FERNANDO BANDEIRA SULCZEWSKI

Mecanismo de Geração de Resposta Imune Humoral Induzida pelo Direcionamento do Antígeno MSP1₁₉PADRE para Duas Populações Distintas de Células Dendríticas via Receptores DEC205 e DCIR2

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin
Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa

Versão original

São Paulo
2017

RESUMO

SULCZEWSKI, F.B. **Mecanismo de geração de resposta imune humoral induzida pelo direcionamento do antígeno MSP1₁₉PADRE para duas populações distintas de células dendríticas via receptores DEC205 e DCIR2.** [104 páginas. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2017.

As células dendríticas (DCs) são células do sistema imune inato que são especializadas na instrução de repostas imunes adaptativas. Entretanto, há vários subtipos de DCs com diferentes biológicas e especializações que podem igualmente instruir respostas distintas. No baço murino, as DCs convencionais podem ser classificadas em CD8 α ⁺ e CD8 α ⁻. As DCs CD8 α ⁺ expressam o receptor endocítico DEC205 e são especializadas na apresentação cruzada de antígenos. Por outro lado, as DCs CD8 α ⁻ expressam outro receptor endocítico conhecido como DCIR2 e são principalmente associadas à apresentação de antígenos pela via fagocítica. Anticorpos monoclonais (mAbs) α DEC205 e α DCIR2 conjugados a proteínas antigênicas estão sendo largamente utilizados como estratégia de direcionamento de antígenos para as DCs CD8 α ⁺ e CD8 α ⁻. Este trabalho tem como objetivo analisar as respostas imunes celular e humoral induzidas pelo direcionamento de uma proteína modelo para esses dois subtipos de DCs via os receptores DEC205 e DCIR2 após a administração de uma ou duas doses dos mAbs chiméricos. Foi utilizado o antígeno quimérico MSP1₁₉PADRE conjugado aos mAbs α DEC205 e α DCIR2 juntamente com Poly I:C como adjuvante. A montagem das respostas celular e humoral foi analisada 3, 4, 5 e 6 dias após a imunização para avaliar a resposta inicial e 3, 4, 5 e 6 dias depois da segunda dose para estudar a influência do segundo contato com o antígeno na resposta imune induzida pelo direcionamento de antígenos para cada subtipo de DC. Os resultados obtidos após a administração da primeira dose mostraram que o direcionamento de antígenos para o subtipo de DCs CD8 α ⁻ induz uma robusta resposta humoral. Houve um aumento no número de células T auxiliares foliculares (T_{FH}) e células B do centro germinativo (CG), bem como de plasmócitos. Em contrapartida, o direcionamento para o subtipo de DCs CD8 α ⁺ induziu um maior número de células produtoras de IFN- γ e células T CD4⁺ polifuncionais. Já em relação à resposta secundária, o direcionamento de antígenos para as DCs CD8 α ⁻ promoveu mudança de classe de IgG e a produção de citocinas com um perfil de resposta auxiliar Th2/Th17. Já quando o antígeno foi direcionado para as DCs CD8 α ⁺, houve um aumento progressivo de células T produtoras de IFN- γ , IL-2 e TNF- α , juntamente com células T produtoras somente de IL-10. Além disso, os títulos de anticorpos contra a proteína MSP1₁₉ aumentaram depois da segunda dose e ocorreu uma mudança de classe de IgGs. Também houve um aumento de duas populações de células T_{FH} (CXCR5^{High}PD-1^{High} e CXCR5^{Inter}PD-1^{Inter}) quando o antígeno foi direcionado via DEC205, mas não houve aumento de células B do centro germinativo no período de tempo analisado. Pode-se concluir que o direcionamento de antígenos para DCs CD8 α ⁻ induz inicialmente uma forte resposta humoral, sugerindo que essas DCs são especializadas na instrução de células T_{FH}. Porém, após a administração da segunda dose do mAb de fusão há a instrução de uma resposta Th2/Th17. Já o direcionamento de antígenos para DCs CD8 α ⁺ induz inicialmente uma forte resposta Th1, indicando que essas DCs são especializadas na instrução desse perfil de resposta auxiliar. Apesar disso, após a segunda imunização há a diferenciação de células T_{FH}.

Palavras-chave: Células Dendríticas. Direcionamento de antígenos. Subtipos de DCs. Resposta imune celular. Resposta imune humoral.

ABSTRACT

SULCZEWSKI, F.B. **Mechanism of generation of humoral immune response induced by targeting of MSP1₁₉PADRE antigen to two different subsets of dendritic cells via DEC205 and DCIR2 receptors** [104 p. Master Thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2017.

Dendritic cells (DCs) are cells of innate immune system specialized in priming adaptive immune responses. However, there are several DCs subsets with different biology and specializations to prime T cells. In the murine spleen, conventional DCs can be classified into CD8 α ⁺ and CD8 α ⁻. CD8 α ⁺ DCs express the DEC205 endocytic receptor and are specialized in antigen cross-presentation. On the other hand, CD8 α ⁻ DCs express another endocytic receptor known as DCIR2 and are mainly associated with the presentation of antigens by the phagocytic pathway. Monoclonal antibodies (mAbs) α DEC205 and α DCIR2 conjugated to antigenic proteins are widely used to target antigens to CD8 α ⁺ and CD8 α ⁻ DCs. This study aims to analyze the cellular and humoral immune responses induced by the targeting of a model protein to these two DCs subsets via the DEC205 and DCIR2 receptors after the administration of one or two doses of the chimeric mAbs. The MSP1₁₉PADRE chimeric antigen was conjugated to mAbs α DEC205 and α DCIR2 and Poly I: C was used as an adjuvant. The humoral and cellular responses were analyzed 3, 4, 5 and 6 days after the immunization to evaluate the initial response and 3, 4, 5 and 6 days after the second dose to study the influence of the second contact with the antigen on the immune response induced by antigen targeting to each DC subtype. The results obtained after the administration of the first dose showed that antigen targeting to CD8 α ⁻ DCs induces a robust humoral response. In addition, there was an increase in the number of follicular helper T cells (T_{FH}) and germinal center (CG) B cells, as well as in plasma cells. In contrast, antigen targeting to CD8 α ⁺ DCs induced a greater number of IFN- γ -producing cells and polyfunctional CD4⁺ T cells. When the secondary response was considered, antigen targeting to CD8 α ⁻ DCs promoted IgG class switch and the production of cytokines with a Th2/Th17 helper profile. When the antigen was targeted to CD8 α ⁺ DCs, there was a progressive increase of IFN- γ , IL-2 and TNF- α producing T cells together with T cells producing only IL-10. In addition, the antibody titres to the MSP1₁₉ protein increased after the second dose, and a IgG class switch also happened. There was also an increase in two T_{FH} cell populations (CXCR5^{High}PD-1^{High} and CXCR5^{Inter}PD-1^{Inter}) when the antigen was targeted via DEC205, but there was no increase of germinal center B cells in the time period analyzed. We can conclude that antigen targeting to CD8 α ⁻ DCs initially induces a strong humoral response, suggesting that these cells are specialized in the instruction of T_{FH}. However, after the administration of the second dose of the fusion mAb, there is the instruction of a Th2 / Th17 response. On the other hand, antigen targeting to CD8 α ⁺ DCs initially induces a strong Th1 response, indicating that these cells are specialized in the instruction of this auxiliary response profile. Nevertheless, after the second immunization, differentiation of T_{FH} cells occurs.

Keywords: Dendritic cell, Antigen targeting, DC subsets, Cellular immune response, Humoral immune response.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células Dendríticas

As células dendríticas (DCs) são células de resposta imune inata que estão associadas com a instrução e a promoção da resposta imune adaptativa, fazendo a interação entre esses dois sistemas (STEINMAN, 2007). Essas células são as principais células apresentadoras de antígenos (APCs), sendo especializadas na instrução de células T virgens em células efetoras. Dessa forma, as DCs reconhecem, processam e apresentam os antígenos complexados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, fornecendo os três sinais necessários para a eficiente ativação das células T (MELLMAN ;STEINMAN, 2001). Assim, as DCs são fundamentais para a geração das respostas mediadas por células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ e, direta ou indiretamente, células B (GUERMONPREZ et al., 2002; MACLENNAN ;VINUESA, 2002).

