P. vivax* (kindly provided by Dr. Claudio R.F. Marinho, University of São Paulo, Brazil). After a 2-hour incubation at rt the membranes were washed twice and incubated for an additional hour using an anti-human IgG-HRP (1:5,000, Jackson Laboratories). After two additional washes, the membranes were developed using quimioluminescence (ECL kit, GE Healthcare) and captured on Kodak film. The films were then scanned and submitted to the same processing described above for Coomassie Blue gels.

Binding assay. Spleens from naïve mice were removed and splenocytes were obtained after erythrocyte lysis with ACK buffer (0.1 mM EDTA, 0.15 mM NH_4Cl , 1 mM KHCO_3). Five million splenocytes were incubated in PBS-FBS (fetal bovine serum) 2% containing Fc Block (anti-CD16/32, BD Biosciences) at a 1:100 dilution. After a 15-minute incubation on ice, α DEC-MSP1₄₂, α DEC-MSP1₁₉ or α DEC purified mAbs were diluted to 10, 1, 0.1 μ g/ml and added to the wells. After 45 minutes of incubation, the cells were centrifuged and washed twice with PBS-FBS 2%. Another 45-minute incubation on ice followed in the presence of anti-mouse IgG1-PE (clone A85-1), anti-CD11c-APC (clone N418), anti-CD49b-biotin (Clone DX5), anti-CD19-biotin (clone 1D3), anti-MHCII-FITC (2G9) and anti-CD8-PE-Cy7 (clone 53-6.7). After 2 more washes, cells were incubated on ice with Streptavidin-PerCP for 30 minutes. All mAbs were purchased from BD biosciences. Finally, after two final washes, half a million events were then read in a FACS Canto flow cytometer (BD biosciences), and analysed using FlowJo software (version 9.3, Tree Star, San Carlo, CA).

Immunization schedule. Groups of 5–10 female mice were immunized intraperitoneally with 5 μ g of the following hybrid mAbs: α DEC-MSP1₄₂, α DEC-MSP1₁₉ or α DEC (as a negative control) in the presence of 50 μ g of poly (I:C) (InvivoGen). Groups of 5 female C57BL/6 also received 1.5 μ g of rec. MSP1₃₃ or 1 μ g of rec. MSP1₁₉ in the presence of the same amount of poly (I:C). This amount corresponds to the same number of molecules of either MSP1₃₃ or MSP1₁₉ present on 5 μ g α DEC-MSP1₄₂ mAb. Thirty days after the prime, animals received a second dose containing exactly the same amount of fusion mAbs and adjuvant. Animals were bled 5 days before or 14 days after the administration of the second dose and their sera were used for the analysis of the humoral response. Assays to evaluate the cellular immune response were performed on day 20 after the administration of the second dose, when the animals were euthanized.

Analysis of the antibody responses. For the detection of antibodies against either MSP1₁₉ or MSP1₃₃, sera from immunized mice were used in ELISA assays, exactly as described previously¹⁴. Briefly, high binding ELISA plates (Costar) were coated overnight at room temperature (rt) with 100 ng/well of MSP1₁₉ or MSP1₃₃ recombinant proteins diluted in PBS. After three washes and one-hour incubation in blocking buffer (PBS-Tween 20 0.02%, non-fat milk 5% and BSA 1%), sera were serially diluted in PBS-Tween 20 0.02%, non-fat milk 5% and BSA 0.25% and incubated for 2–3 h at rt. The secondary antibodies goat anti-mouse IgG Fc-specific-HRP (1:10,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories) or anti-mouse IgG subclass-HRP specific antibodies (1:3,000; SouthernBiotech) were added after three additional washes. After one-hour incubation at rt, plates were vigorously washed and the enzymatic reaction was developed by the addition of 1 mg/ml of ortho-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma) diluted in phosphate-citrate buffer, pH 5.0, containing 0.03% (v/v) hydrogen peroxide. Reactions were stopped using sulfuric acid 4N. OD₄₉₀ was measured using a microplate reader (Biotek). Titres represent the highest serum dilution showing an OD₄₉₀ $\geq$ 0.1 normalized in a log10 scale. The IgG1/IgG2c ratio was calculated by dividing the mean values of the highest serum dilution obtained for IgG1 by the mean value of the highest serum dilution obtained for IgG2c without normalization. The avidity index was calculated using an extra step of incubation with 7M urea for 5 min, exactly as described previously^{44,45}.

