

Raquel Hoffmann Panatieri

**Caracterização da resposta imune gerada pelo
direcionamento de uma proteína de *Plasmodium*
para as células dendríticas**

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

São Paulo
2016

Raquel Hoffmann Panatieri

**Caracterização da resposta imune gerada pelo
direcionamento de uma proteína de *Plasmodium*
para as células dendríticas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação patógeno-Hospedeiro de 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

Orientadores Dr^a Silvia Beatriz Boscardin
Dr Rogério Amino

Versão Original

São Paulo
2016

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

reprodução não autorizada pelo autor

Panatieri, Raquel Hoffmann.

Caracterização da resposta imune gerada pelo direcionamento de uma proteína de Plasmodium para as células dendríticas / Raquel Hoffmann Panatieri. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Silvia Beatriz Boscardin.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Imunologia parasitária. Linha de pesquisa: Direcionamento de antígenos.

Versão do título para o inglês: Characterization of the immune response when targeting a protein from Plasmodium to dendritic cells.

1. Imunologia 2. Imunologia celular 3. Células dendríticas 4. Plasmodium 5. Vacinas 6. Anticorpos monoclonais I. Boscardin, Prof. Dr. Silvia Beatriz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia III. Título.

ICB/SBIB054/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Raquel Hoffmann Panatieri.

Título da Tese: Caracterização da resposta imune gerada pelo direcionamento de uma proteína de Plasmodium para as células dendríticas.

Orientador(a): Prof. Dr. Silvia Beatriz Boscardin.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

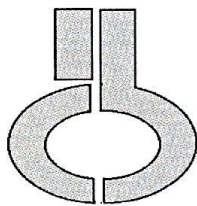
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

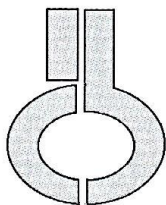
Decl. CEUA.035/2011

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 82/08/CEUA, datado de 26.08.2008 e por solicitação da Profa. Dra. **Silvia Beatriz Boscardin**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Raquel Hoffmann Panatieri** ao Projeto de Pesquisa "*Direcionamento de antígenos recombinantes para células dentríticas in vivo: uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacinas*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 31 de agosto de 2011.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP



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

Às minhas famílias que tanto me apoiaram e incentivaram

Lúcia, Roni e Rosa

Ivanice, Luis, Danielle e Tainá

Maurício

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho ser finalizado. Em especial aos meus orientadores Dr^a Silvia Beatriz Boscardin e Dr Rogério Amino, fundamentais para meu aprendizado, muito além da ciência, e muito mais da sabedoria maravilhosa que é a VIDA.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Direcionamento de Antígenos, na Universidade de São Paulo e aos meus colegas do Laboratório de Biologia e Genética do Paludismo, no Instituto Pasteur em Paris.

“Você não consegue conectar os pontos olhando para o futuro. Só é possível conectá-los olhando para o passado. Então você precisa confiar que os pontos de alguma forma se ligarão no seu futuro. Você precisa confiar em alguma coisa: sua força de vontade, destino, vida, karma, o que for. Pois acreditar que os pontos irão se ligar no meio do caminho vai lhe dar confiança para seguir seu coração. Mesmo quando ele o levar para fora do padrão, e isso irá fazer toda a diferença.

...

Seu tempo é limitado, então não o desperdice vivendo a vida de outra pessoa. Não fique preso por dogmas, que é viver com os resultados dos pensamentos de outras pessoas. Não permita que o barulho das opiniões dos outros cale a sua própria voz interior. E, o mais importante, tenha a coragem de seguir seu coração e intuição. Pois eles, de alguma forma, já sabem o que você realmente quer se tornar. Todo o restante é secundário.”

Steve Jobs

Resumo

Panatieri RH. Caracterização da resposta imune gerada pelo direcionamento de uma proteína de *Plasmodium* para as células dendríticas. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Em geral, a imunidade protetora contra muitos patógenos depende da geração e manutenção do repertório de linfócitos T de memória, e de sua manutenção por longos períodos de tempo após um contato inicial com o patógeno. Sabemos que a geração dessas células está correlacionada com a ativação de células do sistema imune específicas ao parasito e com a apresentação de antígenos pelas células dendríticas (DCs). Essas células têm um papel central no sistema imune, conectando as respostas imunes inata e adaptativa. Nos últimos anos, o direcionamento de antígenos para as DCs tem sido estudado como um novo método vacinal. Essa estratégia consiste em entregar antígenos diretamente para DCs usando anticorpos monoclonais que reconhecem receptores expressos na superfície dessas células. Sendo assim, o principal objetivo desse trabalho foi direcionar uma proteína de *Plasmodium* para a subpopulação DEC205⁺ de DCs. Para isso camundongos foram imunizados com duas doses do anticorpo monoclonal α DEC205.CS na presença de poly I:C como adjuvante, e então desafiados dias após a segunda imunização, com esporozoítos de *P. yoelii*. Como controles da proteína não direcionada, utilizamos o anticorpo monoclonal fusionado desnaturado, sem capacidade de reconhecer o receptor, e também a proteína recombinante (CSr). A proteína direcionada não protegeu camundongos do desafio, mas a proteína não direcionada protegeu, alcançando níveis de proteção estéril em torno de 100% em alguns casos. Na tentativa de entender os mecanismos envolvendo esses resultados, observamos que a resposta humoral pareceu ocupar um papel central nos mecanismos de proteção. Encontramos correlação entre a quantidade dos anticorpos e a proteção relativa dos animais imunizados com a proteína não direcionada. Além disso, utilizando anticorpos monoclonais que reconhecem diferentes porções da proteína, demonstramos que a região conhecida como 'major repeat' pode ser utilizada como alvo direto de pesquisas em vacinas contra malária, para a geração de uma resposta imune protetora.

Palavras-chave: Malária. Células dendríticas. DEC205. Anticorpos monoclonais.

Abstract

Panatieri RH. Characterization of the immune response when targeting a protein from *Plasmodium* to dendritic cells [Ph.D Thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

In general, protective immunity against many pathogens depends on the generation and maintenance of T lymphocyte memory repertoire, and the survival of cells for a long period of time after initial contact with pathogens. We know that the generation of these cells is correlated with the activation of parasite-specific immune cells and the presentation of antigens for dendritic cell (DCs). These cells have a central role in immune system, connecting innate and adaptive immunity. In the last few years, targeting antigens to DCs has been studied as a new vaccination method. This strategy consists in the delivery of antigens directly to DCs using monoclonal antibodies which recognizes receptors expressed on the surface of these cells. So, the main objective of this work was target circumsporozoite protein (CSP), an antigen from *Plasmodium*, to a DEC205⁺ (DC) subset. Mice were immunized twice using fused antibodies α DEC205.CS with Poly I:C as adjuvant, and then challenged a few days after the second dose using *Plasmodium yoelii* sporozoites (spz). As control, non-targeting protein was used denatured antibody and CS recombinant protein (CSr). Targeting protein did not protect mice from challenge, but non-targeting CS lead, in some cases, to 100% of protection. Trying to understand the mechanisms involving these results, we observed that humoral response seems to be the central part in this process. We found correlation between levels of antibody response with protection, with high levels of anti-CS total IgG in mice immunized with non-targeting protein. Besides, using monoclonal antibodies, which recognizes major and minor repeat, we were able to map major repeat as a potential target for new researches in malaria vaccine for generation of protective immune response.

Keywords: Malaria. Dendritic cells. DEC205. Monoclonal antibodies.

Lista de Figuras e Ilustrações

- Figura 1 - Mapa esquemático apontando as regiões de áreas endêmicas, demarcadas em tonalidades diferentes, referenciando o número de casos em cada região por mil habitantes21
- Figura 2 - Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento do parasito, apresentando as duas fases que ocorrem dentro do hospedeiro vertebrado e a fase sexuada que ocorre dentro do hospedeiro invertebrado.23
- Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% mostrando a esquerda a expressão da proteína CSr, e a direita os anticorpos purificados.56
- Figura 4 - Anticorpos híbridos nativos reconhecem o receptor DEC205 expresso por DCs, ao contrario dos anticorpos desnaturados, que não foram capazes.57
- Figura 5 - Esquema do desenho experimental do primeiro ensaio de imunização.. .58
- Figura 6 - Imunização com a proteína CS não direcionada, em forma de anticorpo desnaturado ou proteína recombinante, protege camundongos mediante ensaios de desafio.....60
- Figura 7 - Esquema do desenho experimental do segundo ensaio de imunização...61
- Figura 8 - imunizações com a proteína CS não direcionada, em forma de anticorpo desnaturado ou proteína recombinante, protegeram camundongos mediante ensaios de desafio, independente do tempo de espaçamento entre a primeira e a segunda doses.....63
- Figura 9 - Esquema do desenho experimental do ensaio de imunização com depleção de linfócitos T.....64
- Figura 10 - Gráfico representativos dos testes para confirmação da depleção.....66
- Figura 11 - A depleção de linfócitos T CD4+ e CD8+ não interfere na proteção observada nos animais imunizados com a proteína não direcionada.67
- Figura 12 - Animais imunizados com a proteína não direcionada apresentaram níveis de anticorpos significativamente maiores com relação aos que receberam a proteína direcionada.....69
- Figura 13 - Correlação positiva entre os títulos de anticorpos anti-CS com os índices de proteção observados em diferentes experimentos de imunização.....70
- Figura 14 - Anticorpos induzidos contra a proteína CS durante a imunização com o anticorpo desnaturado apresentaram maior avidéz.70

Figura 15 - Animais imunizados com o anticorpo desnaturado apresentaram maior título de anticorpos IgG2b.	71
Figura 16 - Desenho esquemático da proteína CS de <i>P. yoelii</i>	74
Figura 17 - Ambos os anticorpos monoclonais reconhecem a proteína recombinante, expressa em <i>E. coli</i> , em ensaios de ELISA.	74
Figura 18 - Apenas o anticorpo 15D7 reconhece a proteína nativa, expressa na superfície dos esporozoítos.	75
Figura 19 - Esquema do desenho experimental do ensaio de transferência adotiva dos anticorpos monoclonais 15D7 e 24D9.	75
Figura 20 - Anticorpo 15D7 foi capaz de proteger animais mediante deaafio com esporozoítos após transferência adotiva.	77
Figura 21 - Desenho esquemático da proteína CS e suas porções separadamente, em relação a proteína inteira.	78
Figura 22 - Esquema do desenho experimental do ensaio de imunização com as porções recombinantes da proteína CS de <i>P. yoelii</i>	79
Figura 23 - Apenas a proteína CSr inteira e a proteína CSr deletada da porção N-terminal foram capazes de induzir resposta imune protetora.	79

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Descrição das linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas.	41
Tabela 2 - Descrição das características dos vetores.	42

Lista de Abreviaturas

°C - Graus Celsius

µm - Micrometro

17XNL - 17X não letal

BSA - Albumina bovina sérica

CD - Do inglês 'cluster of differentiation'

CSP - Proteína de circumsporozoita

CSr - CS recombinante

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade ótica

DTT - Ditioneitol

ELISA - Imunoensaio enzimático

HEK - Do inglês 'Human Embryonic Kidney'

HRP - Do inglês 'Horseradish peroxidase'

iv - Intravenoso

id - Intradérmico

IPTG - Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

L - Litro

LB - Meio Luria-Bertani

mAb - Do inglês 'monoclonal antibody'

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

T7 - Promotor para origem de replicação 7

uL - microlitro

V - volts

Lista de Símbolos

κ - kappa

γ - gama

β - beta

α - alfa

μ - mi ('micro')

Lista de Fórmulas

NO - *óxido nítrico*

NaOH - *hidróxido de sódio*

HCl - *ácido clorídrico*

H₂SO₄ - *ácido sulfúrico*

CO₂ - *dióxido de carbono*

Sumário

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Malária	21
1.2 Resposta Imune	24
1.3 Vacinas contra Malária	26
1.4 Direcionamento de antígenos para as Células Dendríticas	28
2 OBJETIVO	32
3 METODOLOGIA	34
3.1 Soluções e Reagentes	35
3.1.1 Preparação de Bactérias Competentes	35
3.1.2 Eletroforese em Gel de Agarose	35
3.1.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	35
3.1.4 'Western Blot'	36
3.1.5 ELISA	36
3.1.6 Cromatografia de Afinidade	37
3.1.7 Transfecção	37
3.1.8 Ensaios de Viabilidade e Especificidade dos Anticorpos Híbridos	38
3.2 Cultura Bacteriana	38
3.2.1 Meios de Cultura	38
3.2.2 Linhagens Bacterianas	38
3.2.3 Preparo das Bactérias Competentes	39
3.2.4 Transformação de Bactérias Competentes	40
3.2.5 Vetores	41
3.3 Ensaios de Imunização	41
3.3.1 Parasitemias	41
3.4 Metodologia	42
3.4.1 Expressão de Proteínas	42
3.4.2 Expressão da Proteína CS e suas porções em <i>E. coli</i>	42
3.4.3 Expressão dos Anticorpos Monoclonais Híbridos em Células HEK293T	43
3.4.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	44
3.5 Purificação de Proteínas	45
3.5.1 Procedimentos Comuns às Cromatografias de Afinidade	45

3.5.1.1	Preparação da Coluna.....	45
3.5.1.2	Parâmetros da Cromatografia de Afinidade.....	45
3.5.1.3	Monitoramento da Cromatografia.....	46
3.5.1.3	Limpeza da Coluna após Purificação.....	46
3.5.1.4	Cromatografia de Afinidade a Cauda de Histidina.....	46
3.5.2	Cromatografia de Afinidade a Proteína G.....	47
3.5.3	Análise das Proteínas Purificadas.....	48
3.5.4	Anticorpo Monoclonal Híbrido α DEC205.CSPy.....	48
3.6	Ensaio Imunológico (ELISA e western blot).....	48
3.6.1	Quantificação dos níveis séricos de anticorpos.....	48
3.6.2	Determinação de avidéz.....	49
3.6.3	Determinação dos isotipos de IgG.....	50
3.7	Ensaio de Viabilidade dos Anticorpos.....	51
3.8	Ensaio de IMunização.....	52
3.8.1	Modelo Experimental.....	52
3.8.2	Anticorpos Híbridos.....	52
3.8.3	Proteína Recombinante.....	53
3.9	Ensaio de Proteção.....	53
3.9.1	Desafios.....	53
3.10	Depleção de Linfócitos T CD4⁺ E CD8⁺.....	54
4	RESULTADOS.....	55
5	DISCUSSÃO.....	81
6	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS.....	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária é uma doença endêmica em diversos países de regiões tropicais e subtropicais. Causada pelo *Plasmodium*, um parasito do filo apicomplexa, em 2013 infectou aproximadamente 198 milhões de pessoas e causou cerca de 584 mil mortes, a maioria de crianças menores de 5 anos, em decorrência das complicações causadas pela infecção (1).