Por outro lado, as DCs também estão relacionadas com a indução de respostas imunes tolerogênicas. Essas células, na ausência de inflamação, apresentam antígenos próprios às células T instruindo-as a um perfil de células regulatórias (YAMAZAKI et al., 2007). Elas fagocitam células mortas permanecendo imaturas (sem aumentar a expressão de moléculas co-estimulatórias) (SAUTER et al., 2000). A apresentação desses antígenos próprios a linfócitos T na ausência dos sinais co-estimulatórios promove a tolerância imunológica na periferia (STEINMAN et al., 2000). Deste modo, as DCs regulam as respostas imunes sendo consideradas como um ponto de controle e regulação da resposta adaptativa (BANCHEREAU ;STEINMAN, 1998).

Além disso, as DCs são células migratórias, elas se diferenciam a partir de precursores na medula óssea e migram para diferentes regiões no organismo, estando presentes no sangue, em tecidos linfoides como, timo, baço, linfonodo e em tecidos não linfoides como fígado, rim, pele e pulmão (AMORIM;CHAGAS; et al., 2016). Nestes locais, as DCs terminam seu processo de diferenciação, mas ainda permanecem imaturas, expressando baixos níveis de CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40 e MHC II (DUDEK et al., 2013). Sua maturação completa ocorre somente após o contato com um antígeno e/ou com ligantes de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) e citocinas, levando ao aumento da expressão de CD80, CD86, CD40 e MHC II e à migração para órgãos linfoides secundários, onde ocorre a apresentação de antígenos (MUNZ;STEINMAN ;FUJII, 2005; TOMURA et al., 2014).

Os PRRs são amplamente expressos pelas DCs e estão relacionados com sua função de reconhecer patógenos ou danos (isto é, inflamação) e maturar na presença desses

estímulos, por meio da ligação desses PRRs com os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a dano (DAMPs) (TAKEDA;KAISHO ;AKIRA, 2003). O grupo de PRRs mais conhecidos são os receptores do tipo *Toll* (TLRs), presentes na membrana externa (TLR1/2, TLR4, TLR5 e TLR2/6, TLR10, TLR11, TLR12, TLR13) e na membrana endossomal (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) dessas células (KAWAI ;AKIRA, 2010). A ligação desses receptores com seus ligantes promove a maturação da DC fazendo com que ela, além de migrar para o linfonodo, produza citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-12 e interferon (IFN) do tipo I amplificando a resposta inata e influenciando a resposta adaptativa (IWASAKI ;MEDZHITOV, 2015; PULENDRAN ;AHMED, 2006).

Contudo, as DCs não são uma linhagem homogênea de células, pelo contrário, há diversos subtipos que podem ser classificados de acordo com marcadores de membrana e sua função. Basicamente, elas podem ser classificadas em plasmocitoides e convencionais (SHORTMAN ;LIU, 2002). As DCs plasmocitoides (pDCs) são células especializadas na expressão de IFN do tipo I, respondendo rapidamente e eficientemente a infecções virais (COLONNA;TRINCHIERI ;LIU, 2004). As DCs convencionais (cDCs) estão principalmente associadas a apresentação de antígenos e a instrução de células T. Dependendo da localização anatômica das cDCs, elas podem ser divididas em outros subtipos, como na pele onde há as células de Langerhans e as DCs dermais e no baço, onde elas podem ser subdivididas pela expressão da cadeia alfa da molécula CD8 (DCs CD8 α^+ e CD8 α^-) (KLECHEVSKY et al., 2008; STEINMAN, 2003).

1.1.1 Ontogenia e classificação de DCs

O processo de ontogenia de DCs ainda não foi completamente elucidado. Em termos gerais, sabe-se que as DCs originam-se a partir de células mieloides da medula óssea conhecidas como precursores mieloides comuns (CMPs) (MERAD et al., 2013). Os CMPs diferenciam-se em precursores de DCs e macrófagos (MDPs) que originam duas linhagens atualmente consideradas completamente distintas: a linhagem de DCs e a linhagem de monócitos (FOGG et al., 2006). A linhagem monocítica inicia-se com a diferenciação do MDP para o precursor comum de monócitos (cMoP). O cMoP está associado à ontogenia de monócitos, macrófagos e células inflamatórias derivadas de monócitos e macrófagos, na qual

se encontram células $CD11c^+$, anteriormente conhecidas como DCs derivadas de monócitos (GUILLIAMS et al., 2014). Já a linhagem de DCs inicia-se pela diferenciação dos MDPs para os precursores comuns de DCs (CDPs). Os CDPs diferenciam-se em células conhecidas como pré-DCs que finalizam o processo de diferenciação para DCs imaturas (POLTORAK ;SCHRAML, 2015). Além disso, sabe-se que as pDCs e as cDCs possuem ontogenias distintas. Os CDPs pode dar origem a pré-pDCs ou a pré-cDCs e estes se diferenciam para pDCs e cDCs, respectivamente (DIAO et al., 2004).

As pré-cDCs podem sair da medula óssea e serem encontradas no sangue, terminando sua diferenciação no tecido, onde passam a expressar diferentes marcadores fenotípicos (BRETON et al., 2015; WU ;LIU, 2007). Classicamente, as cDCs são subdividas em diferentes subtipos baseados na expressão desses marcadores, como citado anteriormente. Entretanto, recentemente está sendo proposta uma nova classificação das cDCs de acordo com sua ontogenia, pois a identidade funcional dessas células é determinada pelo seu processo de diferenciação (HEIDKAMP et al., 2016). Fundamentado na subdivisão clássica das cDCs pela expressão da cadeia alfa da molécula CD8 no baço e de CD103 nos órgãos não linfoides de camundongos, e com base em sua ontogenia, as cDCs foram ainda chamadas de cDC tipo 1 (cDCs1) (DCs $CD8\alpha^+$ ou $CD103^+$) e cDCs tipo 2 (cDCs2) (DCs $CD8\alpha^- CD11b^+$) (GUILLIAMS et al., 2014).

Guilliams e colaboradores (2014) fundamentaram essa classificação pelos fatores de transcrição expressos durante a diferenciação. As cDCs1 se diferenciam pela expressão dos fatores *IFN-regulatory factor 8* (IRF8), *DNA-binding protein inhibitor ID2*, *basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like 3* (BATF3) e *nuclear factor interleukin (IL)-3 regulated protein* (NFIL3). Já as cDCs2 expressam RELB63, PU, *recombining binding protein suppressor of hairless* (RBPJ) e IRF4. Inclusive, IRF8 vem sendo associado como o fator de transcrição responsável pela diferenciação final de cDCs1 e IRF4 de cDCs2 (BAJANA et al., 2016; SICHIEEN et al., 2016).

Com isso, uma nova estratégia de identificação das DCs também está sendo proposta. De acordo com a expressão de marcadores de superfície e dos fatores de transcrição, as cDCs podem ser identificadas independentemente do tecido, sendo consideradas cDCs1 as células $MHCII^+F4/80^-CD64^-CD11c^+CD26^+XCR1^{hi}CD172a^{lo}IRF8^{hi}IRF4^{lo}$ e cDCs2 as células $MHCII^+F4/80^-CD64^-CD11c^+CD26^+XCR1^{lo}CD172a^{hi}IRF8^{lo}IRF4^{hi}$ para camundongo, substituindo o marcador XCR1 por CAM1 em humanos e outros primatas (GUILLIAMS et al., 2016). Entretanto, a expressão desses marcadores não são as únicas diferenças entre essas duas populações de cDCs, já que elas apresentam perfis transicionais diferentes e

característicos de cada população que demonstram suas identidades celulares específicas (GUILLIAMS et al., 2016; SEE et al., 2017).