Analysis of T cell responses. *Splenocyte isolation.* After mice were euthanized, spleens were removed aseptically and processed exactly as described by ref. 14. Bulk splenocytes were resuspended in R10 [RPMI supplemented with 10% of fetal bovine serum (GIBCO), 2 mM L-glutamine (GIBCO), 10 mM Hepes (GIBCO), 1 mM sodium pyruvate (GIBCO), 1% vol/vol non-essential aminoacid solution (GIBCO), 1% vol/vol vitamin solution (GIBCO), 20 µg/mL of ciprofloxacin (Isofarma, Brazil) and 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (GIBCO)]. Cell viability was evaluated using 0, 1% Trypan Blue exclusion dye and cell concentration was estimated using a hemocytometer.

IFN- γ ELISPOT. ELISPOT assays for the detection of IFN- γ producing splenocytes were performed using the Ready-SET-Go kit (eBioscience), according to the manufacturer's instructions. Three hundred thousand splenocytes were incubated in the presence of 1 µg/mL of the recombinant MSP1₃₃ or MSP1₁₉ proteins. Control cells were left unpulsed. The AEC kit (BD biosciences) was used to develop the spots that were counted with the aid of an automated stereomicroscope (KS ELISPOT, Zeiss, Oberkochen, Germany). The number of IFN- γ producing cells/10⁶ splenocytes was calculated after subtracting the number of cells in the unpulsed wells.

Detection of IFN- γ , IL-2 and TNF α producing cells by intracellular staining. Splenocytes isolated from immunized mice were obtained as described above, and plated in round-bottomed 96-well plates at a concentration of 1×10^6 cells/well in triplicates. The cells were then incubated with the recombinant proteins MSP1₃₃ or MSP1₁₉ (5 µg/mL) in R10 medium containing 2 µg/mL of the α CD28 agonist antibody. As negative controls, some cells were left unpulsed while others were incubated with 1 µg/mL α CD3 as positive controls. After one-hour incubation at 37 °C and 5% CO₂, 0.5 µg of Golgi Plug (Brefeldin A, BD Pharmingen) was added to each well and plates were re-incubated for another 12 hours. After this period, the plates were centrifuged for 5 min at $1,000 \times g$ and the supernatant was discarded by inversion. Cells were then washed with PBS-FBS and transferred to V-bottomed 96-well plates. The cells were then surface stained with α CD4-PerCP-Cy5.5 mAb (clone RM 4-5) for 45 minutes on ice in PBS-FBS. After 3 washes, cells were resuspended in PharmingenStain buffer (BD Pharmingen) for 10 min on ice, centrifuged, and fixed and permeabilized using the Cytotfix/Cytoperm kit (BD Pharmingen). After a 15-min incubation on ice, the plates were centrifuged and washed 3 times with PermWash buffer (BD Pharmingen). The intracellular staining was performed using α CD3-APC-Cy7 (clone 145-2C11), α IFN- γ -APC (clone XMGI.2), α IL2-FITC (clone JES6-5H4), α TNF α -PE (clone MP6-XT22) mAbs for 45 minutes on ice. After three more washes with PermWash buffer, cells were resuspended in PBS-FBS, and one million events were acquired in a FACSCanto flow cytometer (BD biosciences), and analysed using FlowJo software (version 9.3, Tree Star, San Carlo, CA). All antibodies used were purchased from BD Pharmingen.

CFSE-based proliferation assay. Three hundred thousand splenocytes from immunized mice were assayed for their ability to proliferate *in vitro* using the CFSE dilution based proliferation assay after stimulation with 5 µg/mL of the MSP1₃₃ and MSP1₁₉ recombinant proteins or with peptides DYDVVYLKPLAGMYK and AKFVAWTLKAAA, exactly as described in ref. 46.