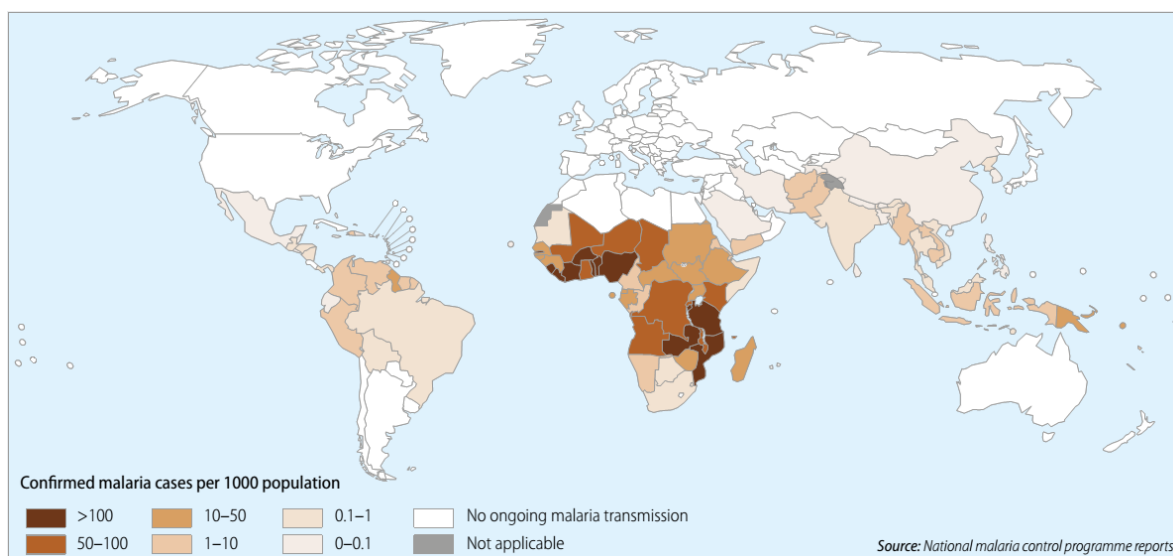


Figura 1 - Mapa esquemático apontando as regiões de áreas endêmicas, demarcadas em tonalidades diferentes, referenciando o número de casos em cada região por mil habitantes
Fonte: World Malaria Report 2014, WHO.

No mesmo período no Brasil a incidência foi de aproximadamente 200 mil casos, concentrados principalmente na região Amazônica (1). Em mais de 80% dos casos relatados no país as infecções são causadas por *P. vivax*, uma das espécies do parasito que infectam os seres humanos.

Além dessa, existem outras espécies que infectam humanos, como é o caso do *P. falciparum*, com infecções geralmente confinadas à regiões tropicais, e que juntamente com o *P. vivax* somam cerca de 95% das infecções no mundo (2); o *P.*

knowlesi, que apesar de ser mais conhecido por causar a doença em macacos, alguns casos de malária humana nas regiões de Borneo, Tailândia e Filipinas, tem sido atribuídos à essa espécie (3,4). Também são relatados casos de infecções ocasionadas por *P. ovale* e *P. malariae*, com a maioria dos casos registrados na região da África Oriental e na região da África subsaariana, respectivamente (2).

Nessas regiões tropicais e subtropicais do globo o clima é propício para o desenvolvimento do ciclo de vida de mosquitos, como os do gênero *Anopheles*, e são as fêmeas dessa espécie os vetores ideais para a transmissão desses parasitos.

Fêmeas do mosquito carreando esporozítos na sua glândula salivar injetam esses parasitos na pele do hospedeiro vertebrado durante nova hematofagia. Ao contrário do que se acreditava, esses parasitos não são injetados diretamente na corrente sanguínea, na verdade são depositados em diferentes partes da pele antes de atingirem os vasos, fato que parece não seguir um padrão randômico de movimentação (5). Quando na corrente sanguínea, o que pode levar de minutos a horas a partir do momento da picada, os esporozoítos migram até o fígado, onde invadem hepatócitos. Durante esse período os parasitos se dividem e se diferenciam em merozoítos, formas capazes de invadir eritrócitos. Para sair do fígado e chegar a corrente sanguínea novamente os parasitos conseguem se desprender dos hepatócitos em formações chamadas merossomos, constituídas de parte do citoplasma da células infectadas (6).

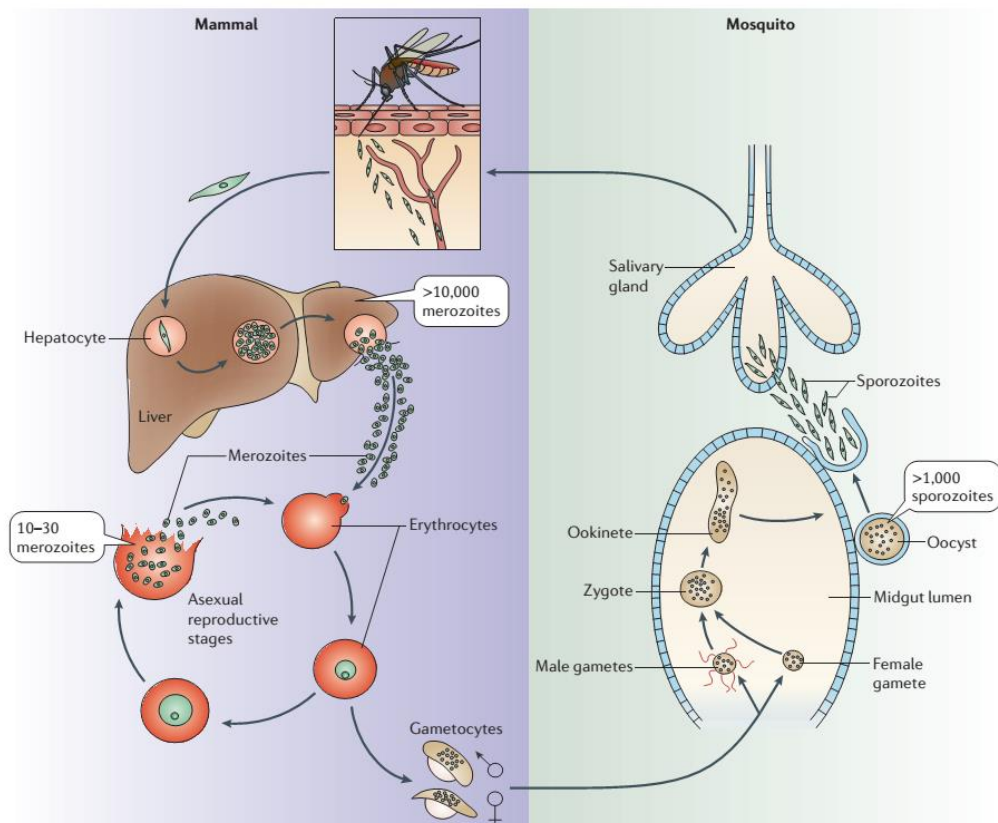


Figura 2 - Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento do parasito, apresentando as duas fases que ocorrem dentro do hospedeiro vertebrado e a fase sexuada que ocorre dentro do hospedeiro invertebrado. Fonte: Menard, R. 2015; doi:10.1038/nrmicro3111

Essas formações se rompem ao atingir o sangue liberando os merozoítos que irão invadir hemácias, iniciando a fase sanguínea do desenvolvimento (Figura 2).

Nesse estágio, após invadir os glóbulos vermelhos, o parasito se replica originando novos merozoítos que, ao serem liberados após hemólise, irão infectar novas células. Durante a replicação, alguns parasitos se diferenciam em formas gametocíticas capazes de infectar o vetor invertebrado. No momento da hematofagia, o mosquito ingurgita os gametócitos que irão, de forma sexuada, originar os oocistos contendo centenas de esporozoítos capazes de infectar o hospedeiro vertebrado.

Dentre os sintomas, geralmente observa-se que o paciente é acometido por anemia como consequência do rompimento direto das hemácias durante a replicação

do parasito, pela lise e remoção de hemácias pelo sistema imune ou pela supressão medular que pode ocorrer em determinados casos.

Grande parte dos sintomas clínicos atribuídos a infecção pelo *Plasmodium* são decorrentes do estágio sanguíneo de replicação. Febre alta, associada a calafrios, sudorese, dores de cabeça e pelo corpo podem seguir dias após a infecção.

Mesmo com um quadro, na maioria dos casos, sintomático, como descrito acima, a resposta imunológica protetora, quando gerada, requer uma reestimulação constante das células imunes, com antígenos do parasito, e mesmo assim, o hospedeiro permanece suscetível a reinfecção.

1.2 Resposta Imune

Em geral, a imunidade protetora contra vários organismos patogênicos depende da indução de resposta imune inata, após um primeiro contato, e da geração e manutenção do repertório de linfócitos de memória.

No caso de infecções pelo *Plasmodium*, estudos utilizando modelos murinos de infecção pelo *P. yoelii* e *P. chabaudi* demonstram, respectivamente, a importância da resposta imune inata, em limitar a carga parasitária (7), e da resposta imune adaptativa, na eliminação de estágios sanguíneos de infecção (8).

O sistema imune inato, através de células e moléculas solúveis presentes no sangue, fluidos extracelulares e secreções epiteliais, consegue enfraquecer ou eliminar o *Plasmodium* (9). Estudos com modelo murino de infecção pelo *P. chabaudi* demonstram, por exemplo, que na ausência de células NK (do inglês 'Natural killer') a parasitemia, na fase aguda da infecção e durante a recrudescência, é mais elevada (8). Em estudos com o *P. yoelii*, observa-se que a produção de IFN γ por essas células

está envolvida na cura espontânea da infecção durante o estágio sanguíneo de infecção (8,10).

Além das células NK, células da linhagem monocítica incluindo monócitos, células dendríticas e macrófagos apresentam um papel indispensável durante a infecção (11). As modificações que ocorrem na superfície de eritrócitos infectados (12) ativam monócitos de forma direta, através da interação de receptores com proteínas expressas pelo parasito na superfície das células infectadas (13–15); ou de forma indireta, por deposição de moléculas do sistema complemento ativadas (16) e de anticorpos, que, por sua vez, são capazes de ativar os monócitos, via receptores de complemento e receptores Fc (17,18), mediando a proteção por mecanismos envolvendo fagocitose. Os monócitos ativados nos tecidos podem se diferenciar em macrófagos, quando estimulados por M-CSF, ou em DCs, quando estimulados por IL4 e GM-CSF, por exemplo (9). Tanto macrófagos quanto DCs expressam receptores do tipo Toll (do inglês “*toll like receptor*” – TLR), que funcionam como sensores para a presença de micróbios (Tabela 1). A indução desses receptores promove diferenciação e ativação de DCs capazes de mediar mecanismos de resposta imune inata, por exemplo, através da produção de IFN γ e TNF α capazes de ativar macrófagos e células NK. Essa ativação pode ocorrer por contato direto através da expressão de moléculas co-estimulatórias CD80 e de algumas citocinas como IL15, IL12 e IFN α/β (19).

Além de expressar diferentes citocinas, durante a resposta imune inata, as DCs também são capazes de mobilizar linfócitos T *naive*. Essa propriedade intrínseca permite a indução de respostas imunes adaptativas através de três características básicas importantes: 1) sua distribuição por todo o corpo, especialmente na periferia

onde 2) através de receptores endocíticos expressos na membrana, conseguem capturar antígenos, iniciando os processos de maturação e migração para os órgãos linfoides periféricos, e então 3) promovem a ativação e expansão de linfócitos específicos, iniciando a resposta imune adaptativa. Essa resposta, em um contexto infeccioso, pode induzir uma resposta de memória, envolvendo células capazes de responder a um antígeno por longos períodos, mesmo após o término do processo de infecção (20).

Durante a malária uma resposta celular de memória correlaciona-se tanto com a ativação de linfócitos T específicos quanto com a apresentação de antígenos pelas DCs. Estudos utilizando modelos murinos de infecção pelo *Plasmodium* mostram que a proteção induzida por imunizações com esporozoítos irradiados requer resposta celular com ativação de linfócitos T CD4⁺ (21) importantes na expansão de linfócitos T CD8⁺ específicos para antígenos da fase pré-eritrocítica, por exemplo (22,23).

1.3 Vacinas contra Malária

Apesar dos esforços contínuos, métodos de prevenção são difíceis e nenhuma droga é universalmente eficaz (2). Por esse motivo, são diversos os grupos de pesquisa que atualmente buscam o desenvolvimento de formulações vacinais capazes de gerar uma resposta imune protetora e de longa duração contra antígenos do *Plasmodium*.

Buscando por essa resposta, algumas pesquisas têm demonstrado o efeito protetor da utilização de esporozoítos irradiados em ensaios de imunização (24,25). O estudo mais recente realizado por Hoffman e cols (26) demonstrou que todas as

peças submetidas a cinco imunizações com $1,35 \times 10^5$ esporozoítos irradiados (iSpz) de *P. falciparum* ficaram protegidas.

Mesmo a Mosquirix™ ou RTS,S, uma formulação vacinal desenvolvida e testada pela empresa GlaxoSmithKline (GSK), e que possui uma aceitação positiva pelas agências de saúde europeias, apresentou 50% de proteção em testes clínicos realizados em áreas endêmicas.

Embora os resultados sejam promissores, essa é uma estratégia que demanda alto investimento, o que pode dificultar sua distribuição e administração para a população em geral.

Nos últimos 10 anos, mais de 40 vacinas foram desenvolvidas na tentativa de controlar a infecção pelo *Plasmodium* sendo testadas em ensaios clínicos (27).

Assim como a Mosquirix™, a maior parte dessas formulações tem como alvo proteínas do parasito expressas na fase hepática do ciclo de desenvolvimento; uma outra parte busca como alvos proteínas da fase eritrocítica do desenvolvimento. Em ambos os casos o objetivo é o desenvolvimento de proteção mediante a indução de resposta celular por linfócitos T CD8⁺ ou resposta humoral associada ao desenvolvimento de linfócitos T CD4⁺ específicos a antígenos do parasito, respectivamente (27).

Mesmo promissores, os níveis de proteção obtidos estão ainda abaixo dos ideais, havendo a necessidade, não somente da administração de doses sequenciais da vacina, mas também da utilização de métodos de controle dos mosquitos vetores, para que se atinja um maior número dentro da população.

Por esse motivo, as pesquisas em vacinas contra malária buscam hoje não somente por novas formulações, mas também por novos métodos vacinais que

aprimorem a resposta imune de longa duração contra antígenos do *Plasmodium*, e que sobretudo, consigam induzir proteção maior.