Além disso, nos últimos anos foram identificadas em camundongos e humanos populações de pré-cDCs que já estão comprometidas com a diferenciação para cDC1 e cDC2, sendo existe já uma pré-cDC que se diferencia em pré-cDC1 ou em pré-cDC2, originando posteriormente a cDC1 e a cDC2, respectivamente (SCHLITZER et al., 2015; SEE et al., 2017). Dessa forma, a pré-cDC seria instruída para tornar-se uma cDC1 ou uma cDC2, porém esse processo ainda não foi caracterizado. A figura 1 sintetiza a ontogenia de DCs mostrando que as cDCs1 e as cDC2 se diferenciam por vias distintas.

Figura 1 - Ontogenia de diferentes subtipos de DC. Esquema de classificação baseado na ontogenia das DCs. A célula-tronco hematopoética diferencia-se em precursor mieloide comum (CMPs) que origina o precursor comum de monócitos (CMoP) e o precursor comum de DC (CDP). O CDP se diferencia em pré-DC que pode ser pré-pDC que posteriormente se diferencia em pDC ou pré-cDC. Essa pré-DC pode originar tanto pré-cDC1 que dará origem a cDC1 quanto a pré-cDC2 que se diferencia em cDC2.

1.1.2 DCs CD8 α ⁺

As DCs CD8 α ⁺ são cDCs1 presentes nos órgãos linfoides como o baço e o linfonodo de camundongos, sendo histologicamente localizadas na zonas de células T (CROZAT et al., 2011; DUDZIAK et al., 2007). Essas células são especializadas na apresentação cruzada de antígenos para células T, sendo capazes de fagocitar células mortas e apresentar antígenos para células T CD4⁺ e T CD8⁺ simultaneamente, processo fundamental na indução de imunidade em infecções virais (ALLAN et al., 2003; IYODA et al., 2002). As DCs CD8 α ⁺ possuem uma maquinaria especializada nesse processo de apresentação de antígenos, expressando inclusive Clec9a, um receptor para células necróticas (SANCHO et al., 2009). Além disso, esse subtipo de DC está envolvido com a manutenção da tolerância periférica, na ausência de inflamação e sinais de danos, as DCs CD8 α ⁺ são especializadas na instrução de células T reguladoras (YAMAZAKI et al., 2008).

As DCs CD8 α ⁺ também expressam em sua membrana o receptor endocítico DEC205, também chamado de CD205 (JIANG et al., 1995). Ele é membro da família de receptores de lectinas do tipo C, apresentando diversas funções, entre elas a captura e a internalização de antígenos que se ligam a ele (MAHNKE et al., 2000). Além disso, ele realiza a endocitose pela via de endossomos tardios, o que favorece ainda mais a apresentação cruzada de antígenos, estimulando tanto a via de MHC de classe I quanto a via de MHC de classe II, possibilitando a instrução tanto de células T CD8⁺ quanto de T CD4⁺, respectivamente (BONIFAZ et al., 2002).

1.1.3 DC CD8 α ⁻

As DCs CD8 α ⁻ também estão presentes no baço e nos linfonodos de camundongos mas, diferentemente das DCs CD8 α ⁺, estão localizadas nas zonas marginais às células B na polpa vermelha do baço (SHIN et al., 2016). Estas células, além de serem negativas para a cadeia alfa da molécula CD8, expressam o marcador de superfície CD11b, sendo consideradas cDC2. As DCs CD8 α ⁻ são especializadas em apresentação de antígenos via MHC de classe II, sendo principalmente associadas à instrução de respostas T auxiliares com um perfil Th2 (DUDZIAK et al., 2007).

Além desses marcadores, as DCs CD8 α também expressam outro receptor endocítico, o DCIR2, que é um receptor de superfície que também pertence à família das lectinas do tipo C (NUSSENZWEIG et al., 1982). Quando este receptor se liga a algum antígeno, ele também estimula a sua internalização. Assim, a ação do DCIR2 na captura do antígeno pela DC é importante para o início da resposta inata que culminará na ativação da resposta imune específica contra os antígenos endocitados (STEINMAN, 2007).

1.2 Resposta de celular induzida por DCs

As DCs exercem um papel central na indução de respostas adaptativas celulares. Na verdade, elas são especializadas na instrução de linfócitos T a se tornarem efetores (STEINMAN, 2007). Como APCs, as DCs interagem diretamente com as células T a partir de várias ligações entre receptores e seus ligantes e indiretamente via secreção de citocinas em processo conhecido como sinapse imunológica (DUSTIN, 2014). A sinapse imunológica é a interface de contato entre a APC e a célula T, sendo que na região central há a interação entre o receptor de células T (TCR) com o MHC da APC, uma região conhecida como complexo de ativação supramolecular central. Na região periférica da sinapse imunológica ocorre também a ligação de integrinas e moléculas coestimulatórias e seus ligantes, formando o complexo de ativação supramolecular periférico (DUSTIN;CHAKRABORTY ;SHAW, 2010). Essas ligações fornecem e amplificam os sinais que levam a indução de proliferação e ativação da célula T (HUPPA et al., 2003). No entanto, o estado de maturação da DC influencia o tempo de duração da sinapse imunológica, sendo que DCs maduras realizam sinapses mais longas que DCs imaturas (BENVENUTI et al., 2004). Além disso, o sinal de diferentes moléculas co-estimulatórias influencia a sinapse e a instrução da célula T (CHOI et al., 2011; SAITO;YOKOSUKA ;HASHIMOTO-TANE, 2010).

As DCs podem apresentar antígenos tanto via MHC de classe I quando MHC de classe II por meio de sinapses com células T CD8⁺ e T CD4⁺, respectivamente (SAVINA ;AMIGORENA, 2007). Dessa forma, além de instruir a reposta de células auxiliares, as DCs podem influenciar a sua polarização (KAPSENBERG, 2003). As citocinas e as moléculas co-estimulatórias expressas pelas DCs durante a sinapse influenciam a polarização dessa resposta: por exemplo, a IL-12 está associada à instrução da resposta Th1 enquanto que a expressão de ICOSL associa-se a indução de células auxiliares foliculares (ATHIE-

MORALES et al., 2004; CHOI et al., 2011). A figura 2 mostra as diferentes polarizações e as citocinas envolvidas na promoção de cada resposta. As principais polarizações são Th1 (induzidas principalmente por IL-12), Th2 (induzidas principalmente por IL-4), Th17 (IL-6 e TGF- β), T_{FH} (IL-6 e IL-21) e T_{Reg} (TGF- β) (ZHU;YAMANE ;PAUL, 2010).

Figura 2 - Polarização da resposta de células T auxiliares. Diferentes polarizações da resposta de células T auxiliares. As células T virgens, durante, em um processo de apresentação de antígeno, recebem sinais da APC que instruem sua polarização para Th1 (IL-12, IL-18 IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-2), Th17 (IL-6, TGF- β), Th22 (IL-6, TNF- α), Treg (TGF- β), T_{FH} (IL-6 e IL21) e Th9 (TGF- β). Fonte: (CARBO et al., 2014) (Adaptada).

Recentemente, vem sendo estudada a influência do subtipo da DC na polarização da resposta de células T CD4⁺. As cDCs2, por exemplo, vem sendo associadas a instrução de células Th17 enquanto que as cDCs1, principalmente as DCs CD8 α ⁺, estão relacionadas com a resposta Th1 (SCHLITZER et al., 2013; SOARES et al., 2007). Dessa forma, cada subtipo de DCs especificamente apresenta características intrínsecas a sua própria biologia que garantem a sua especialização na indução de uma polarização de células T CD4⁺ (SHIN et al.,

2016). Essas características podem ser desde a expressão de TLRs e sua ativação frente aos seus ligantes ou, até mesmo, as expressões de diferentes moléculas co-estimulatórias, citocinas, vias de sinalização e fosforilação intracelulares e outros mecanismos dependentes do subtipo de DC (LI et al., 2016; NAPOLITANI et al., 2005; SHIN et al., 2015).