Data Analysis. One-way ANOVA followed by Tukey's honestly significantly different (HSD) test were used to calculate statistical significance (p-values). Prism 5 software (GraphPad Software Inc, LA Jolla, CA) was used for all tests and differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

References

- Steinman, R. M. & Hemmi, H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **311**, 17–58 (2006).
- MacLennan, I. & Vinuesa, C. Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity* **17**, 235–238, doi: 10.1074/1302003989 (2002).
- Lahoud, M. H. *et al.* Targeting antigen to mouse dendritic cells via Clec9A induces potent CD4 T cell responses biased toward a follicular helper phenotype. *J Immunol* **187**, 842–850, doi: 10.4049/jimmunol.1101176 (2011).
- Caminschi, I. *et al.* The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* **112**, 3264–3273, doi: 10.1182/blood-2008-05-155176 (2008).
- Boscardin, S. B. *et al.* Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med* **203**, 599–606, doi: 10.1084/jem.20051639 (2006).
- Trumpheller, C. *et al.* Intensified and protective CD4⁺ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med* **203**, 607–617 (2006).
- Idoyaga, J. *et al.* Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 2384–2389, doi: 10.1073/pnas.1019547108 (2011).
- Steinman, R. M. Dendritic cells *in vivo*: a key target for a new vaccine science. *Immunity* **29**, 319–324, doi: 10.1016/j.immuni.2008.08.001 (2008).
- Inaba, K. *et al.* Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes. *Cell Immunol* **163**, 148–156, doi: S000874985711094 [pii] (1995).
- Witmer-Pack, M. D., Swiggard, W. J., Mirza, A., Inaba, K. & Steinman, R. M. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression *in situ* in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Cell Immunol* **163**, 157–162, doi: 10.1006/cimm.1995.1110 (1995).
- Hawiger, D. *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*. *J Exp Med* **194**, 769–779 (2001).
- Bonifaz, L. *et al.* 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* **196**, 1627–1638 (2002).
- Bonifaz, L. C. *et al.* *In vivo* targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* **199**, 815–824 (2004).
- Henriques, H. R. *et al.* Targeting the Non-structural Protein 1 from Dengue Virus to a Dendritic Cell Population Confers Protective Immunity to Lethal Virus Challenge. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2330, doi: 10.1371/journal.pntd.0002330 (2013).