1.4 Direcionamento de antígenos para as Células Dendríticas

Na última década, uma estratégia vacinal, utilizada com eficácia na geração de respostas imunes celular e humoral contra diferentes patógenos, consiste no direcionamento de antígenos para DCs utilizando anticorpos monoclonais que reconhecem receptores endocíticos expressos na membrana dessas células (28,29).

As DCs são centrais na indução de respostas adaptativas tanto no contexto de infecções causadas por patógenos quanto em imunizações, sendo também importantes para manutenção da tolerância periférica (30,31). Elas podem ser divididas em dois subtipos principais: as DCs convencionais (cDCs) e as DCs plasmocitóides (pDCs). As cDCs podem ser subdivididas pela expressão de moléculas de superfície (32,33), como a cadeia alfa da molécula CD8 (CD8 α) e a integrina CD11b (34). DCs CD8 α^+ e CD11b $^+$ apresentam expressão diferenciada de receptores do tipo Toll (TRL) e receptores para lectinas, como por exemplo DEC205 (CD205), Clec9A e langerina, expressos principalmente em DCs CD8 α^+ . As DCs CD11b $^+$ expressam exclusivamente o receptor de lectinas DCIR2 (35,36). Além disso, essas subpopulações são encontradas em diferentes regiões do linfonodo, sendo as DCs CD8 α^+ DEC205 $^+$ encontradas majoritariamente na zona de células T, enquanto as DCs CD8 α^- DCIR $^+$ são encontradas na polpa vermelha e na zona marginal (34,36). Essas características quanto a expressão de receptores de membrana e a localização dessas DCs em regiões distintas dentro dos órgãos linfoides secundários, podem

indicar propriedades funcionais diferentes para essas subpopulações. O direcionamento de antígenos para cada subpopulação pode também contribuir para o esclarecimento das funções de cada subpopulação. Estudos recentes mostraram que as DCs $CD11b^+DCIR2^+$ produzem mais IL4 e expressam também quimiocinas capazes de atrair linfócitos T $CD4^+$ e promover sua ativação. Por outro lado, as DCs $CD8\alpha^+DEC205^+$ expressam as citocinas IL12 e IL15 que estão envolvidas na diferenciação de linfócitos T citotóxicos (37,38) e na polarização da resposta imune para o perfil Th1 (36). Além disso, essa subpopulação tem a capacidade de promover apresentação cruzada de antígenos endocitados via moléculas de MHC I para células T $CD8^+$, fato importante quando procuramos induzir imunidade protetora contra infecções pelo *Plasmodium* utilizando antígenos expressos na fase hepática de seu desenvolvimento.

Vários estudos têm demonstrado a eficiência do direcionamento de antígenos utilizando como alvo o receptor endocítico DEC205. Em 2001, Hawiger e cols (28) demonstraram a necessidade da utilização de estímulos de maturação para as DCs na indução de resposta imune utilizando o direcionamento de antígenos com um anticorpo monoclonal α DEC205. Nesse estudo, o anticorpo monoclonal híbrido α DEC205 acoplado a proteína HEL (do inglês 'hen egg lysozyme') foi utilizado em testes de imunização, com ou sem estímulo de maturação. Camundongos imunizados apenas com o anticorpo monoclonal híbrido desenvolveram tolerância, com deleção de células T específicas ao antígeno. Por outro lado, a imunização com anticorpo monoclonal híbrido juntamente com um estímulo de maturação promoveu ativação prolongada de células T e imunidade (28). Da mesma forma, Bonifaz e cols. (39), utilizando anticorpo monoclonal α DEC205 acoplado a OVA, também observaram a

indução de tolerância em testes de imunização sem estimulação, fato que se modificou quando a imunização ocorreu juntamente com α CD40, um estímulo de maturação que levou à ativação prolongada de células T CD4⁺ e CD8⁺ (40).

Em modelo de EAE (encefalite experimental aguda), o direcionamento de antígenos também foi capaz de induzir tolerância à MOG (do inglês 'myelin oligodendrocyte glycoprotein') (41), peptídeo que induz a inflamação no sistema nervoso central em conjunto com a administração de toxina diftérica (42). O anticorpo monoclonal α DEC205 acoplado à OVA foi utilizado em outro estudo no qual camundongos foram imunizados juntamente com dois estímulos de maturação, α CD40 e poly I:C. A geração de resposta humoral específica foi medida contra o hapteno NP após a administração de uma dose de reforço com a proteína OVA-NP. Boscardin e cols. (43) observaram a geração de uma resposta de células T auxiliares capaz de induzir uma resposta humoral específica. No mesmo trabalho, a proteína circumsporozoíta utilizada em fusão com o anticorpo monoclonal α DEC205 foi efetiva na geração de resposta de células T específicas ao antígeno, auxiliando na geração de anticorpos contra a proteína em questão (44). A ativação específica do sistema imune também foi observada em estudos com a proteína Gag p24 do vírus HIV direcionada para as DCs utilizando anticorpos monoclonais contra o receptor DEC205. Nesse caso o direcionamento foi capaz de aumentar a produção de IFN γ e IL2 por células T CD4⁺ (45) e de levar à proteção contra o desafio com vírus vaccínia expressando a proteína Gag recombinante (29).

Em estudos utilizando o antígeno LcrV de *Yersinia pestis*, o direcionamento para DCs foi efetivo em gerar resposta imune celular com aumento de células T CD4⁺

produtoras de IFN γ e resposta imune humoral com produção de anticorpos IgG2a e IgG2c específicos (46).

2 OBJETIVO

Na infecção pelo *Plasmodium*, o grande desafio está na geração de uma resposta imunológica de memória protetora e duradoura. E a utilização de anticorpos monoclonais quiméricos em fusão com antígenos de *Plasmodium* pode promover essa resposta, como tem sido mostrado para outros patógenos.

Um dos antígenos amplamente estudados que buscam a ativação de uma resposta imune eficaz é a proteína de circumsporozoíta (CS), a mesma utilizada na formulação vacinal aprovada recentemente.

Boscardin e cols., em 2006 (43), demonstraram que o direcionamento da CSP de *P.yoelii* para DCs DEC205⁺ promoveu a ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ específicos à proteína.

Sendo assim, o objetivo central desse trabalho será avaliar a capacidade protetora dessa resposta imune gerada quando direcionamos essa proteína para a subpopulação de DCs DEC205⁺CD8 α ⁺.

Para tal nossos objetivos específicos foram iniciados com a produção dos anticorpos híbridos, da proteína CS recombinante e, posteriormente, suas porções distintas pra utilização em ensaios de imunização e avaliação da proteção e dos mecanismos envolvidos nesse fenômeno.

3 METODOLOGIA

3.1 Soluções e Reagentes

3.1.1 Preparação de Bactérias Competentes

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

3.1.2 Eletroforese em Gel de Agarose

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

3.1.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

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

- Solução Corante: Azul de Coomassie G250 0,25%, Ácido Acético Glacial 10% e Etanol 45%
- Solução Descorante: Ácido Acético Glacial 10% e Etanol 30%

3.1.4 'Western Blot'

- Tampão de Transferência: Solução Tris-HCl 25 mM pH 8,3, Glicina 200 mM e Metanol 20%
- PBS: Cloreto de Potássio 2,7 mM, Cloreto de Sódio 137 mM, Fosfato Dibásico de Sódio 8,1 mM e Fosfato Monobásico de Potássio 1,5 mM. Ao final do preparo o pH da solução deve ser acertado para 7,4.
- Tampão de 'Bloqueio': Leite Desnatado 5% em PBS e Tween 20 0,05%
- Tampão de 'Lavagem': PBS e Tween 20 0,05%
- Corante Vermelho de Ponceau: Ponceau S 0,5% em Ácido Acético Glacial 10%
- Solução de Revelação: 0,05% DAB e 0,02% H₂O₂ em PBS

3.1.5 ELISA

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

- Solução que interrompe a reação de revelação: Ácido Sulfúrico 4N ou HCl 1 N

3.1.6 Cromatografia de Afinidade

- Tampão de 'Sonicação': 50 mM TRIS, 200 mM de Cloreto de Sódio, 10 mM de Imidazol, 10% Glicerol pH 8.
- Tampão de 'lavagem' para Cromatografia de Afinidade a Cauda de Histidina: 50 mM TRIS, 500 mM de Cloreto de Sódio, 30 mM de Imidazol, 10% Glicerol pH 8.
- Tampão de eluição: 50 mM TRIS, 1000 mM de Cloreto de Sódio, 500 mM de Imidazol, 10% Glicerol pH 8.
- Tampão de 'lavagem' para Cromatografia de Afinidade a Proteína G: PBS
- Tampão de Eluição para Cromatografia de Afinidade a Proteína G: Tampão Tris-Glicina 0,1 M pH 2. Acrescentar em cada microtubo 50 uL de tampão TRIS 1 M pH 8 antes de eluir.

3.1.7 Transfecção

- Meio de Cultivo Celular Eucariótico *in vitro*: DMEM suplementado com Bicarbonato de Sódio 45 mM, HEPES 25 mM e 5% de soro fetal bovino com baixa quantidade de IgG.
- PEI (polietilenoimina): Concentração de 0,45 mg/mL
- Clones: 10 ug/placa de cada construção, ou seja, da construção que carrega a cadeia leve do anticorpo monoclonal α DEC205, que carrega a cadeia pesada do anticorpo monoclonal α DEC205 conjugada a porção codificante da proteína CS de *P.yoelii*.

3.1.8 Ensaio de Viabilidade e Especificidade dos Anticorpos Híbridos

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

3.2 Cultura Bacteriana

3.2.1 Meios de Cultura

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

Meio de Cultura Líquido

- LB: Triptona 1%, Extrato de Levedura 0,5% e NaCl 1%

Meio de Cultura Sólido

- LB: Triptona 1%, Extrato de Levedura 0,5%, NaCl 1% e Ágar 1,5%

3.2.2 Linhagens Bacterianas

As características das linhagens bacterianas utilizadas para expressão das proteínas recombinantes são descritas na tabela abaixo.

Tabela 2 - Descrição das linhagens de *Escherichia coli* utilizadas.

Linhagem Bacteriana	Características
DH5α	Cepa utilizada para clonagens e obtenção de material plasmidial.
BL21 DE3	Cepa utilizada para a expressão de proteínas recombinantes. Possui o gene da T7 RNA polimerase integrado ao cromossomo (λ DE3) sob controle do promotor <i>lacUV5</i> , induzível por IPTG.

3.2.3 Preparo das Bactérias Competentes

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

3.2.4 Transformação de Bactérias Competentes

As linhagens de bactérias competentes foram transformadas conforme o método de 'choque térmico' como descrito a seguir.

Às alíquotas de 20 μL da suspensão de células competentes foi adicionado 5 μL do produto das reações de ligação ou 1 μL da solução de DNA plasmidial e 80 μL da solução de cloreto de cálcio 0,1 M. A solução foi incubada no gelo e após 30 min foi submetida ao choque térmico a 42 °C por 40 segundos e novamente incubada a 4 °C por 5 min. Para recuperação da parede bacteriana foi adicionado 300 μL de meio LB líquido a suspensão de células e estas foram incubadas a 37 °C sob agitação orbital por 90 min. Em seguida as células foram centrifugadas (2000 RPM a temperatura ambiente). Do sobrenadante, foram retirados 200 μL , e o restante foi utilizado para homogeneizar cuidadosamente as células que foram plaqueadas em meio LB sólido seletivo. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 h.

3.2.5 Vetores

Os vetores utilizados para as sub-clonagens das porções codificantes da proteína CS como são na tabela a seguir.

Tabela 3 - Descrição das características dos vetores

Vetores	Características
pET28a	Vetor de sub-clonagem e expressão de proteínas recombinantes em <i>E.coli</i> . Possui f1ori, Kan ^R e <i>lacI</i> . A expressão da proteína de interesse fica sob controle da T7RNAPol, induzida pela adição de IPTG ao meio de cultura seletivo.
pET21b	Vetor de sub-clonagem e expressão de proteínas recombinantes em <i>E.coli</i> . Possui f1ori, Amp ^R e <i>lacI</i> . A expressão da proteína de interesse fica sob controle da T7RNAPol, induzida pela adição de IPTG ao meio de cultura seletivo.

3.3 Ensaio de Imunização

3.3.1 Parasitemias

Coloração de esfregaços sanguíneos utilizando soluções de kit Panótico rápido

- Panótico rápido n 1: compõe-se por uma solução de triarilmetano a 0,1%.
- Panótico rápido n 2: compõe-se por uma solução de xantenos a 0,1%.
- Panótico rápido n 3: compõe-se por uma solução de tiazinas a 0,1%.

3.4 Metodologia

3.4.1 Expressão de Proteínas

A porção codificante da CSP de *P. yoelii*, e suas porções, foi clonada em vetores de expressão em procarioto pET21b ou pET28a, com o objetivo de obtermos as proteínas recombinantes e os anticorpos híbridos carregando a proteína inteira, expressos *in vitro* no modelo procarioto utilizando *E. coli* BL21 DE3, e no modelo eucarioto de expressão em células HEK293T (ATCC CRL-11268™), respectivamente.

3.4.2 Expressão da Proteína CS e suas porções em *E. coli*

A indução da expressão da proteína recombinante no modelo de expressão *in vitro* em procarioto foi realizada com o clone em pET21b ou pET28a utilizando cepas transformadas por “choque-térmico” de *E. coli* BL21 DE3. A partir de um pré-inóculo contendo 5 mL de meio LB seletivo com ampicilina ou kanamicina, incubado por 18 h a 37 °C sob agitação orbital, fez-se um inóculo em 50 mL de meio seletivo, igual ao anterior, na proporção de 1:100, o qual foi incubado por aproximadamente 3 h a 37 °C sob agitação orbital, até atingir uma DO 600nm entre 0,5 e 0,6. Após esse período, o frasco foi retirado da incubação e separado em alíquotas de 5 mL, às quais foi acrescentado IPTG, um indutor da transcrição de proteínas reguladas pelo promotor T7, em diferentes concentrações. Os inóculos foram então mantidos por mais 4 h à 37 °C sob agitação, e depois centrifugados. O precipitado de células foi ressuscitado em 150 µL de água, depois acrescentado 50 µL de tampão de amostra para proteínas 5 vezes concentrado com redução,

seguindo o procedimento padrão para submeter às amostras a eletroforese me gel de poliacrilamida, tornando possível a visualização dos extratos celulares não induzidos e induzidos com diferentes concentrações de IPTG. A expressão da proteína recombinante em maior quantidade foi realizada em frascos erlenmeyer de 2 L contendo 200 mL de meio de cultivo LB seletivo. Após o período de indução, os extratos celulares, obtidos após a centrifugação do volume de crescimento, foram ressuspensos em tampão de sonicação completo com PMSF 1 mM e lisozima na concentração de 20 µg/mL. Após a ruptura dos extratos celulares, esses foram centrifugados para separação das porções de proteínas solúveis e insolúveis, sendo a porção solúvel utilizada para purificação da CSP de *P. yoelii*.