1.3 Influência de DCs na Resposta Humoral

A produção de anticorpos neutralizantes de alta afinidade é fundamental para a eficiência de uma vacina na proteção contra o estabelecimento de uma doença infecciosa e principalmente na resposta imune induzida por um agente infeccioso (AMANNA ;SLIFKA, 2011). Para que isso ocorra com antígenos proteicos utilizados em uma vacina é fundamental a ativação tanto de células B quanto de células T $CD4^+$ (TARLINTON ;LEW, 2007). Assim, as DCs estão envolvidas com a indução da produção de anticorpos, pois elas são responsáveis pela instrução das células T $CD4^+$ que se diferenciam em células T foliculares auxiliares (T_{FH}), ou com outras polarizações que auxiliam a resposta humoral (SAHAY et al., 2013). Além disso, as DCs também produzem o fator de ativação de célula B BAFF estimulando diretamente as células B (MACLENNAN ;VINUESA, 2002).

As células T_{FH} são células T $CD4^+$ que passaram a expressar CXCR5 e PD-1 e assim podem migrar para o interior dos folículos e na região de células B, formando estruturas conhecidas como centros germinativos (CG) (MA et al., 2012). Essas células são, na verdade, uma polarização da resposta auxiliar especializada na estimulação dos linfócitos B, secretando IL-21 e promovendo a proliferação e ativação de células B, bem como a produção de anticorpos neutralizantes de alta avidez (PEREZ-MAZLIAH et al., 2015; WEINSTEIN et al., 2016). As células T_{FH} se diferenciam pela ação do fator de transcrição Bcl-6 e pela diminuição da expressão de blimp-1 que juntos promovem a polarização dessas células (JOHNSTON et al., 2009). As DCs são as principais células a fornecerem os sinais para a diferenciação das T_{FH} , pois elas expressam ICOSL e OX40L que estimulam a expressão de Bcl-6 via fosforilação de STAT3 (TAHILIANI et al., 2017; UENO et al., 2010).

O CG é uma estrutura presente em órgãos linfoides secundários, caracterizado pela presença de células B, células T_{FH} e DCs foliculares. É onde ocorre o aumento da afinidade do receptor das células B (BCR) com o antígeno e a mudança de classe de isotipo (TAS et al.,

2016). O CG é formado pela zona clara onde localizam-se as células T_{FH} e a zona escura onde há uma intensa proliferação de células B, havendo entre essas duas zonas, um fluxo de células que mantém essas estruturas extremamente dinâmicas (VICTORA ;MESIN, 2014). Na zona escura, juntamente com a proliferação, ocorre a hipermutação somática que leva ao aumento da afinidade ao antígeno (MESIN;ERSCHING ;VICTORA, 2016). As células que proliferam, migram posteriormente para a zona clara, local onde interagem com as DCs foliculares e com as células T_{FH} para serem selecionadas de acordo com sua afinidade (VICTORA et al., 2010). As células B de alta afinidade recebem um sinal de sobrevivência fornecido principalmente via CD40-CD40L, podendo então diferenciar-se em plasmócitos ou células B de memória. Já as células de baixa afinidade retornam para a zona escura para sofrer novamente hipermutação somática (VICTORA ;NUSSENZWEIG, 2012). Assim, o CG é responsável pela diferenciação de células produtoras de anticorpos de alta aversez bem como pela formação de células B de memória (Figura 3).

Figura 3 - Reação do centro germinativo. As células B ativadas formam o centro germinativo migrando pela zona escura, onde proliferam intensamente e sofrem hipermutação somática. As células migram então para a zona clara onde são selecionadas positivamente e se diferenciam em plasmócitos ou em células B de memória. Se essas células receberem um sinal fraco de sobrevivência, elas retornam para a zona escura para

sofrerem novamente hipermutação somática e se não receberam sinal de sobrevivência, entram em apoptose. Fonte: (DE SILVA ;KLEIN, 2015) (Adaptado)

1.4 Direcionamento de Antígenos para DCs

O direcionamento de antígenos para DCs consiste basicamente de uma estratégia de enviar antígenos diretamente para essas células. Geralmente, os antígenos são complexados a anticorpos ou acoplados a algum ligante de receptores que são expressos na membrana da DCs, sendo assim direcionados até essas células (MACRI et al., 2016). Essa estratégia vem sendo aplicada no desenvolvimento de vacinas com o enfoque de geração de uma resposta imune específica a um antígeno de interesse, de acordo com a biologia da DC e a capacidade que ela possui de instruir células T (STEINMAN, 2008). Há vários receptores expressos na superfície da DC que vem sendo alvo para o direcionamento de antígenos, sendo os mais utilizados o DEC205, o DCIR2, o Clec9A e até mesmo os receptores da porção constante dos anticorpos (receptores Fc) (APOSTOLOPOULOS et al., 2013).

Dessa forma, dependendo do receptor que a DC expressa, pode-se direcionar antígenos especificamente para um subtipo DC, como é o caso das DCs murinas linfoides $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$. Para o direcionamento de antígenos para as DCs $CD8\alpha^+$ pode-se utilizar um anticorpo para o receptor DEC205 e para as DCs $CD8\alpha^-$, um anticorpo para o receptor DCIR2 (LEHMANN et al., 2016). Essa estratégia foi desenvolvida a partir de 2000 com a produção dos anticorpos monoclonais α DEC205 e α DCIR2 e, desde então, vem demonstrando resultados bastante promissores na criação e otimização de vacinas contra agentes infecciosos e câncer (STEINMAN, 2012). O anticorpo NLDC-145 liga-se especificamente ao receptor DEC205 altamente expresso por DCs $CD8\alpha^+$, já o anticorpo monoclonal 33D1 liga-se ao receptor DCIR2 nas DC $CD8\alpha^-$ (JIANG et al., 1995; NUSSENZWEIG et al., 1982).

A administração *in vivo* dos anticorpos NLDC-145 (α DEC205) e 33D1 (α DCIR2) promove a ligação do α DEC205 nas DCs $CD8\alpha^+$ esplênicas, bem como em células B, NK e em outros granulócitos e do α DCIR2 somente às DCs $CD8\alpha^-$ (IDOYAGA et al., 2011). Imunizações com a utilização de ambos os anticorpos conjugados a antígenos têm mostrado resultados que indicam a indução de fortes respostas adaptativas aos antígenos e inclusive proteção a desafios com patógenos (AMORIM;RAMPAZO; et al., 2016; APOSTOLICO et al., 2017; BOSCARDIN et al., 2006; CHAPPELL et al., 2012; DO et al., 2010; DUDZIAK et al., 2007; HENRIQUES et al., 2013; RAMPAZO et al., 2015; SHIN et al., 2015).

Na realidade, o primeiro estudo de direcionamento de antígeno para a DC $CD8\alpha^+$ foi realizado em 2001 por Hawiger e colaboradores. Nesse estudo, utilizaram a lisozima de ovo de galinha como antígeno modelo complexada ao α DEC205. Sua administração *in vivo* seletivamente estimulou as DCs $CD8\alpha^+$ a instruir uma resposta específica de células T (HAWIGER et al., 2001). Já Bonifaz e colaboradores em 2002 usaram a ovalbumina conjugada ao mesmo anticorpo, mostrando que as DCs $CD8\alpha^+$ eficientemente podem processar e apresentar o antígeno via MHC de classe I à células T $CD8^+$ (BONIFAZ et al., 2002). Por outro lado, a imunização com o anticorpo 33D1 teve precedentes em 1996 quando Finkelman e colaboradores injetaram diretamente o anticorpo de ratos em camundongo e verificaram uma robusta resposta humoral, porém ainda sem saber qual era o alvo desse anticorpo (FINKELMAN et al., 1996).

Esses primeiros resultados indicaram que na ausência de estímulo inflamatório, quando a DC está imatura, o direcionamento de antígeno para a DC $CD8\alpha^+$ induz uma resposta de tolerância ao antígeno, e esses resultados foram sistematicamente confirmados (BONIFAZ et al., 2002; ETTINGER et al., 2012; FINKELMAN et al., 1996; PETZOLD et al., 2012; SPIERING et al., 2015). Contudo, na presença de um adjuvante e inflamação, o direcionamento do mesmo antígeno para essa DC induz uma forte resposta de células T (BONIFAZ et al., 2002; BONIFAZ et al., 2004; HENRIQUES et al., 2013; RAMPАЗO et al., 2015).