15. Trumpfheller, C. *et al.* The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4⁺ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 2574–2579, doi: 10.1073/pnas.0711976105 (2008).
16. Iwai, Y. *et al.* An IFN- γ -IL-18 signaling loop accelerates memory CD8⁺ T cell proliferation. *PLoS One* **3**, e2404, doi: 10.1371/journal.pone.0002404 (2008).
17. Dudziak, D. *et al.* Differential antigen processing by dendritic cell subsets *in vivo*. *Science* **315**, 107–111 (2007).
18. Charalambous, A., Oks, M., Nchinda, G., Yamazaki, S. & Steinman, R. M. Dendritic cell targeting of survivin protein in a xenogeneic form elicits strong CD4⁺ T cell immunity to mouse survivin. *J Immunol* **177**, 8410–8421, doi: 10.1186/bcr3135 (2006).
19. Wang, B. *et al.* Targeting of the non-mutated tumor antigen HER2/neu to mature dendritic cells induces an integrated immune response that protects against breast cancer in mice. *Breast Cancer Res* **14**, R39, doi: 10.1186/bcr3135 (2012).
20. Tsuji, T. *et al.* Antibody-targeted NY-ESO-1 to mannose receptor or DEC-205 *in vitro* elicits dual human CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses with broad antigen specificity. *J Immunol* **186**, 1218–1227, doi: 10.4049/jimmunol.1000808 (2011).
21. Mahnke, K. *et al.* Targeting of antigens to activated dendritic cells *in vivo* cures metastatic melanoma in mice. *Cancer Res* **65**, 7007–7012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0938 (2005).
22. Do, Y. *et al.* Targeting of LcrV virulence protein from *Yersinia pestis* to dendritic cells protects mice against pneumonic plague. *Eur J Immunol* **40**, 2791–2796, doi: 10.1002/eji.201040511 (2010).
23. Do, Y. *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* **38**, 20–29, doi: 10.1002/eji.200737799 (2008).
24. Tewari, K. *et al.* Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4⁺ T cell responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein (CSP) and alphaDEC-CSP in non human primates. *Vaccine* **28**, 7256–7266, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.08.098 (2010).
25. Han, H. J. *et al.* Epidermal growth factor-like motifs 1 and 2 of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 are critical domains in erythrocyte invasion. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 563–570, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.06.008 (2004).
26. Blackman, M. J., Ling, I. T., Nicholls, S. C. & Holder, A. A. Proteolytic processing of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. *Mol Biochem Parasitol* **49**, 29–33, doi: 0166-6851(91)90127-R (1991).
27. Blackman, M. J., Heidrich, H. G., Donachie, S., McBride, J. S. & Holder, A. A. 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* **172**, 379–382 (1990).
28. Soares, I. S., Levitus, G., Souza, J. M., Del Portillo, H. A. & Rodrigues, M. M. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infect Immun* **65**, 1606–1614 (1997).
29. Soares, I. S. *et al.* Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1. *Am J Trop Med Hyg* **60**, 357–363 (1999).
30. Wilson, D. W. *et al.* Quantifying the importance of MSP1-19 as a target of growth-inhibitory and protective antibodies against Plasmodium falciparum in humans. *PLoS One* **6**, e27705, doi: 10.1371/journal.pone.0027705 (2011).
31. Udhayakumar, V. *et al.* Identification of T and B cell epitopes recognized by humans in the C-terminal 42-kDa domain of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein (MSP)-1. *J Immunol* **154**, 6022–6030 (1995).
32. Hui, G. & Hashimoto, C. Plasmodium falciparum anti-MSP1-19 antibodies induced by MSP1-42 and MSP1-19 based vaccines differed in specificity and parasite growth inhibition in terms of recognition of conserved versus variant epitopes. *Vaccine* **25**, 948–956, doi: 10.1016/j.vaccine.2006.08.041 (2007).
33. Draper, S. J. *et al.* Recombinant viral vaccines expressing merozoite surface protein-1 induce antibody- and T cell-mediated multistage protection against malaria. *Cell Host Microbe* **5**, 95–105, doi: 10.1016/j.chom.2008.12.004 (2009).
34. Daly, T. M. & Long, C. A. 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* **61**, 2462–2467 (1993).
35. Daly, T. M. & Long, C. A. Humoral response to a carboxyl-terminal region of the merozoite surface protein-1 plays a predominant role in controlling blood-stage infection in rodent malaria. *J Immunol* **155**, 236–243 (1995).
36. Shi, Y. P. *et al.* Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1. *Infect Immun* **64**, 2716–2723 (1996).
37. Rosa, D. S. *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* **8**, 2130–2137, doi: 10.1016/j.micinf.2006.03.012 (2006).
38. Blackman, M. J. & Holder, A. A. Use of a recombinant baculovirus product to measure naturally-acquired human antibodies to disulphide-constrained epitopes on the P. falciparum merozoite surface protein-1 (MSP1). *FEMS Immunol Med Microbiol* **6**, 307–315 (1993).
39. Longhi, M. P. *et al.* Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J Exp Med* **206**, 1589–1602, doi: 10.1084/jem.20090247 (2009).
40. Egan, A. F., Burghaus, P., Druilhe, P., Holder, A. A. & Riley, E. M. Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth *in vitro*. *Parasite Immunol* **21**, 133–139 (1999).
41. Stavnezer, J. Molecular processes that regulate class switching. *Curr Top Microbiol Immunol* **245**, 127–168 (2000).
42. Putaporntip, C. *et al.* Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the Plasmodium vivax merozoite surface protein-1 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 16348–16353, doi: 10.1073/pnas.252348999 (2002).
43. Cunha, M. G., Rodrigues, M. M. & Soares, I. S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the Plasmodium vivax vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine* **20**, 385–396, doi: S0264410X01003590 (2001).
44. Zompi, S., Santich, B. H., Beatty, P. R. & Harris, E. Protection from secondary dengue virus infection in a mouse model reveals the role of serotype cross-reactive B and T cells. *J Immunol* **188**, 404–416, doi: 10.4049/jimmunol.1102124 (2012).
45. de Souza, V. A. *et al.* Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary dengue virus infections. *J Clin Microbiol* **42**, 1782–1784 (2004).
46. Ribeiro, S. P. *et al.* A vaccine encoding conserved promiscuous HIV CD4 epitopes induces broad T cell responses in mice transgenic to multiple common HLA class II molecules. *PLoS One* **5**, e11072, doi: 10.1371/journal.pone.0011072 (2010).