3.4.3 Expressão dos Anticorpos Monoclonais Híbridos em Células HEK293T

O anticorpo monoclonal híbrido, denominado α DEC205.CSPy, foi produzido *in vitro* por transfecção transitória de células HEK293T na presença de PEI, um polieletrólito positivamente carregado quando em solução aquosa, e de especial interesse devido à sua capacidade de se ligar a ácidos nucléicos, diminuindo a força de repulsão eletrostática que ocorre naturalmente entre componentes de cargas iguais, como é o caso do DNA e da membrana plasmática, possibilitando a transfecção celular. Essas células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) completo, suplementado com 5% de soro fetal bovino com baixa concentração de imunoglobulinas, em placas com volume final de 20 mL cada. O procedimento foi realizado com as células apresentando uma confluência de cerca de 80%.

Aproximadamente 10 µg de DNA plasmidial, um que codifica a cadeia pesada dos anticorpos acoplada à porção codificante da CSPPy e um que codifica a cadeia leve κ dos anticorpos foram colocados em solução contendo PEI na concentração de 0,45 mg/mL por 10 min. Após esse período, foi adicionado 1 mL da solução à cada placa de cultura, por gotejamento. Após uma semana em estufa à 37 °C e 95% de CO₂, o sobrenadante de cultura foi coletado e submetido à centrifugação (3000 RPM por 20 min), para retirada de restos celulares. Após filtração a 0,45 µm, os anticorpos foram precipitados a partir do sobrenadante pela adição gradual de 60% do volume em massa de sulfato de amônio (Amresco), mantido sob agitação constante a 4 °C por 18 h. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 5000 RPM por 30 min, sendo o precipitado ressuscitado em 25 mL de PBS gelado. Foi então adicionado ao ressuscitado PMSF 1 mM, e colocado em diálise contra 2 L de PBS gelado por 12 h, sendo o tampão trocado ao menos duas vezes durante esse período. A solução foi retirada da diálise, e os anticorpos monoclonais purificados por cromatografia de afinidade à proteína G.

3.4.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Amostras das culturas induzidas e não induzidas com IPTG, assim como das frações coletadas na etapa de expressão das proteínas, foram analisadas por SDS PAGE. Os géis confeccionados com 1mm de espessura possuíam uma concentração de acrilamida de 5% no gel de “empilhamento”, e de 12% a 15% no gel de “separação”. O tampão com agente redutor 5 vezes concentrado foi adicionado às amostras, e estas foram então aquecidas à 96

°C por 5 min. As eletroforeses foram efetuadas a 120 V, em tampão de corrida 1 x à TA. Os géis foram corados com solução corante por 1 h, e descorados com solução descorante até a visualização das bandas de proteínas.

3.5 Purificação de Proteínas

3.5.1 Procedimentos Comuns às Cromatografias de Afinidade

3.5.1.1 Preparação da Coluna

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

3.5.1.2 Parâmetros da Cromatografia de Afinidade

O suporte utilizado para empacotamento da resina ligada a níquel, não possibilitava a utilização de bomba peristáltica. Por isso, todo o processo foi determinado pela força gravitacional, sobre uma coluna de tampão com aproximadamente 12 mL. Para a purificação da proteína, a resina empacotada foi equilibrada utilizando 25 volumes de tampão. O sobrenadante de cultura induzido com IPTG foi passado pela coluna. A resina foi lavada

com 50 mL de tampão, retirando impurezas presentes no sobrenadante que possam ter ligado de forma inespecífica a resina. A proteína recombinante foi eluída utilizando 5 mL de solução contendo 500 mM de imidazol, que compete com o níquel pela ligação à His6.

3.5.1.3 Monitoramento da Cromatografia

O monitoramento da cromatografia foi realizado utilizando-se o método microanalítico com reagente de Bradford (47). Em placa de 96 poços, foram adicionados 20 µL de amostra em 180 µL do reagente. Como controle negativo, foi utilizado o tampão em que as amostras de proteína se encontravam diluídas. Sendo assim, foram selecionadas as amostras que continham proteína para posterior análise por SDS-PAGE.

3.5.1 Limpeza da Coluna após Purificação

Após a eluição da proteína a resina foi lavada com 10 mL de tampão de eluição, com 20 mL de SDS 0,2 M e 20 mL de ácido acético 0,1 M, para que houvesse a completa remoção de material proteico da coluna e armazenada em etanol 30% a 4 °C.

3.5.1.4 Cromatografia de Afinidade a Cauda de Histidina

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

O volume de 2 mL da resina de microesferas de sefarose ligada a níquel, NiNTA superflow (Qiagen), foi lavada e equilibrada com 25 volumes da coluna, equivalente a 50 mL, com tampão. A coluna utilizada para realização da cromatografia, Poly-Prep Chromatography Columns Bio-Rad, não permite a utilização de bomba peristáltica para controle do fluxo de passagem do tampão ou da amostra pela resina. Nesse caso a força exercida sobre a resina era da coluna de líquido acima da resina com mais ou menos 8 mL. Após a lavagem e equilíbrio da coluna com tampão de lavagem, a porção de proteínas solúveis, obtida após a centrifugação do lisado celular, foi colocada na coluna. Após a passagem do sobrenadante, a resina foi lavada com 10 volumes de tampão, retirando qualquer proteína que tenha ficado ligada na resina de forma inespecífica. Para eluição, foi utilizado 5 mL de tampão contendo 500 mM de imidazol. Foram coletadas diversas frações de eluição, com 500 uL cada, sendo a presença de proteínas acompanhada pelas reações com o reagente de Bradford.

3.5.2 Cromatografia de Afinidade a Proteína G

Os anticorpos híbridos foram purificados utilizando cromatografia de afinidade à proteína G. Para tal, o sobrenadante de cultura das células transfectadas foi coletado e passado na coluna, após a lavagem e equilíbrio da resina. As diferentes frações eluídas com tampão Glicina 100 mM pH 3 foram testadas para a presença de proteínas utilizando o reagente de Bradford (Amresco). À cada tubo utilizado para eluir foi adicionado 50 uL de tampão

TRIS (Amresco) 1 M pH 8, para equilibrar o pH da amostra evitando degradação.

3.5.3 Análise das Proteínas Purificadas

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

O rendimento de expressão e purificação foi calculado com base no volume de meio de cultura induzido e na quantidade de proteína purificada.

3.5.4 Anticorpo Monoclonal Híbrido α DEC205.CSPy

Da mesma forma que a proteína recombinante, o rendimento de expressão e purificação foi calculado com base no volume de meio de cultura coletado e da quantidade de proteínas obtidas. Testes para determinação da viabilidade e especificidade dos anticorpos foram realizados. A análise desses experimentos foi realizada utilizando-se o programa FlowJo (TreeStar Inc.).

3.6 Ensaios Imunológicos (ELISA e western blot)

3.6.1 Quantificação dos níveis séricos de anticorpos

Microplacas de 96 poços (High Binding Polystyrene Corning) foram sensibilizadas com CSP ou extrato total do parasito, que variaram entre 200 e 400 ng/poço em PBS por 16 h a temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com solução de PBS-Tween 0,02% entre as diferentes

incubações. Possíveis sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados com solução contendo BSA 0,25% por 4 h a temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens, os soros dos animais foram aplicados numa diluição inicial de 1:50 seguidos de diluição seriada na proporção de 1:3, e incubados por 2 h a TA. Em seguida o anticorpo secundário α lgG total (SouthernBiotech) foi incubado na diluição 1:2000, respectivamente. A reação foi revelada durante 20 min após a adição de solução de revelação, contendo TMB (BD) ou OPD (Amresco), e interrompida pela adição de H_2SO_4 4 N ou HCl 1 N. A intensidade da coloração foi determinada pela medida da absorbância a 450 nm ou 490 nm.

3.6.2 Determinação de avidéz

Microplacas de 96 poços (High Binding Polystyrene Corning) foram sensibilizadas com CSP ou extrato total do parasito, que variaram entre 200 e 400 ng/poço em PBS por 16 h a temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com solução de PBS-Tween 0,02%. Possíveis sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados com solução contendo BSA 0,25% por 4 h a temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens, os soros dos animais foram aplicados numa diluição em que a absorbancia final de leitura após a revelação fosse, aproximadamente 1, e incubados por 2 h a TA. Uma duplicata de cada soro foi lavada três vezes com 7M de ureia em PBS, por 2 minutos a TA, enquanto a outra duplicada foi lavada somente com PBS 1X. Em seguida o anticorpo secundário α lgG total (SouthernBiotech) foi incubado na diluição 1:2000, respectivamente. A reação foi revelada durante 20 min após a

adição de solução de revelação, contendo TMB (BD) ou OPD (Amresco), e interrompida pela adição de H_2SO_4 4 N ou HCl 1 N. A intensidade da coloração foi determinada pela medida da absorbância a 450 nm ou 490 nm. A avides dos antiorpos foi medida pela razão entre a absorbancia das duplicatas lavadas com ureia pela absorbancia das duplicatas lavadas apenas com PBS.

3.6.3 Determinação dos isotipos de IgG

Os titulos dos isotipos de IgG produzidas durante as imunizações foram determinados por ensaios de ELISA. Microplacas de 96 poços (High Binding Polystyrene Corning) foram sensibilizadas com CSP que variaram entre 200 e 400 ng/poço em PBS por 16 h a temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com solução de PBS-Tween 0,02% entre as diferentes incubações. Possíveis sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados com solução contendo BSA 0,25% por 4 h a temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens, o 'pool' de soros dos animais foram aplicados na diluição determinada previamente e incubados por 2 h a TA. Em seguida os anticorpos secundários αIgG1 , αIgG2a , αIgG2b e αIgG3 (SouthernBiotech) foram incubados na diluição inicial de 1:50, seguindo a diluição seriada na proporção de 1:2. A reação foi revelada durante 20 min após a adição de solução de revelação, contendo TMB (BD) ou OPD (Amresco), e interrompida pela adição de H_2SO_4 4 N ou HCl 1 N. A intensidade da coloração foi determinada pela medida da absorbância a 450 nm ou 490 nm.

3.7 Ensaios de Viabilidade dos Anticorpos

Esplenócitos totais de camundongos selvagens foram utilizados em ensaios *in vitro* e *ex vivo*, para determinar a capacidade do anticorpo monoclonal híbrido em reconhecer o receptor DEC205 de forma específica, expresso em DCs. A coleta de células do baço para os experimentos *ex vivo* ocorreu no dia dos referidos experimentos, quando os camundongos foram sacrificados e o órgão coletado. Todos os órgãos foram macerados e as células separadas utilizando um filtro celular (do inglês “*cell strainer*”) (BD Falcon 100 μm). Após a primeira lavagem, utilizando meio de cultura RPMI completo, os eritrócitos foram retirados utilizando solução de lise. Mantida no gelo, a solução de células foi ressuspensa, e a quantidade de células estimada através da contagem da câmara de Neubauer, utilizando solução de “Trypan Blue” para observarmos a viabilidade das células. As células foram incubadas com o anticorpo $\alpha\text{CD16/CD32}$ (clone 2.4G2) que reconhece e bloqueia receptores da porção Fc na membrana das células, na concentração de 1:100. Após 15min foram plaqueadas 5×10^6 células/poço e incubadas no gelo com as diferentes concentrações de anticorpos monoclonais híbridos. Após 40 min, as células foram lavadas com tampão de FACS e incubadas no gelo com anticorpo secundário αIgG1 conjugado ao fluoróforo PE (BD Biosciences). Passados mais 40 min as células foram lavadas, ressuspensas e adquiridas por citômetro de fluxo. Os resultados foram analisados utilizando programa FlowJo (TreeStar Inc).

3.8 Ensaios de Imunização

3.8.1 Modelo Experimental

A escolha do modelo murino de infecção com *P. yoelii* se deve ao fato de que a infecção por esse parasito mimetiza algumas das características da infecção pelo *P. falciparum* em humanos, espécie responsável pela alta taxa de mortalidade em se tratando de malária. O uso deste modelo possibilita estudos de progressão da infecção e da resposta imune ocasionados pelo Plasmodium, o que é inviável em estudos com humanos. Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pelo comitê de ética de experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (protocolo número 082), em Paris pelo comitê de ética em experimentação animal (CETEA) (protocolo número 2013-0093) e no Ministério de Ensino Superior e de Pesquisa - Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche - (MSER) (protocolo número 01324).

3.8.2 Anticorpos Híbridos

Com o intuito de dissecar a capacidade protetora da imunização com o anticorpo monoclonal α DEC205 fusionado a proteína CS de *P. yoelii* (α DEC205.CSPy), decidimos utilizar como controle o anticorpo monoclonal α DEC205.CS sem capacidade de direcionamento. Sendo assim, desnaturamos o α DEC205.CS a 95 °C por 10 minutos. Observamos que, mesmo após alguns testes de renaturação realizados para descartar uma possível recuperação da capacidade de ligação, o anticorpo não reconheceu DCs caracterizadas como $CD8\alpha^+MHCII^+CD11c^+$. Acreditamos que a melhor opção de controle para o direcionamento da proteína CS é a utilização do

anticorpo desnaturado, visto que carrega a proteína CS, mas sem reconhecer o receptor expresso na superfície das DCs.

3.8.3 Proteína Recombinante

Nos ensaios em que a proteína recombinante foi usada como controle não direcionado, sempre utilizamos doses equimolares de proteína recombinante com relação aos anticorpos monoclonais híbridos. Sendo que 5 ug do anticorpo correspondem a 2 ug de CSr.

3.9 Ensaios de Proteção

3.9.1 Desafios

Os animais imunizados foram desafiados por via intradérmica, utilizando microinjeção na região da pata traseira, com cerca de 5000 parasitos obtidos pela dissecação de glândulas salivares de mosquitos infectados com cepa letal de *P. yoelii* 17XL. O desenvolvimento de parasitemia foi observado por esfregaços sanguíneos corados e analisados por microscópio. A coloração das lâminas foi realizada conforme informações do fabricante (Laborclin). De forma sucinta, após a realização das extensões sanguíneas, os esfregaços foram fixados pela imersão das lâminas na solução 1 por aproximadamente 10 segundos; em seguida as lâminas foram imergidas pelo mesmo tempo nas soluções 2 e 3, respectivamente, e lavadas em água corrente, secadas em estufa a 37 °C ou a temperatura ambiente.