Os primeiros indícios referentes ao direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^-$ via DCIR2 mostravam que na ausência de um estímulo inflamatório a imunização com α DCIR2 era capaz de induzir células efectoras (CHAPPELL et al., 2012; FINKELMAN et al., 1996).. Contudo, revelou-se que na ausência de adjuvante a resposta de células T era apenas de curta duração, sendo necessário um estímulo inflamatório para a maturação da DC e promoção de uma resposta duradoura (DUDZIAK et al., 2007).

O α CD40 é um dos adjuvantes mais frequentemente utilizados nos protocolos de imunização que envolvem o direcionamento de antígenos para as DCs $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$. Ele se liga diretamente no CD40 promovendo o aumento da expressão das moléculas co-estimulatórias (BONIFAZ et al., 2004; BOSCARDIN et al., 2006; DUDZIAK et al., 2007; HEATH;WU ;HOWARD, 1994). Além disso, ligantes de TLR também são utilizados, sendo o mais frequente o Poly I:C que liga-se nos receptores TLR3 e MDA-5 (AMORIM;RAMPАЗO; et al., 2016; HENRIQUES et al., 2013; RAMPАЗO et al., 2015; SHIN et al., 2016; SHIN et al., 2015). Na realidade, a administração de Poly I:C no direcionamento de antígenos via DEC205 tem se mostrado como o melhor adjuvante a ser

utilizado na indução de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ (TEWARI et al., 2010; TRUMPFHELLER et al., 2008). O Poly I:C induz uma produção sistêmica de IFN do tipo I, principalmente pelas células NK, que amplificam a maturação das DCs, promovendo uma reposta Th1 (LONGHI et al., 2009).

A caracterização e a validação da estratégia de direcionamento para DCs foi realizada com a utilização de antígenos modelos e, em algumas ocasiões, animais transgênicos. (BONIFAZ et al., 2002; BONIFAZ et al., 2004; BOSCARDIN et al., 2006; DUDZIAK et al., 2007). Os resultados desses trabalhos possibilitaram o uso de antígenos de relevância clínica em sistemas abertos com a utilização de camundongos selvagens. Inúmeros antígenos já foram direcionados para as DCs, antígenos de diferentes parasitas, vírus e até mesmo antígenos oriundos de tumores (AMORIM;RAMPAZO; et al., 2016; APOSTOLICO et al., 2017; BOSCARDIN et al., 2006; DO et al., 2010; HENRIQUES et al., 2013; RAMPAZO et al., 2015; TEWARI et al., 2010; TRUMPFHELLER et al., 2008; WANG et al., 2009)

Os primeiros estudos direcionando antígenos de relevância clínica foram realizados com as proteínas circumsporozoita (CS) de *Plasmodium yoelii*, com a proteína GAG do vírus HIV, com a proteína LACK de *Leishmania major* e com a proteína de virulência (LcrV) de *Yersinia pestis*. Nesses estudos, houve a indução de uma robusta resposta celular, tanto de células T CD8⁺ quando de células T CD4⁺ e uma forte resposta humoral com altos títulos de anticorpos específicos a proteína direcionada. No caso do direcionamento do LcrV de *Yersinia pestis*, foi o primeiro relato de uma resposta imune protetora quando camundongos foram imunizados com α DEC205 e α DCIR2 e desafiados com o patógeno (BOSCARDIN et al., 2006; DO et al., 2010; SOARES et al., 2007; TRUMPFHELLER et al., 2008).

Sabe-se que o direcionamento de antígenos para DCs CD8 α ⁺ induz tanto resposta de células T CD8⁺ quanto de células T CD4⁺ que proliferam e produzem as citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ , típicas de uma resposta Th1 (AMORIM;RAMPAZO; et al., 2016; APOSTOLICO et al., 2017; HENRIQUES et al., 2013; RAMPAZO et al., 2015). Entretanto, ainda existem controvérsias referentes ao direcionamento de antígenos para as DCs CD8 α ⁻. Há estudos que mostram que o direcionamento via DCIR2 pode induzir uma proliferação de células T CD4⁺ dez vezes maior que o direcionamento via DEC205 (DUDZIAK et al., 2007). Entretanto, em sistemas abertos, a proliferação induzida pelo direcionamento via DEC205 é superior a imunização com α DCIR2 (BARBOSA, 2011; ANTONIALLE 2013) . Além disso, há resultados que mostram que a resposta humoral inicial induzida pelo direcionamento via DCIR2 é superior a resposta induzida pelo direcionamento via DEC205, mas o nível de

anticorpos em uma resposta de secundária é semelhante (HENRIQUES et al., 2013; SHIN et al., 2015).

No caso de estímulos via anticorpo α DCIR2, há evidências que DCs da zona marginal ao CG e da zona de células T induzam a ativação de células B extrafoliculares e de células T $CD4^+$. As células B ativadas migram para a zona de células T e interagem com estas células resultando em intensa proliferação das células T_{FH} e B. Entretanto, este estudo foi realizado sem a utilização de qualquer adjuvante (CHAPPELL et al., 2012). Por outro lado, no direcionamento via DEC205, há evidências que as células B do CG também expressam o receptor DEC205 (VICTORA et al., 2010). Dessa forma, essas células também poderiam participar da indução da resposta humoral no direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^+$.

Apesar das informações descritas acima, pouco se sabe até o momento a respeito do mecanismo de ativação da resposta humoral quando antígenos são direcionados para DCs via anticorpos monoclonais quiméricos, apesar de sua eficiência já ter sido amplamente demonstrada (AMORIM;RAMPAZO; et al., 2016; APOSTOLICO et al., 2017; BOSCARDIN et al., 2006; HENRIQUES et al., 2013; RAMPAZO et al., 2015). Os mecanismos de indução da resposta humoral e também da resposta celular envolvidos no direcionamento de antígenos para DCs ainda não foram completamente elucidados. Estudos são necessários para compreender como as células B são estimuladas por esses protocolos de imunização e relação com as células T auxiliares, bem como as diferenças no envolvimento das DCs $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$ na geração da resposta humoral.

Como já mencionamos acima, a própria biologia das DCs $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$ possui particularidades entre si, sendo as DCs $CD8\alpha^-$ capazes de induzir 10 vezes mais proliferação de células T específicas $CD4^+$ quando comparadas às DCs $CD8\alpha^+$ (DUDZIAK et al., 2007). Por esse motivo, as respostas induzidas pelo direcionamento de antígenos a esses dois subtipos de DCs podem ser diferentes quando comparadas. Além disso, sabe-se que a quantidade de IL-6, IL-12 e IL-2 expressas pela DC também influencia a instrução e a diferenciação de células T_{FH} *in vivo* (BALLESTEROS-TATO ;RANDALL, 2014). Neste sentido, o direcionamento de antígenos para cada um desses subtipos de DC pode induzir uma resposta adaptativa dependendo das características biológicas de cada DC. O estudo dessa resposta pode revelar propriedades e especializações de cada uma dessas células.

A maioria dos protocolos de imunização que utilizam proteínas recombinantes e até mesmo que direcionam o antígeno para DC utilizam mais de uma dose da proteína ou dos mAbs quiméricos. Dessa forma, após a administração da primeira dose pode ocorrer a instrução de células T virgens a se tornarem efectoras. Após a segunda dose pode haver uma

amplificação da resposta induzida na primeira dose e a instrução de novas células ou montagem de uma nova resposta baseada nas células específicas que foram expandidas durante a resposta primária.