Acknowledgements

This research was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, 2007/08648-9 and 2013/11442-4), the Brazilian National Research Council (CNPq)/National Institutes of Science and Technology in Vaccines (INCTV, 15203*12), and BNP-Paribas Bank. K.N.S.A., E.V.R., R.A., M.M.R. I.S.S., and S.B.B. received fellowships from CNPq. The funders had no role in study design or data collection.

Author Contributions

S.B.B. and K.N.S.A. conceived and designed the experiments. K.N.S.A., E.V.R., R.A., M.M.Y. and S.B.B. performed the experiments. S.B.B. and K.N.S.A. analysed the data and prepared the figures. M.M.R. and I.S.S. contributed reagents and materials. S.B.B. and K.N.S.A. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Amorim, K. N. S. *et al.* The presence of T cell epitopes is important for induction of antibody responses against antigens directed to DEC205⁺ dendritic cells. *Sci. Rep.* **6**, 39250; doi: 10.1038/srep39250 (2016).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

Apêndice B

Hindawi Publishing Corporation
Journal of Immunology Research
Volume 2016, Article ID 2926436, 11 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/2926436>

Review Article

Dendritic Cells and Their Multiple Roles during Malaria Infection

Kelly N. S. Amorim,¹ Daniele C. G. Chagas,¹
Fernando B. Sulczewski,¹ and Sílvia B. Boscardin^{1,2}

¹Laboratory of Antigen Targeting to Dendritic Cells, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

²National Institute for Science and Technology in Vaccines, 31270-910 Belo Horizonte, MG, Brazil

Correspondence should be addressed to Sílvia B. Boscardin; sbboscardin@usp.br

Received 26 November 2015; Accepted 6 March 2016

Academic Editor: Jacek Tabarkiewicz

Copyright © 2016 Kelly N. S. Amorim et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Dendritic cells (DCs) play a central role in the initiation of adaptive immune responses, efficiently presenting antigens to T cells. This ability relies on the presence of numerous surface and intracellular receptors capable of sensing microbial components as well as inflammation and on a very efficient machinery for antigen presentation. In this way, DCs sense the presence of a myriad of pathogens, including *Plasmodium* spp., the causative agent of malaria. Despite many efforts to control this infection, malaria is still responsible for high rates of morbidity and mortality. Different groups have shown that DCs act during *Plasmodium* infection, and data suggest that the phenotypically distinct DCs subsets are key factors in the regulation of immunity during infection. In this review, we will discuss the importance of DCs for the induction of immunity against the different stages of *Plasmodium*, the outcomes of DCs activation, and also what is currently known about *Plasmodium* components that trigger such activation.

1. Introduction

Malaria is the most important protozoan parasitosis in humans. It afflicts millions of people annually causing an expressive burden, mainly in tropical countries. *Plasmodium* has a very complex life cycle, and its different stages alternate between the vertebrate host and the mosquito. The vertebrate infective stages are able to move around in the skin but also traverse and infect cells in tissues. During this journey, *Plasmodium* interacts with DCs that are responsible for the initiation of adaptive immune responses. The interactions among DCs and the parasite are complex and may shape the outcome of the anti-*Plasmodium* immune responses.

2. Dendritic Cells and Their Role in the Induction of Immune Responses

DCs are a distinct lineage of mononuclear phagocytic cells specialized in antigen presentation. They show excellent ability to capture, process, and present antigens to T cells [1],

directly activate B cells [2], and are also involved in the amplification of innate immune responses, such as activation of NK cells [3, 4]. Once in contact with a pathogen, DCs undergo a process known as maturation that culminates with efficient antigen presentation and cytokine production. Cytokines produced by DCs become part of the microenvironment that induces immune responses capable of stimulating the development of effector T lymphocytes [5]. In addition, DCs are involved in tolerance development in the thymus by negative selection of autoreactive lymphocytes [6] and in the periphery, where they present self-antigens in the absence of inflammation [7]. This entire range of DC functions is associated with their ability to recognize pathogen- or damage-associated molecular patterns (PAMPs or DAMPs, resp.) through pattern recognition receptors (PRRs) [8].