3.10 Depleção de Linfócitos T CD4⁺ E CD8⁺

Animais imunizados foram depletados de linfócitos T utilizando 400 ug 3 e 1 dia antes do desafio, via intraperitoneal, dos anticorpos anti-CD4 (clone G1.5), anti-CD8 (clone 2.43) ou com isotipo controle, todos anti-camundongos. A depleção foi confirmada com a marcação de células do sangue periférico para expressão de moléculas CD3, CD4 (clone RM4-5) e CD8 (clone 53-6.7) marcados com fluoróforos. Após a marcação, as células foram adquiridas por citômetro de fluxo e o resultado analisado utilizando o programa FlowJo.

4 RESULTADOS

Com o intuito de dissecar a capacidade protetora da resposta gerada durante a imunização com a proteína CS direcionada, iniciamos o projeto com a produção do anticorpo monoclonal fusionado e da proteína recombinante (figura 3). As porções codificantes para proteína CS haviam sido previamente clonadas em vetor de expressão em eucarioto, para expressão dos anticorpos, e em vetor de expressão em procarioto, para obtenção da proteína recombinante (43).

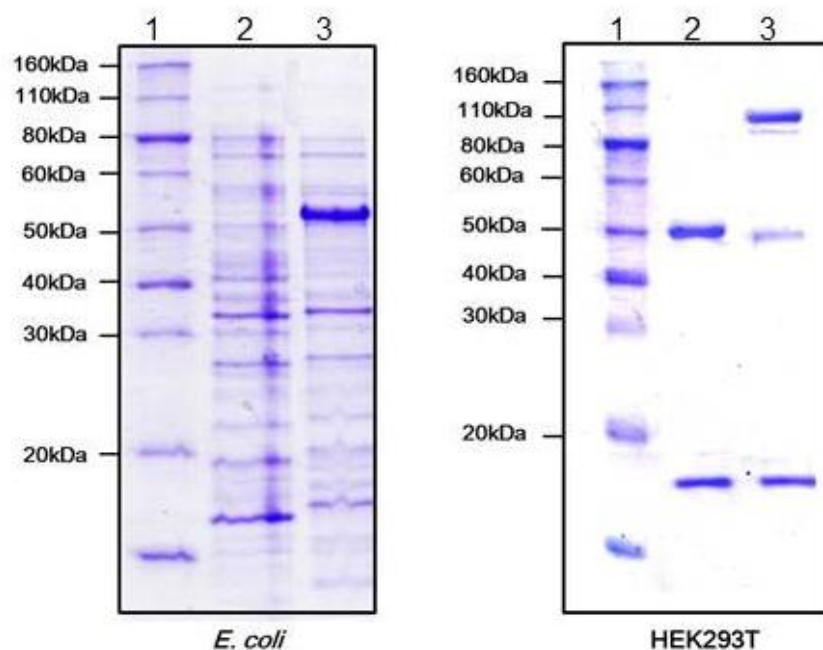


Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% mostrando a esquerda a expressão da proteína CSr, e a direita os anticorpos purificados. No gel a esquerda, corado com corante coomassie azul, podemos observar da esquerda para a direita (1) o marcador de peso molecular com os referidos valores a esquerda do gel; (2) o extrato de *E coli* DE3 não induzido, para utilização como comparativo de bandas para (3) extrato induzido da mesma cepa de bactéria, mas nesse caso, transformada e induzida com IPTG para expressão da proteína CSr. No gel a direita, também corado com azul de coomassie, observamos da esquerda para a direita (1) o marcador de peso molecular, com os referidos valores a esquerda do gel; (2) o anticorpo híbrido vazio (α DEC205 ϕ), utilizado como comparativo para (3) o anticorpo híbrido fusionado à proteína CS de *P yoelii*. No caso dos anticorpos híbridos foram utilizadas células HEK293T para a expressão e seu sobrenadante de cultura para a purificação dos anticorpos por cromatografia de afinidade à proteína G.

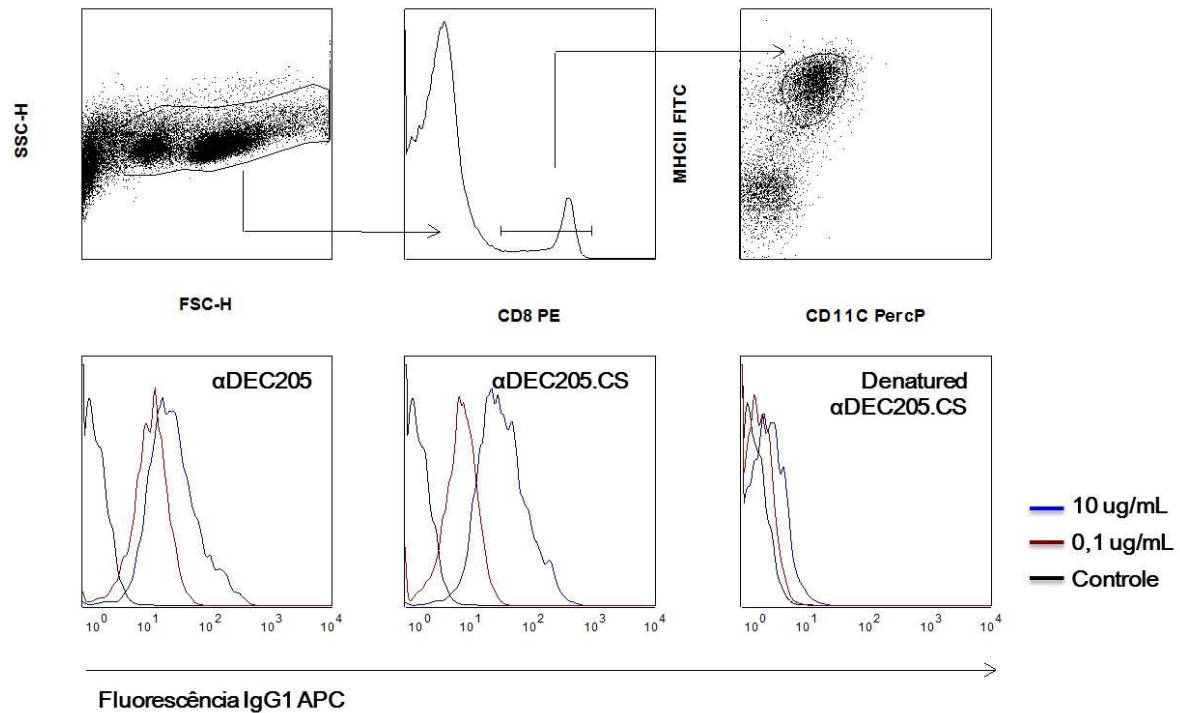


Figura 4 - Anticorpos híbridos nativos reconhecem o receptor DEC205 expresso por DCs, ao contrário dos anticorpos desnaturados, que não foram capazes. Anticorpos híbridos nativos e desnaturados (10 minutos a 95 °C) foram incubados com 5×10^6 células foram incubadas com o anticorpo α DEC205 ou com anticorpo α DEC205.CS ou com α DEC205.CS desnaturado. O α DEC205 foi utilizado como controle positivo de ligação à DCs. Esse anticorpo não carrega nenhuma porção proteica a mais em sua estrutura e a partir desse momento será referido no texto como α DEC205 ϕ . α DEC205.CS desnaturado foi pensado como a melhor solução para um controle da proteína direcionada. Nesse caso o anticorpo carrega a proteína mas não liga ao receptor celular DEC205. Para obtenção do controle o anticorpo α DEC205.CS foi aquecido a 95 °C por 10 min, centrifugado, para retirada de corpúsculos insolúveis que podem se formar durante o processo de desnaturação, e requantificado.

Após a produção e purificação, os anticorpos foram testados para sua capacidade de ligação à DCs DEC205⁺. Para isso realizamos um ensaio de ligação utilizando esplenócitos totais teste de ligação observamos que o anticorpo α DEC205.CS reconheceu de forma dose dependente, assim como o controle α DEC205 ϕ , DCs caracterizadas pelo fenótipo CD8 α ⁺MHCII⁺CD11c⁺. Ao contrário do ocorrido com o anticorpo desnaturado que, mesmo após alguns testes de renaturação, realizados para descartar uma possível recuperação da capacidade de ligação, não reconheceu DCs (figura 4).

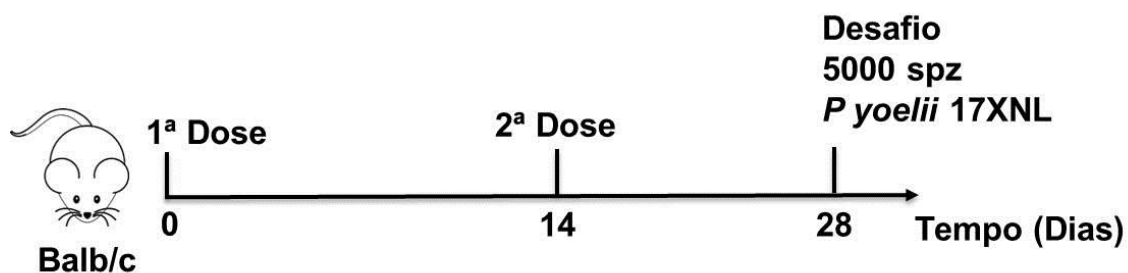


Figura 5 - Esquema do desenho experimental do primeiro ensaio de imunização. Camundongos Balb/c foram imunizados por via intraperitoneal duas vezes com intervalo de 14 dias entre as duas doses. Animais do grupo controle receberam apenas adjuvante Poly I:C (50ug), enquanto os grupos experimentais receberam 5 ug do anticorpo híbrido fusionado ou do anticorpo desnaturado juntamente com Poly I:C (50ug). E os animais do grupo que recebeu a proteína recombinante foram imunizados com 2 ug, quantidade equimolar de proteína presente em 5 ug dos anticorpos. Os animais foram desafiados por via intradérmica com 5.000 esporozoítos 15 dias após a segunda imunização.

Visto que os anticorpos híbridos produzidos reconheceram DCs que expressam o receptor DEC205, e a perda da capacidade de ligação do controle desnaturado foi caracterizada, iniciamos os ensaios de imunização.

Como primeiro experimento testamos se a resposta imune induzida nos animais que recebem a proteína direcionada seria protetora mediante ensaios de desafio. Para tanto, camundongos selvagens foram imunizados duas vezes com 5 ug do anticorpo α DEC205.CS intacto ou desnaturado, ou com 2 ug da proteína recombinante, sempre na presença de Poly I:C, com intervalo de 15 dias entre as doses (figura 5). A quantidade de proteína utilizada nas imunizações foi equimolar à quantidade de proteína presente nas doses de 5 ug dos anticorpos. Passados 15 dias da segunda imunização, os animais foram desafiados por via id com 5.000 esporozoítos de *P. yoelii* (figura 5). O desenvolvimento de infecção foi analisado através de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa para contagem de eritrócitos infectados (iRBC).

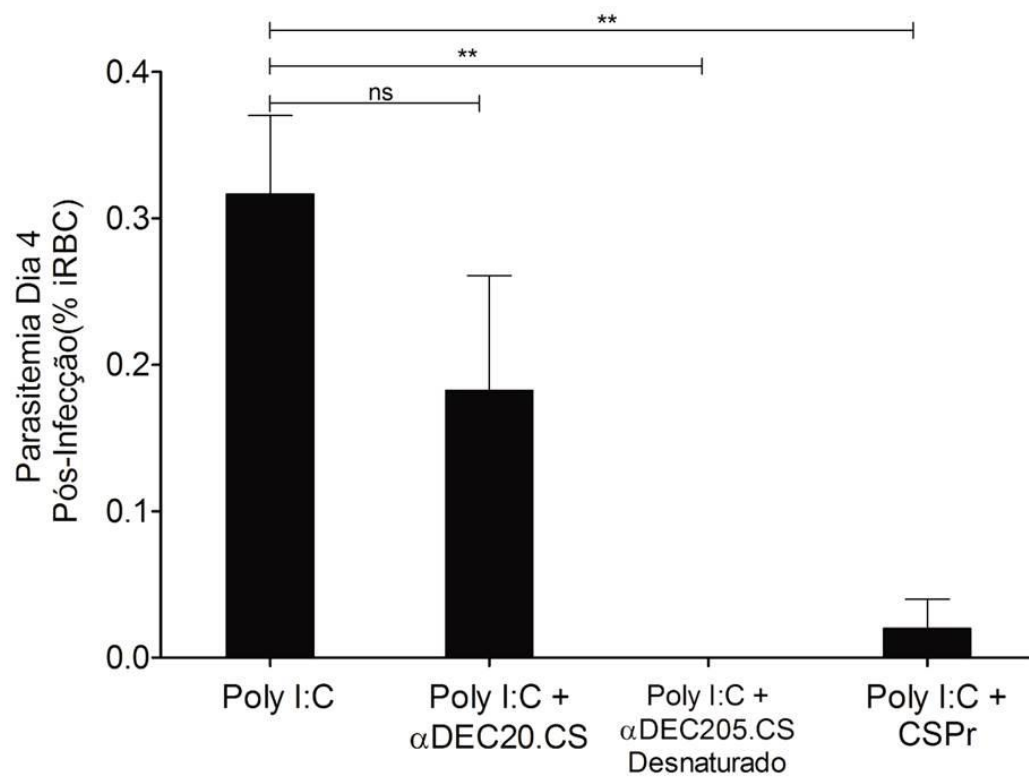
Observamos que quatro dias pós-infecção os animais do grupo imunizado com α DEC205.CS apresentavam uma parasitemia similar ao grupo controle

imunizado apenas com adjuvante. Em animais imunizados com a proteína não-direcionada, a infecção foi indetectável nos grupos imunizados com α DEC205.CS desnaturado. Mas nos animais do grupo controle, que receberam somente a proteína recombinante a infecção foi significativamente menor, em relação a imunização com a proteína direcionada (figura 6 gráfico).

A capacidade das imunizações em gerar proteção estéril foi medida por esfregaços sanguíneos feitos, aproximadamente, 10 dias após a infecção. Os animais que receberam a proteína não direcionada apresentavam uma taxa de proteção estéril de 50%, ao contrário dos animais imunizados com α DEC205.CS os quais, assim como os camundongos controles do adjuvante, não apresentaram proteção estéril (figura 6 tabela).

O fato de, nesse primeiro experimento, os animais que receberam a CS direcionada não apresentaram o mesmo grau de proteção que os animais imunizados com a proteína não direcionada (anticorpo desnaturado) levantou alguns questionamentos.

Wilson e cols. (2006) demonstraram que DCs primeiramente ativadas via TLR9, utilizando CpG como adjuvante, ficavam refratárias a novos estímulos de ativação por um intervalo de 21 dias (48). Mesmo não havendo na literatura indícios de que o mesmo poderia ocorrer quando as células são ativadas com Poly I:C (TLR3), decidimos refazer os experimentos de proteção espaçando o tempo de intervalo entre a primeira e a segunda dose.