Após a imunização com o mAb quimérico, um segundo contato com o antígeno aumenta ainda mais os títulos de anticorpos específicos (AMORIM;RAMPAZO; et al., 2016; BOSCARDIN et al., 2006; BRAGA et al., 2010; HENRIQUES et al., 2013; RAMPAZO et al., 2015). A segunda exposição ao antígeno, que ocorre após a segunda dose da imunização, parece aumentar a interação entre as DCs e as células T. E essa exposição prolongada ao antígeno aumenta a geração de células T_{FH} e a formação de CG, sugerindo uma inter-relação entre o tempo de exposição ao antígeno e o grau da resposta humoral (BAUMJOHANN et al., 2013). Entretanto, o aumento das células T_{FH} pode ter efeitos limitados na ativação de células B durante o segundo contato com o antígeno pois na dinâmica do CG essas células estão envolvidas com a seleção clonal e a primeira imunização pode já ter induzido a seleção de clones com alta afinidade (DEENICK et al., 2010).

Assim, para entender como a resposta ao direcionamento de antígenos para DCs via DEC205 ou DCIR2 é montada em protocolos que utilizam duas doses de imunização, a resposta inicial induzida foi avaliada 3, 4, 5 e 6 dias após a administração da primeira dose. Além disso, também foi estudada a resposta promovida 3, 4, 5 e 6 dias após a administração da segunda dose. Buscamos, desta forma, entender a influência tanto do primeiro quanto do segundo contato com o antígeno para compreender como a resposta foi induzida. Ainda, o estudo da resposta inicial após o direcionamento do antígeno nos permite avaliar a especialização de cada subtipo de DC na instrução de respostas de células T CD4⁺.

Para isso, foi utilizado um antígeno quimérico descrito com Rosa e colaboradores (2004) formado por uma proteína derivada de *Plasmodium vivax* conjugada ao epítipo PADRE (do inglês “*Pan allelic DR epitope*”). Essa proteína é formada pelo fragmento de 19 kDa da proteína 1 de superfície de merozoito (MSP1₁₉). Na verdade, ela é um fragmento que se origina da proteólise da proteína MSP1 no processo de invasão do parasito ao eritrócito que é alvo de uma forte resposta humoral e tem sido utilizado no desenho de vacinas que visam a indução de anticorpos contra o parasita (WILSON et al., 2011). Já o PADRE é um epítipo sintético criado para ligar-se fortemente às moléculas de MHC II humano mais frequentes na população, sendo também reconhecido pelo haplótipo I-A/I-E^b de camundongos C57BL/6, e assim induzir uma forte resposta de células T CD4⁺ (DEL GUERCIO et al., 1997). Dessa forma, a MSP1₁₉ é utilizada como alvo da resposta humoral enquanto o PADRE como alvo da resposta celular (ROSA et al., 2004).

A sequência do cDNA da proteína MSP1₁₉ foi clonada previamente juntamente com do antígeno PADRE nos plasmídeos codificadores da cadeia pesada dos anticorpos α DEC205, α DCIR2 e no isotipo controle por Barbosa (2011). Os mAbs quiméricos obtidos foram denominados α DEC205-MSP1₁₉PADRE, α DCIR2-MSP1₁₉PADRE e ISO-MSP1₁₉PADRE. A figura 4 mostra a estrutura desses mAbs formados pela cadeia leve e pesada de cada anticorpo monoclonal. Como nota-se na figura, o antígeno MSP1₁₉PADRE foi clonado na porção C-terminal da cadeia pesada dos anticorpos. Importante ressaltar que esses anticorpos possuem uma mutação na porção Fc que impede que se liguem ao receptor Fc presente em outras APCs. As imunizações de camundongos com esses mAbs quiméricos induziram forte resposta de células T CD4⁺ e altos títulos de anticorpos específicos para a MSP1₁₉.

Figura 4 - mAbs quiméricos. Figura esquemática da estrutura dos mAbs quiméricos α DEC205-MSP1₁₉PADRE, α DCIR2-MSP1₁₉PADRE e ISO-MSP1₁₉PADRE. O antígeno MSP1₁₉PADRE está fusionado à cadeia pesada de cada anticorpo.

2 CONCLUSÃO

Com esses resultados podemos concluir que o direcionamento de antígenos para DCs não altera o perfil de ativação dessas células comparando as diferentes imunizações. O aumento da expressão de CD80, CD86 e CD40 ocorre por efeito do adjuvante. Contudo, observa-se que as DCs $CD8\alpha^+$ apresentam uma maior expressão de CD80 e CD40 comparadas com as DCs $CD8\alpha^-$. Além disso, os níveis séricos de TNF- α também se mantem semelhantes nas imunizações com α DEC205-MSP1₁₉PADRE, α DCIR2-MSP1₁₉PADRE, ISO-MSP1₁₉PADRE ou somente Poly I:C. Entretanto, há um aumento sistêmico de IL-6 quando o antígeno é direcionado via DCIR2. Assim, pode-se inferir que há diferenças na biologia das DCs $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$, pois elas se ativam de formas diferentes na presença do mesmo estímulo.

Com todos os nossos resultados que analisaram a resposta após a administração da primeira dose, podemos afirmar que o direcionamento de antígenos para a população de DCs $CD8\alpha^-$ induz uma robusta resposta humoral com altos títulos de anticorpos séricos. O direcionamento de antígenos utilizando α DCIR2 aumenta o número de células T_{FH}, de células B do CG e de plasmócitos. Isso sugere que as DC $CD8\alpha^-$ são especializadas na instrução de células T_{FH}. Ainda, mostramos que essa resposta é dependente de células T auxiliares, não sendo uma ativação somente das células B da região marginal. Em contrapartida, o direcionamento para a população de DCs $CD8\alpha^+$ induziu um maior número de células produtoras de IFN- γ e células T $CD4^+$ polifuncionais, indicando que essas células são especializadas da instrução de resposta celular do tipo Th1.

Depois da administração da segunda dose dos mAbs quiméricos, a resposta ao direcionamento do antígeno para as DCs $CD8\alpha^-$ apresentou altos títulos de anticorpos específicos contra a proteína MSP1₁₉ e uma queda na razão IgG1/IgG2c com o passar do tempo, indicando que após a segunda dose ainda há mudança de classe. Entretanto, não houve aumento na frequência de células T_{FH} e de células B do centro germinativo, mas houve aumento de plasmócitos e a instrução de uma resposta T auxiliar com um perfil misto Th2/Th17. Já no direcionamento do antígeno para as DCs $CD8\alpha^+$ houve um aumento progressivo da resposta de células Th1 (células produtoras de IFN- γ , IL-2 e TNF- α) e de outras células T auxiliares que produzem IL-10. Além disso, os títulos de anticorpos contra a proteína MSP1₁₉ aumentaram depois da segunda dose e ocorreu mudança de classe de IgG.

No segundo contato com o antígeno, houve um aumento de duas populações de células T_{FH} ($CXCR5^{High}PD-1^{High}$ e $CXCR5^{Inter}PD-1^{Inter}$) quando o antígeno foi direcionado via DEC205, mas não houve aumento de células B do centro germinativo no período de tempo analisado. Assim, o direcionamento para DCs $CD8\alpha^{+}$ induz uma robusta resposta Th1.

Esses resultados contribuem para a elucidação dos mecanismos de indução de resposta imune nos protocolos que utilizam o direcionamento de antígenos como uma ferramenta de imunização para a indução de uma resposta imune adaptativa duradoura. Além disso, esses achados contribuem para o desenvolvimento de vacinas contra diversos patógenos, pois elucidamos as respostas induzidas pelas imunizações com α DEC205 e α DCIR2. Dessa forma, é possível otimizar a escolha da estratégia de imunização dependendo da resposta que melhor convém para a vacina. Também geramos dados que confirmam as especializações das DCs $CD8\alpha^{+}$ e $CD8\alpha^{-}$ em induzir a polarização de resposta T $CD4^{+}$ revelando diferenças na biologia das DCs $CD8\alpha^{+}$ e $CD8\alpha^{-}$.

REFERÊNCIAS*

ALLAN, R. S. et al. Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. **Science**,v. 301, n. 5641, p. 1925-1928 2003.