Different classes of PRRs were discovered in the last decades and include membrane anchored receptors such as toll-like receptors (TLRs) [9] and C-type lectin receptors (CLRs) [10], besides the cytoplasmic nucleotide-binding oligomerization domain- (Nod-) like receptors (NLRs), RIG-I-like

Apêndice C

RESEARCH ARTICLE

Antigen Targeting to Dendritic Cells Allows the Identification of a CD4 T-Cell Epitope within an Immunodominant *Trypanosoma cruzi* Antigen

Elaine V. Rampazo¹, Kelly N. S. Amorim¹, Marcio M. Yamamoto¹, Raquel Hoffmann Panatieri¹, Mauricio M. Rodrigues^{2,3}, Silvia B. Boscardin^{1,3*}

1 Laboratory of Antigen Targeting to Dendritic Cells, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** CTCMol, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** National Institute for Science and Technology in Vaccines, Belo Horizonte, Brazil

* sbboscardin@usp.br

OPEN ACCESS

Citation: Rampazo EV, Amorim KNS, Yamamoto MM, Panatieri RH, Rodrigues MM, Boscardin SB (2015) Antigen Targeting to Dendritic Cells Allows the Identification of a CD4 T-Cell Epitope within an Immunodominant *Trypanosoma cruzi* Antigen. PLoS ONE 10(2): e0117778. doi:10.1371/journal.pone.0117778

Academic Editor: Claudio Romero Farias Marinho, Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade de São Paulo - USP, BRAZIL

Received: November 4, 2014

Accepted: January 2, 2015

Published: February 13, 2015

Copyright: © 2015 Rampazo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq)/National Institutes of Science and Technology in Vaccines (INCTV, 15203/12), São Paulo State Research Funding Agency (FAPESP, 20070864/8-9) and BNP-Paribas Bank. E.V. Rampazo, K.N.S. Amorim and R. H. Panatieri received fellowships from CNPq. The funders had no role in study design, data collection

Abstract

Targeting antigens to dendritic cells (DCs) by using hybrid monoclonal antibodies (mAbs) directed against DC receptors is known to improve activation and support long-lasting T cell responses. In the present work, we used the mAb αDEC205 fused to the *Trypanosoma cruzi* amastigote surface protein 2 (ASP-2) to identify a region of this protein recognized by specific T cells. The hybrid αDEC-ASP2 mAb was successfully generated and preserved its ability to bind the DEC205 receptor. Immunization of BALB/c mice with the recombinant mAb in the presence of polyribinosinic: polyribocytidylic acid (poly I:C) specifically enhanced the number of IFN-γ producing cells and CD4+ T cell proliferation when compared to mice immunized with a mAb without receptor affinity or with the non-targeted ASP-2 protein. The strong immune response induced in mice immunized with the hybrid αDEC-ASP2 mAb allowed us to identify an ASP-2-specific CD4+ T cell epitope recognized by the BALB/c MHCII haplotype. We conclude that targeting parasite antigens to DCs is a useful strategy to enhance T cell mediated immune responses facilitating the identification of new T-cell epitopes.

Introduction

The potent induction of adaptive immunity provided by DCs is related to at least three innate features these cells possess: (1) they have special mechanisms for antigen capture and processing, (2) once the pathogen is taken up, they migrate to lymphoid organs where the T cells mainly reside, and (3) they rapidly mature in response to a variety of stimuli produced by either the pathogen (pathogen recognition patterns, for example) or by the innate immune response to it (cytokines, innate lymphocytes, immune complexes, among others) [1]. These features can now be harnessed to improve T cell responses against a particular pathogen derived protein. This is accomplished when the sequence of a protein of interest is fused into mAbs that efficiently and specifically target DC receptors *in situ* [2]. The result is the generation of a hybrid

Apêndice D

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | NEGLECTED TROPICAL DISEASES

Targeting the Non-structural Protein 1 from Dengue Virus to a Dendritic Cell Population Confers Protective Immunity to Lethal Virus Challenge

Hugo R. Henriques^{1,2}, Eline V. Rampazo^{1,2}, Antonio J. S. Gonçalves², Elaine C. M. Vicentin¹, Jaime H. Amorim³, Raquel H. Panatieri¹, Kelly N. S. Amorim¹, Marcio M. Yamamoto¹, Luis C. S. Ferreira^{3,4}, Ada M. B. Alves^{2,4}, Silvia B. Boscardin^{1,4*}

1 Laboratory of Antigen Targeting to Dendritic Cells, Department of Parasitology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Laboratory of Biotechnology and Physiology of Viral Infections, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Laboratory of Vaccine Development, Department of Microbiology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **4** National Institute for Science and Technology in Vaccines, Belo Horizonte, Brazil