Grupo	% Proteção	Infectados/Total
Poly I:C	0 %	4/4
αDEC205.CS	0 %	4/4
αDEC205.CS Desnaturado	50 %	2/4
CSr	50 %	2/4

Figura 6 - Imunização com a proteína CS não direcionada, em forma de anticorpo desnaturado ou proteína recombinante, protege camundongos mediante ensaios de desafio. Animais imunizados com a proteína direcionada ou não direcionada foram desafiados com 5.000 esporozoítios de *P. yoelii* via intradérmica. O desenvolvimento de parasitemia foi analisado, via contagem de eritrócitos infectados, por esfregaços sanguíneos. Dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de pós-teste Tukey: $p < 0,05$ indicados por ***, ns (não significante).

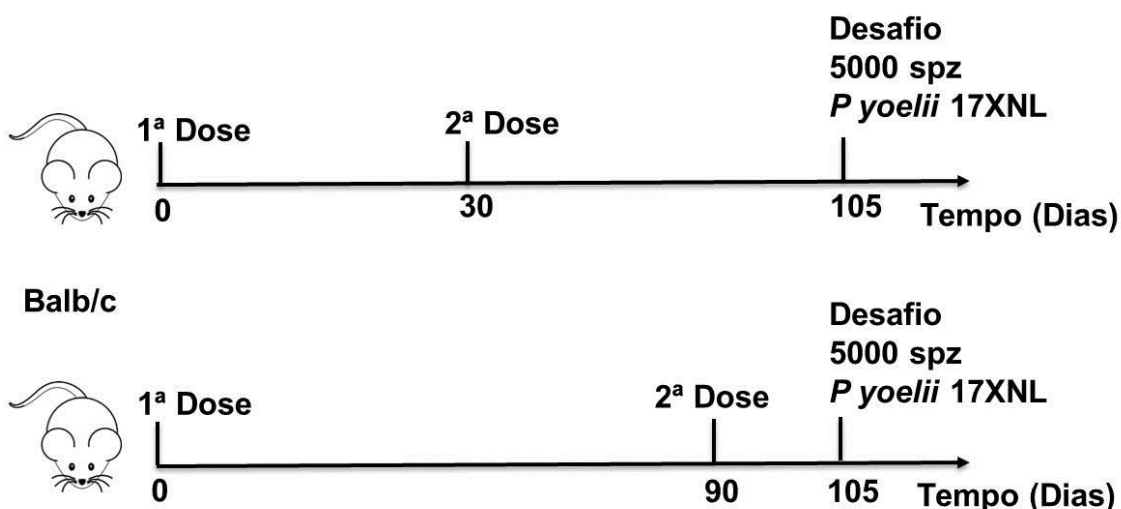


Figura 7 - Esquema do desenho experimental do segundo ensaio de imunização. Camundongos Balb/c foram imunizados por via intraperitoneal duas vezes com intervalos de 30 ou 90 dias entre as duas doses. Animais do grupo controle receberam apenas adjuvante Poly I:C (50ug), enquanto os grupos experimentais receberam 5 ug do anticorpo híbrido fusionado ou do anticorpo desnaturado juntamente com Poly I:C (50ug). Os animais do grupo que recebeu a proteína recombinante foram imunizados com 2 ug, quantidade equimolar de proteína presente em 5 ug dos anticorpos. Os animais foram desafiados via intradérmica com 5.000 esporozoítos 75 ou 15 dias após a segunda imunização.

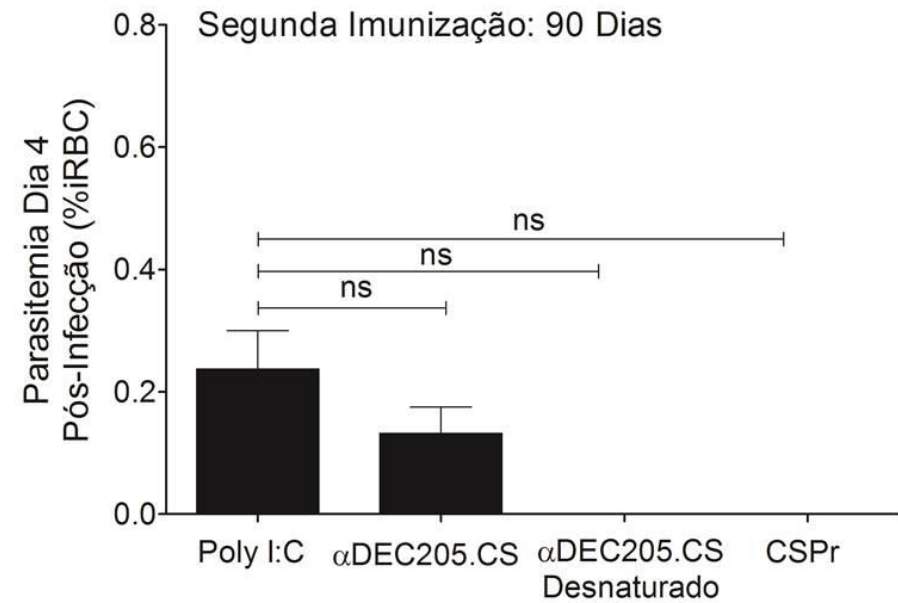
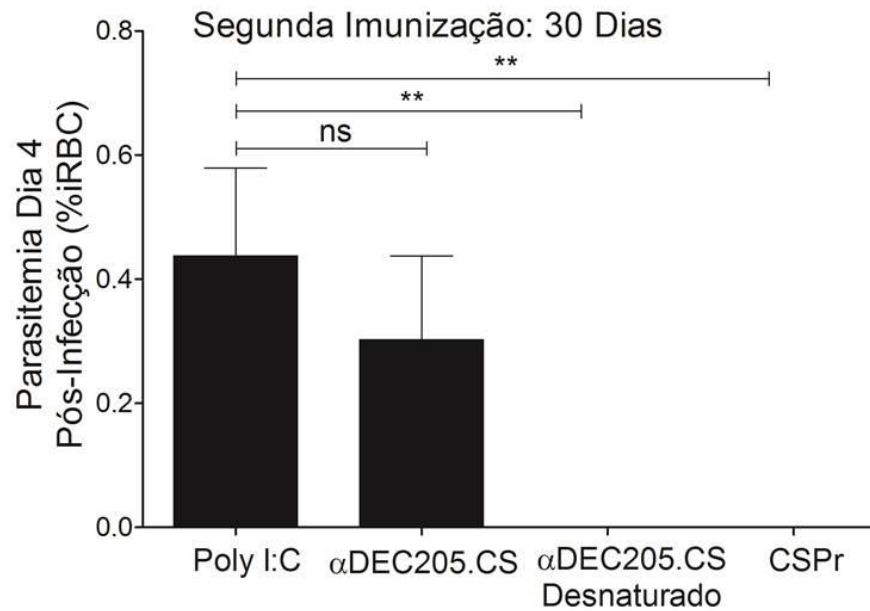
Nesse novo experimento camundongos Balb/C selvagens foram imunizados duas vezes com 5 ug do anticorpo α DEC205.CS intacto ou desnaturado, ou com 2 ug da proteína recombinante, na presença de Poly I:C, com intervalo de 30 ou 90 dias entre as doses (figura 7). Passados, respectivamente, 75 e 15 dias após a segunda imunização os animais foram desafiados com 5.000 esporozoítos de *P yoelii* via intradérmica, e o desenvolvimento da infecção analisado pela contagem de iRBC.

Houve diferença significativa na taxa de infecção dos animais imunizados com a proteína não direcionada e que receberam a segunda dose 30 dias após a primeira imunização, em comparação com o controle, no quarto dia de infecção (figura 8 esquerda). Em animais imunizados com espaçamento maior entre as duas doses (90 dias), não observamos diferença estatística no quarto dia pós infecção (figura 8 direita). Mas quando observamos a taxa de indução

de imunidade estéril, vimos uma similaridade que se mantém independente do tempo de espaçamento (figura 8 tabelas). Camundongos imunizados com a proteína não direcionada apresentaram proteção estéril na faixa de 75% a 100%. Ao contrário dos animais que receberam a proteína direcionada na forma do anticorpo intacto. Nesse grupo não houve animal esterilmente protegido.

Até esse momento nossos resultados sugeriam que a proteção à infecção estava relacionada ao modo como o antígeno estava sendo “entregue” ao sistema imune. Nesse caso a proteína não direcionada, na forma de anticorpo desnaturado ou proteína recombinante, promovia a ativação do sistema imune de forma a induzir proteção, ao contrário do direcionamento, independente do tempo de intervalo entre as duas doses. Não direcionar a proteína estava sendo mais eficiente, em termos de proteção, do que direcionar utilizando o anticorpo híbrido.

Essa conclusão nos levou às nossas próximas questões que estavam relacionadas ao mecanismo pelo qual essa proteção poderia estar ocorrendo.



Grupo	% Proteção	Infectado/Total
Poly I:C	0 %	4/4
αDEC205.CS	0 %	4/4
αDEC205.CS Desnaturado	75 %	1/4
CSr	100 %	0/4

Grupo	% Proteção	Infectado/Total
Poly I:C	0 %	4/4
αDEC205.CS	0 %	4/4
αDEC205.CS Desnaturado	100 %	0/4
CSr	100 %	0/4

Figura 8 - imunizações com a proteína CS não direcionada, em forma de anticorpo desnaturado ou proteína recombinante, protegeram camundongos mediante ensaios de desafio, independente do tempo de espaçamento entre a primeira e a segunda doses. Animais imunizados com a proteína direcionada ou não direcionada foram desafiados com 5.000 esporozoítos de *P. yoelii* pela via intradérmica. O desenvolvimento de parasitemia foi analisado, via contagem de eritrócitos infectados, por esfregaços sanguíneos. Dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de pós-teste Tukey: $p < 0,05$ indicados por **, ns (não significante).

O experimento seguinte foi desenhado tentando identificar se a resposta protetora gerada pela proteína não direcionada foi diretamente dependente da resposta celular promovida pela ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

Animais Balb/C selvagens foram imunizados duas vezes com 5 ug do anticorpo α DEC205.CS intacto ou desnaturado na presença de Poly I:C. Nesse experimento não utilizamos o grupo imunizado com a proteína recombinante devido ao grande número de animais necessários para a sua realização e, em vista dos resultados, até este momento, terem se mostrado comparativos com relação a taxa de proteção entre os grupos que receberam a proteína não direcionada, tanto na forma recombinante quanto de anticorpo desnaturado.

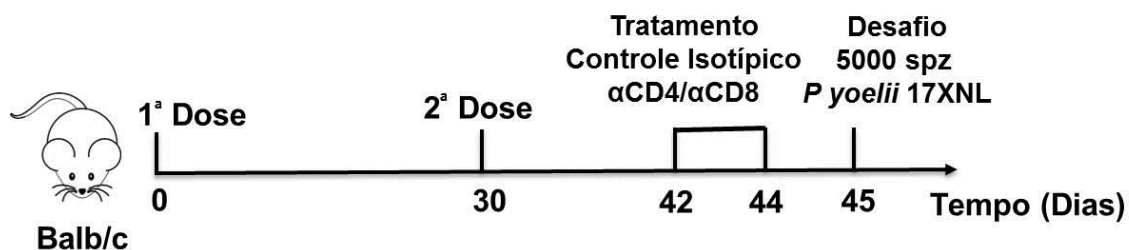


Figura 9 - Esquema do desenho experimental do ensaio de imunização com depleção de linfócitos T. Camundongos Balb/c foram imunizados por via intraperitoneal duas vezes com intervalos de 30 dias entre as duas doses. Animais do grupo controle receberam apenas adjuvante Poly I:C (50ug), enquanto os grupos experimentais receberam 5 ug do anticorpo híbrido fusionado ou do anticorpo desnaturado juntamente com Poly I:C (50ug). Os animais do grupo que recebeu a proteína recombinante foram imunizados com 2 ug, quantidade equimolar de proteína presente em 5 ug dos anticorpos. A depleção de linfócitos foi realizada 3 e 1 dia antes do desafio, com anticorpos α CD4 e α CD8 injetados pela via intraperitoneal. Os animais foram desafiados pela via intradérmica com 5.000 esporozoítos 15 dias após a segunda imunização.

Nesse experimento, em particular, optamos por utilizar o desenho experimental com intervalo de 30 dias entre as doses, pois não havíamos observado diferença no padrão de taxa de infecção entre as diferentes imunizações (figura 9). Dias antes do desafio (3 e 1 dias) foi realizada a depleção dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ utilizando 400 ug de anticorpos α CD4 (Clone GK1.5) ou α CD8 (Clone 2.43), além do grupo que recebeu o isotipo controle, onde não havia depleção. Todos os anticorpos foram injetados intraperitonealmente e a depleção dos linfócitos foi confirmada por citometria de fluxo pela marcação de células totais de amostras sanguíneas, sendo observada a presença ou ausência de células T caracterizadas pela expressão de CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺ (figura 10). Animais que receberam anticorpos α CD4 apresentaram apenas a população de linfócitos T CD8⁺. Animais que receberam anticorpos α CD8 apresentaram apenas a população de linfócitos CD4⁺. Em contrapartida, animais que receberam o isotipo controle apresentaram ambas as populações CD4⁺ e CD8⁺ de linfócitos T, como esperado.