ALLEN, C. D.; OKADA, T.; CYSTER, J. G. Germinal-center organization and cellular dynamics. **Immunity**,v. 27, n. 2, p. 190-202 2007.

AMANNA, I. J.; SLIFKA, M. K. Contributions of humoral and cellular immunity to vaccine-induced protection in humans. **Virology**,v. 411, n. 2, p. 206-215 2011.

AMORIM, K. N. et al. Dendritic Cells and Their Multiple Roles during Malaria Infection. **J Immunol Res**,v. 2016, p. 2926436 2016.

AMORIM, K. N. et al. The presence of T cell epitopes is important for induction of antibody responses against antigens directed to DEC205+ dendritic cells. **Sci Rep**,v. 6, p. 39250 2016.

ATONIALLI, Renan. Efeito de ligantes de receptores semelhantes a Toll na resposta imune induzidas por antígenos direcionados ao DEC205 e DCIR2 (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2013.

APOSTOLICO, J. S. et al. Dendritic Cell Targeting Effectively Boosts T Cell Responses Elicited by an HIV Multiepitope DNA Vaccine. **Front Immunol**,v. 8, p. 101 2017.

APOSTOLOPOULOS, V. et al. Targeting antigens to dendritic cell receptors for vaccine development. **J Drug Deliv**,v. 2013, p. 869718 2013.

ATHIE-MORALES, V. et al. Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. **J Immunol**,v. 172, n. 1, p. 61-69 2004.

BAJANA, S. et al. IRF4 and IRF8 Act in CD11c+ Cells To Regulate Terminal Differentiation of Lung Tissue Dendritic Cells. **J Immunol**,v. 196, n. 4, p. 1666-1677 2016.

BALLESTEROS-TATO, A.; RANDALL, T. D. Priming of T follicular helper cells by dendritic cells. **Immunol Cell Biol**,v. 92, n. 1, p. 22-27 2014

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**,v. 392, n. 6673, p. 245-252 1998.

BARBOSA, I. M. Direcionando as proteínas MSP119 de Plasmodium vivax e Plasmodium yoelli para células dendríticas in vivo: análise das respostas imunes celular e humoral. [dissertação(mestrado em parasitologia)]. São Paulo Instituto de Ciências Biomédica da Universidade de São Paulo, 2013.

BAUMJOHANN, D. et al. Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. **Immunity**,v. 38, n. 3, p. 596-605 2011.

BENVENUTI, F. et al. Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. **J Immunol**,v. 172, n. 1, p. 292-301 2004.

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**,v. 196, n. 12, p. 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**,v. 199, n. 6, p. 815-824 2004.

BOSCARDIN, S. B. et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. **J Exp Med**,v. 203, n. 3, p. 599-606 2006.

BRAGA, C. J. et al. CD8+ T cell adjuvant effects of Salmonella FliC_D flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. **Vaccine**,v. 28, n. 5, p. 1373-1382 2010.

BRETON, G. et al. Circulating precursors of human CD1c⁺ and CD141⁺ dendritic cells. **J Exp Med**,v. 212, n. 3, p. 401-413 2015.

BREWITZ, A. et al. CD8+ T Cells Orchestrate pDC-XCR1+ Dendritic Cell Spatial and Functional Cooperativity to Optimize Priming. **Immunity**,v. 46, n. 2, p. 205-219 2017.

CARBO, A. et al. Computational modeling of heterogeneity and function of CD4+ T cells. **Front Cell Dev Biol**,v. 2, p. 31 2014.

CHAPPELL, C. P. et al. Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses. **J Exp Med**,v. 209, n. 10, p. 1825-1840 2012.

CHOI, Y. S. et al. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. **Immunity**,v. 34, n. 6, p. 932-946 2011.

COLONNA, M.; TRINCHIERI, G.; LIU, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. **Nat Immunol**,v. 5, n. 12, p. 1219-1226 2004.

CROZAT, K. et al. Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8alpha+ type. **J Immunol**,v. 187, n. 9, p. 4411-4415 2011.

DE SILVA, N. S.; KLEIN, U. Dynamics of B cells in germinal centres. **Nat Rev Immunol**,v. 15, n. 3, p. 137-148 2015.

DEENICK, E. K. et al. Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen presentation that is independent of unique B cell signaling. **Immunity**,v. 33, n. 2, p. 241-253 2010.

DEL GUERCIO, M. F. et al. Potent immunogenic short linear peptide constructs composed of B cell epitopes and Pan DR T helper epitopes (PADRE) for antibody responses in vivo. **Vaccine**,v. 15, n. 4, p. 441-448 1997.

DIAO, J. et al. Characterization of distinct conventional and plasmacytoid dendritic cell-committed precursors in murine bone marrow. **J Immunol**,v. 173, n. 3, p. 1826-1833 2004.

DO, Y. et al. Targeting of LcrV virulence protein from Yersinia pestis to dendritic cells protects mice against pneumonic plague. **Eur J Immunol**,v. 40, n. 10, p. 2791-2796 2010.

DUDEK, A. M. et al. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. **Front Immunol**,v. 4, p. 438 2013.

DUDZIAK, D. et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. **Science**,v. 315, n. 5808, p. 107-111 2007.

DUSTIN, M. L. The immunological synapse. **Cancer Immunol Res**,v. 2, n. 11, p. 1023-1033 2014.

DUSTIN, M. L.; CHAKRABORTY, A. K.; SHAW, A. S. Understanding the structure and function of the immunological synapse. **Cold Spring Harb Perspect Biol**,v. 2, n. 10, p. a002311 2010.

ETTINGER, M. et al. Targeting of the hNC16A collagen domain to dendritic cells induces tolerance to human type XVII collagen. **Exp Dermatol**,v. 21, n. 5, p. 395-398 2012.

FINKELMAN, F. D. et al. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. **J Immunol**,v. 157, n. 4, p. 1406-1414 1996.

FOGG, D. K. et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. **Science**,v. 311, n. 5757, p. 83-87 2006.

GOENKA, R. et al. Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. **J Immunol**,v. 187, n. 3, p. 1091-1095 2011.

GUERMONPREZ, P. et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu Rev Immunol**,v. 20, p. 621-667 2002.

GUILLIAMS, M. et al. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. **Immunity**,v. 45, n. 3, p. 669-684 2016.

GUILLIAMS, M. et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. **Nat Rev Immunol**,v. 14, n. 8, p. 571-578 2014.

HAWIGER, D. et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. **J Exp Med**,v. 194, n. 6, p. 769-779 2001.

HEATH, A. W.; WU, W. W.; HOWARD, M. C. Monoclonal antibodies to murine CD40 define two distinct functional epitopes. **Eur J Immunol**,v. 24, n. 8, p. 1828-1834 1994.

HEIDKAMP, G. F. et al. Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue microenvironment. **Sci Immunol**,v. 1, n. 6, 2016.

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**,v. 7, n. 7, p. e2330 2013.

HUPPA, J. B. et al. Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. **Nat Immunol**,v. 4, n. 8, p. 749-755 2003.

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 U S A**,v. 108, n. 6, p. 2384-2389 2011.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nat Immunol**,v. 16, n. 4, p. 343-353 2015.

IYODA, T. et al. The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. **J Exp Med**,v. 195, n. 10, p. 1289-1302 2002.

JANKOVIC, D.; KUGLER, D. G.; SHER, A. IL-10 production by CD4⁺ effector T cells: a mechanism for self-regulation. **Mucosal Immunol**,v. 3, n. 3, p. 239-246 2010.

JIANG, W. et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. **Nature**,v. 375, n. 6527, p. 151-155 1995.

JOHNSTON, R. J. et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. **Science**,v. 325, n. 5943, p. 1006-1010 2009.

KALAITZIDIS, D. et al. Amino acid-insensitive mTORC1 regulation enables nutritional stress resilience in hematopoietic stem cells. **J Clin Invest**,v. 127, n. 4, p. 1405-1413 2017.

KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nat Rev Immunol**,v. 3, n. 12, p. 984-993 2003.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**,v. 11, n. 5, p. 373-384 2010.