Abstract

Dengue is the most prevalent arboviral infection, affecting millions of people every year. Attempts to control such infection are being made, and the development of a vaccine is a World Health Organization priority. Among the proteins being tested as vaccine candidates in preclinical settings is the non-structural protein 1 (NS1). In the present study, we tested the immune responses generated by targeting the NS1 protein to two different dendritic cell populations. Dendritic cells (DCs) are important antigen presenting cells, and targeting proteins to maturing DCs has proved to be an efficient means of immunization. Antigen targeting is accomplished by the use of a monoclonal antibody (mAb) directed against a DC cell surface receptor fused to the protein of interest. We used two mAbs (αDEC205 and αDCIR2) to target two distinct DC populations, expressing either DEC205 or DCIR2 endocytic receptors, respectively, in mice. The fusion mAbs were successfully produced, bound to their respective receptors, and were used to immunize BALB/c mice in the presence of polyribinosinic: polyribocytidylic acid (poly I:C), as a DC maturation stimulus. We observed induction of strong anti-NS1 antibody responses and similar antigen binding affinity irrespectively of the DC population targeted. Nevertheless, the IgG1/IgG2a ratios were different between mouse groups immunized with αDEC-NS1 and αDCIR2-NS1 mAbs. When we tested the induction of cellular immune responses, the number of IFN-γ producing cells was higher in αDEC-NS1 immunized animals. In addition, mice immunized with the αDEC-NS1 mAb were significantly protected from a lethal intracranial challenge with the DENV2 NGC strain when compared to mice immunized with αDCIR2-NS1 mAb. Protection was partially mediated by CD4⁺ and CD8⁺ T cells as depletion of these populations reduced both survival and morbidity signs. We conclude that targeting the NS1 protein to the DEC205⁺ DC population with poly I:C opens perspectives for dengue vaccine development.

Citation: Henriques HR, Rampazo EV, Gonçalves AJ, Vicentin ECM, Amorim JH, et al. (2013) Targeting the Non-structural Protein 1 from Dengue Virus to a Dendritic Cell Population Confers Protective Immunity to Lethal Virus Challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 7(7): e2330. doi:10.1371/journal.pntd.0002330

Editor: Mary Ann McDowell, University of Notre Dame, United States of America

Received: November 22, 2012; **Accepted:** June 12, 2013; **Published:** July 18, 2013

Copyright: © 2013 Henriques et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq)/National Institutes of Science and Technology in Vaccines (INCTV, 15203/12), São Paulo State Research Funding Agency (FAPESP, 2007/08648-9, 2011/51761-6), BNP-Paribas Bank and Rio de Janeiro State Research Funding Agency (FAPERJ). HRH and JHA received fellowships from FAPESP (2010/03079-9 and 2009/5033-7) and EVR received a fellowship from CAPES. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: sboscardin@usp.br

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Dengue fever is a mosquito-borne disease caused by four distinct viral serotypes (DENV1, 2, 3 and 4) [1,2]. Over the past few decades, the alarming growth in the number of cases as well as the increase in the incidence of more serious clinical forms of the disease, the dengue hemorrhagic fever (DHF) or the dengue shock syndrome (DSS), have led the World Health Organization to prioritize the development of a dengue vaccine [1,2]. Various formulations and vaccine antigens are currently under clinical evaluation or preclinical development [3–5]. Among the virus proteins that can induce protective immunity in experimental conditions is the non-structural protein 1 (NS1). NS1 is a 43–48 kDa

glycoprotein expressed in infected cells and present on the cell membrane in dimeric form, but can also be secreted in dimeric and hexameric forms [6–8]. Anti-NS1 antibodies, which are normally detected at the beginning of a dengue infection, along with the secreted protein, are currently used in disease diagnosis [8,9]. Anti-NS1 antibodies generated in infected individuals have been demonstrated to fix complement components leading to elimination of infected cells [10]. On the other hand, others have shown that anti-NS1 antibodies can cross react with platelets and endothelial cells and, thus, interfere with platelet aggregation and cause endothelial cell damage [11–13]. Despite the conflicting reports regarding the role of NS1 in the prevention of the disease, promising results were obtained with vaccine formulations