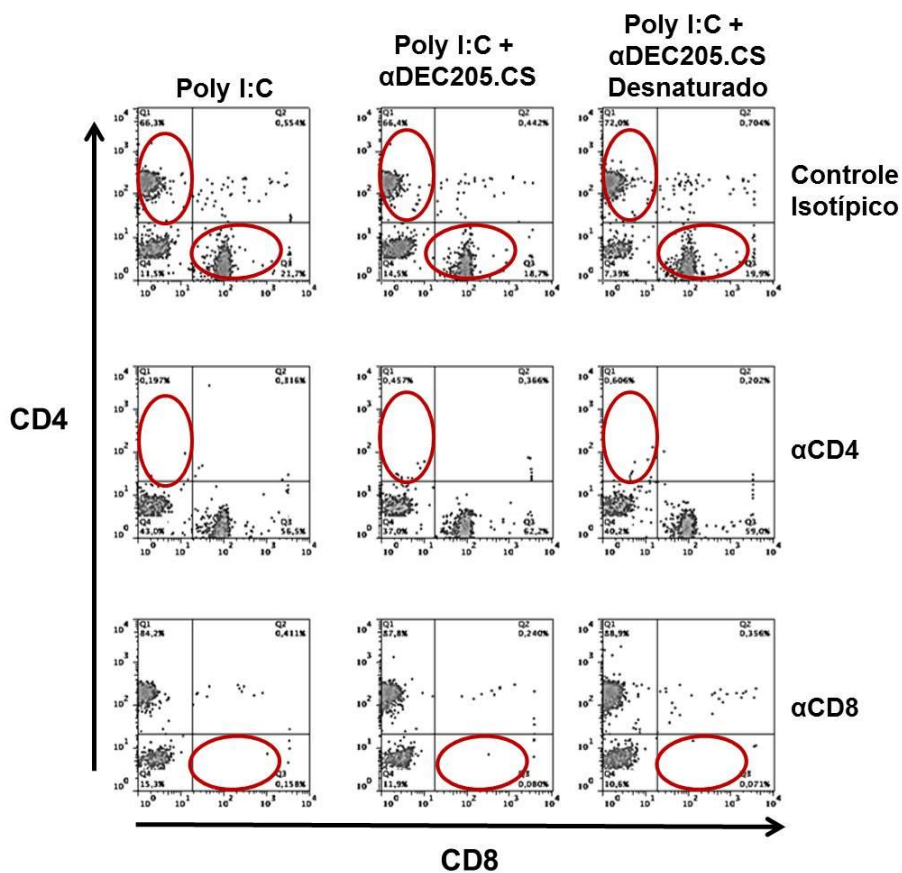


Figura 10 - Gráfico representativos dos testes para confirmação da depleção dos linfócitos T CD4 e CD8 realizada por citometria de fluxo, mostrando populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em animais depletados, respectivamente de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺, e ambas as populações de linfócitos em animais que receberam o isotipo controle, onde não observamos a depleção de nenhuma das respectivas populações.

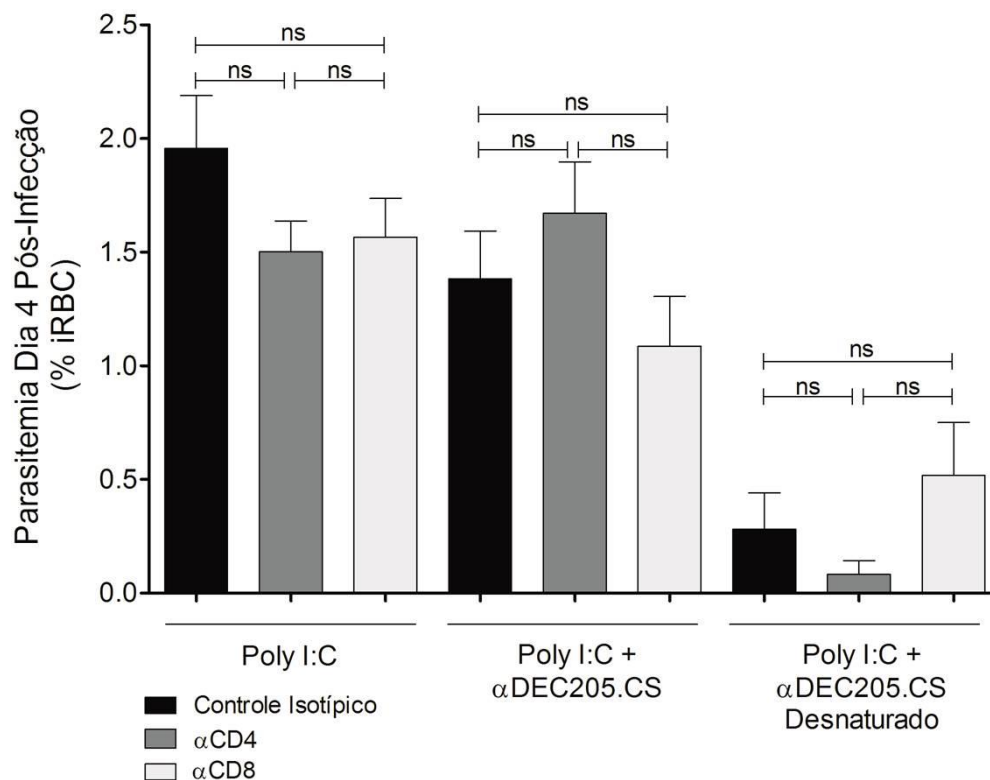


Figura 11 - A depleção de linfócitos T CD4+ e CD8+ não interfere na proteção observada nos animais imunizados com a proteína não direcionada. Animais imunizados com a proteína direcionada ou não direcionada foram desafiados com 5.000 esporozoítos de *P. yoelii* pela via intradérmica. O desenvolvimento de parasitemia foi analisado, via contagem de eritrócitos infectados, por esfregaços sanguíneos. Dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de pós-teste Tukey, ns (não significante).

Quinze dias após a segunda imunização e a confirmação dos resultados de depleção de linfócitos, os animais foram desafiados com 5.000 esporozoítos de *P. yoelii* por via intradérmica, e o desenvolvimento da infecção analisado pela contagem de iRBC.

Observamos que não houve diferença significativa na taxa de infecção, dentro de cada grupo de imunização, com relação a presença ou ausência de linfócitos (figura 11). Mas a taxa de infecção, comparando os diferentes grupos de imunização, foi a mesma dos experimentos anteriores, onde os animais que receberam α DEC205.CS desnaturado apresentaram menor índice de infecção.

Esses resultados sugeriram que a proteção observada no grupo de animais que recebeu a proteína não direcionada foi independente de resposta celular de forma direta (figura 11).

Na tentativa de continuar a entender os mecanismos de proteção, nosso próximo passo foi analisar a resposta humoral gerada nos diferentes protocolos de imunização. O soro dos animais imunizados nos experimentos de imunização havia sido coletado antes e após a segunda imunização. O título de anticorpos contra a proteína CS foi determinado por ELISA, utilizando a proteína CSr produzida em *E. coli* adsorvida na placa.

Independente do desenho experimental animais imunizados com a proteína direcionada apresentaram os menores títulos de anticorpos α CSr, mesmo após a segunda imunização, em comparação com a proteína não direcionada (figura 12).

Além disso, existe uma correlação positiva entre os altos títulos de anticorpos com a proteção dentro dos diferentes grupos (figura 13). A proteção observada nos animais imunizados com a proteína não direcionada pode ser correlacionada com altos títulos de anticorpos α CSr presentes na circulação.

Esses resultados podem indicar que a resposta humoral possui um papel mais relevante e direto na proteção em comparação com a resposta celular nos animais imunizados com CSr ou com α DEC205.CS desnaturado.

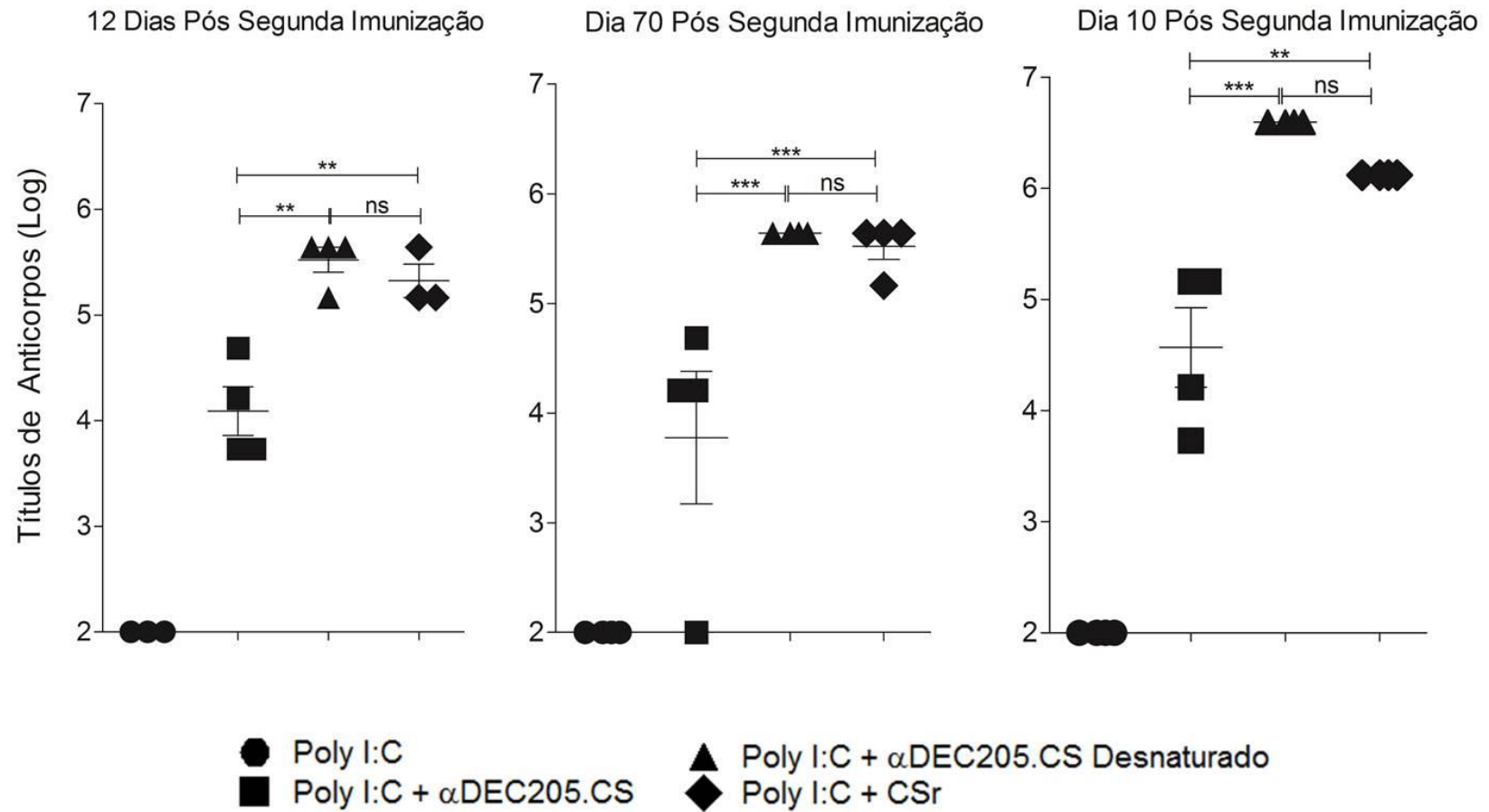


Figura 12 - Animais imunizados com a proteína não direcionada apresentaram níveis de anticorpos significativamente maiores com relação aos que receberam a proteína direcionada. Soro dos animais imunizados em todos os ensaios foram coletados antes e depois da segunda dose. O título de anticorpos específicos para a proteína CSr foi avaliado por ELISA com detecção de IgG total. Dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de pós-teste. Tukey: $p < 0,05$ indicados por ** ou ***, ns (não significante).

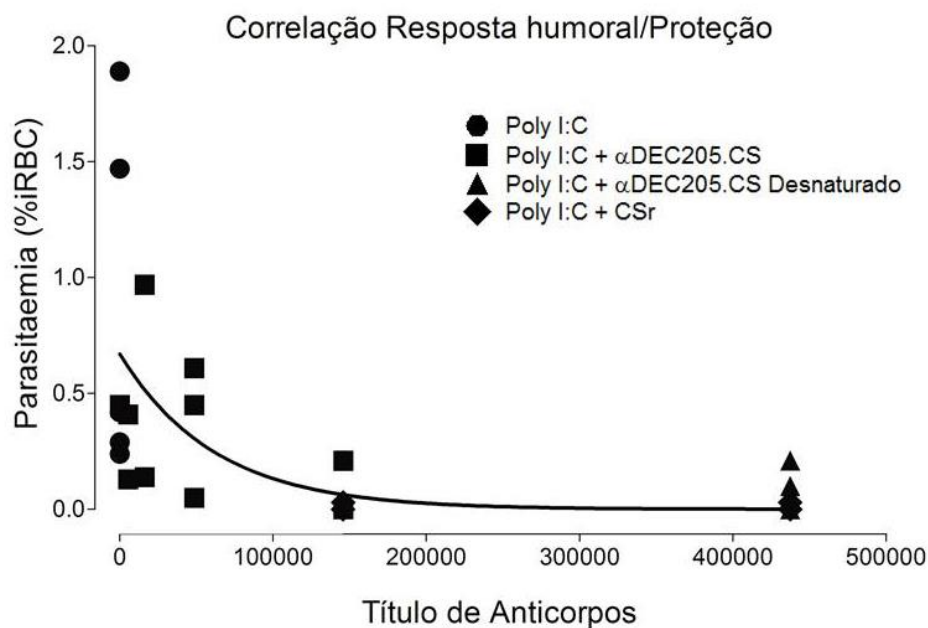


Figura 13 - Correlação positiva entre os títulos de anticorpos anti-CS com os índices de proteção observados em diferentes experimentos de imunização.

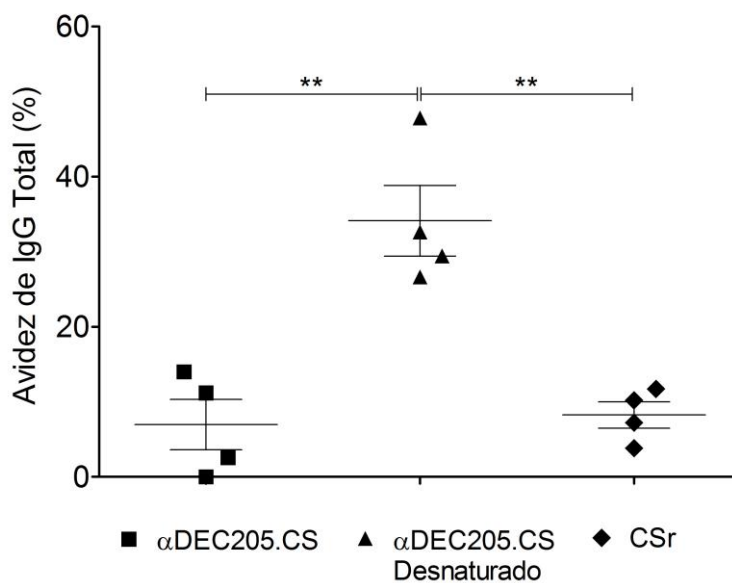


Figura 14 - Anticorpos induzidos contra a proteína CS durante a imunização com o anticorpo desnaturado apresentaram maior avidéz. Testes de avidéz foram realizados com soros obtidos dos animais imunizados após a segunda dose. Os ensaios foram feitos por ELISA com lavagens sucessivas de Ureia 7 M, e o índice de avidéz medido pela razão das densidades óticas obtidas com e sem a lavagem. Podemos observar que a proteína não direcionada na forma de anticorpo desnaturado induziu resposta humoral constituída de anticorpos com maior índice de avidéz em comparação com animais que receberam apenas a CSr ou a proteína direcionada pelo anticorpo. Dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de pós-teste Tukey: $p < 0,05$ Indicados por **.