KLECHEVSKY, E. et al. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14⁺ dermal dendritic cells. **Immunity**,v. 29, n. 3, p. 497-510 2008.

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**,v. 187, n. 2, p. 842-850 2011.

LEHMANN, C. H. et al. Direct Delivery of Antigens to Dendritic Cells via Antibodies Specific for Endocytic Receptors as a Promising Strategy for Future Therapies. **Vaccines (Basel)**,v. 4, n. 2, 2016.

LI, J. et al. EBI2 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-quenching dendritic cells. **Nature**,v. 533, n. 7601, p. 110-114 2016.

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**,v. 206, n. 7, p. 1589-1602 2009.

MA, C. S. et al. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. **J Exp Med**,v. 209, n. 7, p. 1241-1253 2012.

MACLENNAN, I.; VINUESA, C. Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. **Immunity**,v. 17, n. 3, p. 235-238 2002.

MACRI, C. et al. Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness. **Clin Transl Immunology**,v. 5, n. 3, p. e66 2016.

MAHNKE, K. 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**,v. 151, n. 3, p. 673-684 2000.

MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**,v. 106, n. 3, p. 255-258 2001.

MERAD, M. et al. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. **Annu Rev Immunol**,v. 31, p. 563-604 2013.

MESIN, L.; ERSCHING, J.; VICTORA, G. D. Germinal Center B Cell Dynamics. **Immunity**,v. 45, n. 3, p. 471-482 2016.

MUNZ, C.; STEINMAN, R. M.; FUJII, S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. **J Exp Med**,v. 202, n. 2, p. 203-207 2005.

NAPOLITANI, G. et al. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. **Nat Immunol**,v. 6, n. 8, p. 769-776 2005.

NUSSENZWEIG, M. C. et al. A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**,v. 79, n. 1, p. 161-165 1982.

PEREZ-MAZLIAH, D. et al. Disruption of IL-21 signaling affects T cell-B cell interactions and abrogates protective humoral immunity to malaria. **PLoS Pathog**,v. 11, n. 3, p. e1004715 2015.

PETZOLD, C. et al. Targeted antigen delivery to DEC-205(+) dendritic cells for tolerogenic vaccination. **Rev Diabet Stud**,v. 9, n. 4, p. 305-318 2012.

POLTORAK, M. P.; SCHRAML, B. U. Fate mapping of dendritic cells. **Front Immunol**,v. 6, p. 199 2015.

PULENDRAN, B.; AHMED, R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. **Cell**,v. 124, n. 4, p. 849-863 2006.

RAMPAZO, E. V. et al. Antigen targeting to dendritic cells allows the identification of a CD4 T-cell epitope within an immunodominant Trypanosoma cruzi antigen. **PLoS One**,v. 10, n. 2, p. e0117778 2015.

ROSA, D. S. et al. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. **Immunol Lett**,v. 92, n. 3, p. 259-268 2004.

SAHAY, B. et al. Activation of B cells by a dendritic cell-targeted oral vaccine. **Curr Pharm Biotechnol**,v. 14, n. 10, p. 867-877 2013.

SAITO, T.; YOKOSUKA, T.; HASHIMOTO-TANE, A. Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters. **FEBS Lett**,v. 584, n. 24, p. 4865-4871 2010.

SANCHO, D. et al. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. **Nature**,v. 458, n. 7240, p. 899-903 2009.

SAUTER, B. et al. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. **J Exp Med**,v. 191, n. 3, p. 423-434 2000.

SAVINA, A.; AMIGORENA, S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. **Immunol Rev**,v. 219, p. 143-156 2007.

SCHLITZER, A. et al. IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. **Immunity**,v. 38, n. 5, p. 970-983 2013.

SCHLITZER, A. et al. Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. **Nat Immunol**,v. 16, n. 7, p. 718-728 2015.

SEE, P. et al. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. **Science**,v. 356, n. 6342, 2017.

SHIN, C. et al. Intrinsic features of the CD8alpha(-) dendritic cell subset in inducing functional T follicular helper cells. **Immunol Lett**,v. 172, p. 21-28 2016.

SHIN, C. et al. CD8alpha(-) Dendritic Cells Induce Antigen-Specific T Follicular Helper Cells Generating Efficient Humoral Immune Responses. **Cell Rep**,v. 11, n. 12, p. 1929-1940 2015.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat Rev Immunol**,v. 2, n. 3, p. 151-161 2002.

SHULMAN, Z. et al. T follicular helper cell dynamics in germinal centers. **Science**,v. 341, n. 6146, p. 673-677 2013.

SICHIEN, D. et al. IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. **Immunity**,v. 45, n. 3, p. 626-640 2016.

SOARES, H. et al. A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. **J Exp Med**,v. 204, n. 5, p. 1095-1106 2007.

SPIERING, R. et al. DEC205+ Dendritic Cell-Targeted Tolerogenic Vaccination Promotes Immune Tolerance in Experimental Autoimmune Arthritis. **J Immunol**,v. 194, n. 10, p. 4804-4813 2015.

STEINMAN, R. M. Some interfaces of dendritic cell biology. **APMIS**,v. 111, n. 7-8, p. 675-697 2003.

_____. Dendritic cells: understanding immunogenicity. **Eur J Immunol**,v. 37 Suppl 1, p. S53-60 2007.

_____. Dendritic cells and vaccines. **Proc (Bayl Univ Med Cent)**,v. 21, n. 1, p. 3-8 2008.

_____. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annu Rev Immunol**,v. 30, p. 1-22 2012.

STEINMAN, R. M. et al. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. **J Exp Med**,v. 191, n. 3, p. 411-416 2000.

SUH, W. K. Life of T follicular helper cells. **Mol Cells**,v. 38, n. 3, p. 195-201 2015.

TAHILIANI, V. et al. OX40 Cooperates with ICOS To Amplify Follicular Th Cell Development and Germinal Center Reactions during Infection. **J Immunol**,v. 198, n. 1, p. 218-228 2017.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol**,v. 21, p. 335-376 2003.

TARLINTON, D.; LEW, A. Antigen to the node: B cells go native. **Immunity**,v. 26, n. 4, p. 388-390 2007.

TAS, J. M. et al. Visualizing antibody affinity maturation in germinal centers. **Science**,v. 351, n. 6277, p. 1048-1054 2016.

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**,v. 28, n. 45, p. 7256-7266 2010.

TOMURA, M. et al. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. **Sci Rep**,v. 4, p. 6030 2014.

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 U S A**,v. 105, n. 7, p. 2574-2579 2008.

UENO, H. et al. Dendritic cells and humoral immunity in humans. **Immunol Cell Biol**,v. 88, n. 4, p. 376-380 2010.

VICTORA, G. D.; MESIN, L. Clonal and cellular dynamics in germinal centers. **Curr Opin Immunol**,v. 28, p. 90-96 2014.

VICTORA, G. D.; NUSSENZWEIG, M. C. Germinal centers. **Annu Rev Immunol**,v. 30, p. 429-457 2012.

VICTORA, G. D. et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. **Cell**,v. 143, n. 4, p. 592-605 2010.

WANG, B. et al. The human cancer antigen mesothelin is more efficiently presented to the mouse immune system when targeted to the DEC-205/CD205 receptor on dendritic cells. **Ann N Y Acad Sci**,v. 1174, p. 6-17 2009.

WEINSTEIN, J. S. et al. TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. **Nat Immunol**,v. 17, n. 10, p. 1197-1205 2016.

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**,v. 6, n. 11, p. e27705 2011.

WU, L.; LIU, Y. J. Development of dendritic-cell lineages. **Immunity**,v. 26, n. 6, p. 741-750 2007.

YAMAZAKI, S. et al. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. **Blood**,v. 110, n. 13, p. 4293-4302 2007.

YAMAZAKI, S. et al. CD8⁺ CD205⁺ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3⁺ regulatory T cells. **J Immunol**,v. 181, n. 10, p. 6923-6933 2008.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). **Annu Rev Immunol**,v. 28, p. 445-489 2010.