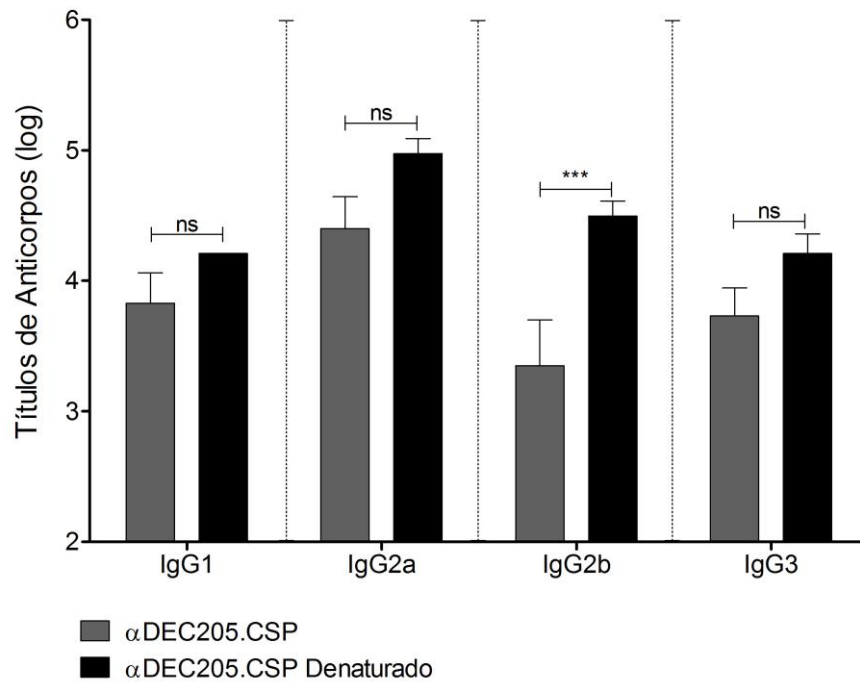


Figura 15 - Animais imunizados com o anticorpo desnaturado apresentaram maior título de anticorpos IgG2b. Soro dos animais imunizados foram coletados 14 dias após a segunda imunização. Os isotipos dos anticorpos produzidos contra a CSr foram determinados por ELISA. Dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de pós-teste Tukey: $p < 0,05$ Indicados por **; ns refere-se a dados onde não houve diferença significativa.

Além dos títulos de anticorpos analisamos dois parâmetros relacionados a qualidade da resposta humoral. O primeiro deles foi a avidéz dos anticorpos específicos produzidos contra a CSr. Observamos que animais imunizados com a proteína direcionada, acoplada ao anticorpo, e com a proteína não direcionada, na forma de CSr, apresentaram menor avidéz quando comparados com a resposta induzida pela proteína não direcionada na forma de anticorpo desnaturado. Correlacionando esse dado com a capacidade protetora, vimos que, mesmo que os anticorpos possuam níveis de avidéz semelhantes, apenas a resposta gerada pela imunização com a CSr foi capaz de proteger os animais. Por outro lado, a resposta gerada pela imunização com a proteína não direcionada, observamos que, mesmo

com níveis de avidéz significativamente diferentes, protegeu animais mediante ensaios de desafio com taxas semelhantes a resposta induzida pela imunização com a proteína recombinante.

Paralelamente, analisamos os isotipos de IgG produzidos durante as imunizações com a α DEC205.CS e sua versão desnaturada. Apenas os títulos e IgG2b foram diferentes entre os grupos, e esse isotipo é importante quando falamos em bloqueio direto de infecção.

A análise desses dados nos levou a novos questionamentos. Então, para entendermos melhor o mecanismo envolvido na resposta humoral α CSr correlacionando com os níveis de proteção encontrados, utilizamos dois anticorpos monoclonais (mAb) específicos para diferentes regiões da proteína CSr de *P. yoelii*, em ensaios de transferência adotiva para análise de proteção mediante desafio.

Os mAb utilizados foram denominados de 15D7, específico para a porção da proteína recombinante que conhecemos como 'major repeat', e o 24D9, específico para outra porção conhecida como 'minor repeat' (figura 16).

Estruturalmente os *repeats*, ou porções repetidas, são encontradas na região central da proteína e não se conhece, conformacionalmente, como são localizados na proteína nativa, expressa pelo parasito.

Antes que pudéssemos testar os anticorpos em ensaios de proteção mediante desafio, testamos a capacidade desses anticorpos em reconhecer a proteína recombinante, expressa em *E. coli* e a proteína nativa, expressa na superfície de esporozoítos.

Por ensaio de ELISA, observamos que ambos os anticorpos 15D7 e 24D9 foram capazes de reconhecer a proteína recombinante adsorvida de forma equivalente. Como controle isotípico dos experimentos foi utilizado o mAb GL117, que não reconheceu a proteína a níveis detectáveis pelo nosso ensaio (figura 17).

Pelos ensaios de citometria, os mAbs 15D7 e 24D9 foram incubados com esporozoítos em três diferentes concentrações e revelados utilizando anticorpo antiIgG. Após algumas lavagens as amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo, e analisadas utilizando o software FlowJo. Apenas o mAb 15D7 foi capaz de reconhecer a proteína CS expressa pelo parasito, de forma dose dependente (figura 18).

O ensaio de proteção utilizando os anticorpos monoclonais foi realizado por transferência adotiva, onde camundongos Balb/C selvagens receberam 100 ug de cada anticorpo via intravenosa (i.p.) e no dia seguinte foram desafiados com 6.500 esporozoítos de *P. yoelii* (figura 19), para que pudéssemos observar a capacidade protetora de cada anticorpo.

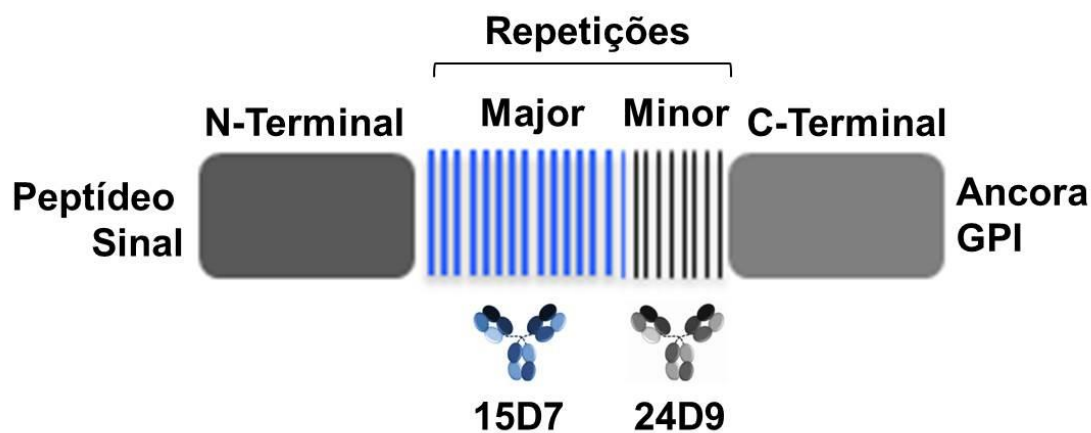
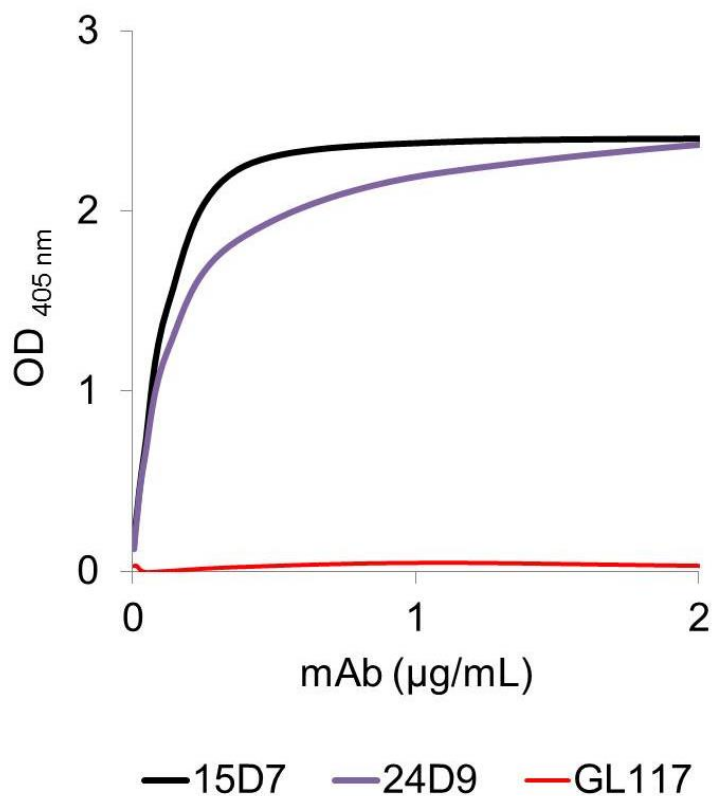


Figura 16 - Desenho esquemático da proteína CS de *P. yoelii*. O desenho demonstra as diferentes regiões da proteína CS desde de seu peptídeo sinal expresso logo antes da porção N-terminal, seguida pelas regiões repetidas conhecidas como Major e Minor, respectivamente, e a porção C-terminal contendo sequência que codifica para o sítio acceptor da âncora de GPI, responsável por manter a proteína acoplada a membrana externa do parasito.

Figura 17 - Ambos os anticorpos monoclonais reconhecem a proteína recombinante, expressa em *E. coli*, em



ensaios de ELISA. Proteína CSr foi adsorvida em placas de 96 poços na concentração de 2 µg/mL por 16 horas. Através da diluição seriada dos anticorpos na placa foi possível determinar a capacidade de ligação de cada mAb à CSr. O anticorpo GL117 foi utilizado nos ensaios como controle isotípico dos experimentais.

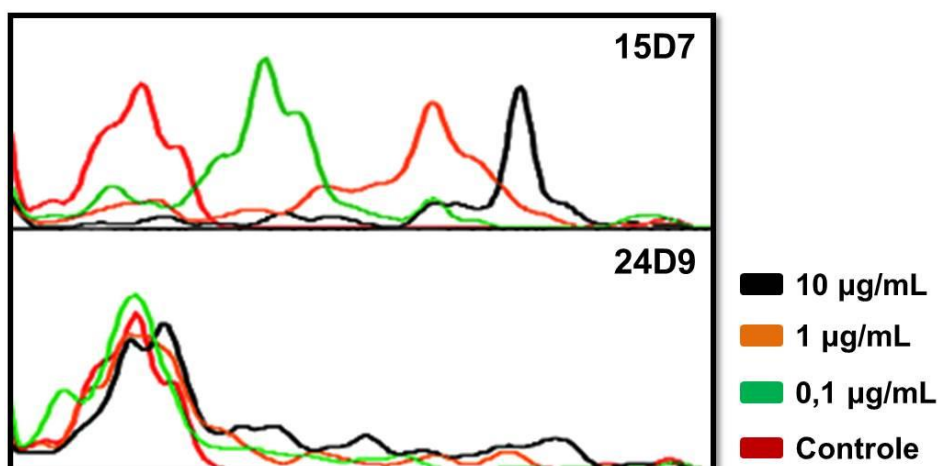


Figura 18 - Apenas o anticorpo 15D7 reconhece a proteína nativa, expressa na superfície dos esporozoítos. Anticorpos monoclonais foram incubados em três concentrações diferentes com 20.000 esporozoítos. Após sucessivas lavagens os parasitos foram incubados com anticorpo α IgG.PE e depois adquiridos 500 eventos por citômetro de fluxo. Observamos que o anticorpo 15D7 foi capaz de reconhecer a proteína nativa de forma dose-dependente, ao contrário do anticorpos 24D9, no qual não observamos fluorescência em nenhuma das concentrações utilizadas.

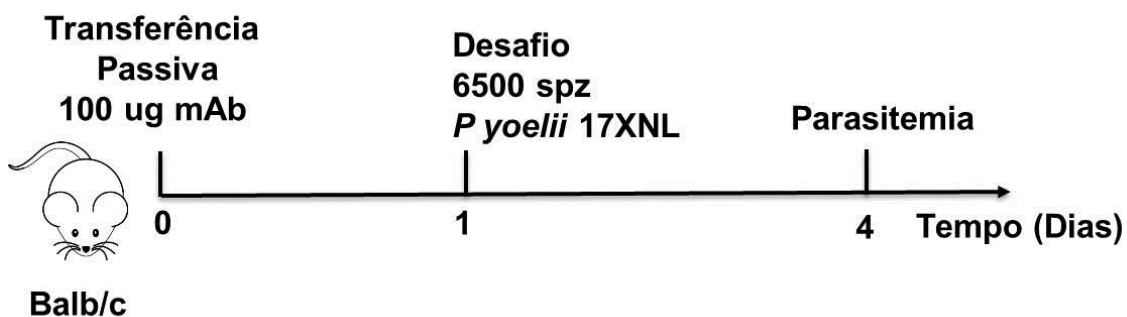


Figura 19 - Esquema do desenho experimental do ensaio de transferência adotiva dos anticorpos monoclonais 15D7 e 24D9. Camundongos Balb/c receberam 100 ug do mAb 15D7 ou 24D9 ou GL117 como isotipo controle pela via i.v. em dose única. No dia seguinte ao da transferência os animais foram desafiados com 6.500 esporozoítos via intradérmica. O desenvolvimento de parasitemia foi analisado, via contagem de eritrócitos infectados, por esfregaços sanguíneos, a partir do dia 4 pós-infecção.

Animais transferidos com o mAb 15D7, que havia reconhecido a proteína CSr por ELISA e a proteína nativa expressa por esporozoítos, apresentaram uma parasitemia estatisticamente menor, no dia 4 pós-infecção, em relação aos transferidos com 24D9, mAb capaz de reconhecer apenas a proteína CSr (figura 20 gráfico). Além disso o grupo de animais transferidos com 15D7 apresentou proteção estéril de 75% (figura 20 tabela).

Observamos então que anticorpos capazes de reconhecer porções distintas das regiões repetidas da proteína CS apresentaram níveis de proteção diferenciados mediante ensaios de desafio. No dia 4 pós-infecção, observamos que os animais transferidos com mAb 15D7, específico contra a porção repetida major da proteína, apresentavam parasitemia significativamente menor com relação ao controle isotípico e o anticorpo 24D9, específico para a porção repetida conhecido como minor repeat. Após análise observamos que camundongos transferidos com 15D7 apresentaram proteção estéril de 75%.

Questionamos se essa proteção poderia ser específica da região em que o anticorpo 15D7 se liga na proteína nativa, nesse caso o 'major repeat'. Para respondermos a essa pergunta produzimos e purificamos diferentes regiões da proteína CS para utilização em ensaios de imunização (figura 21).

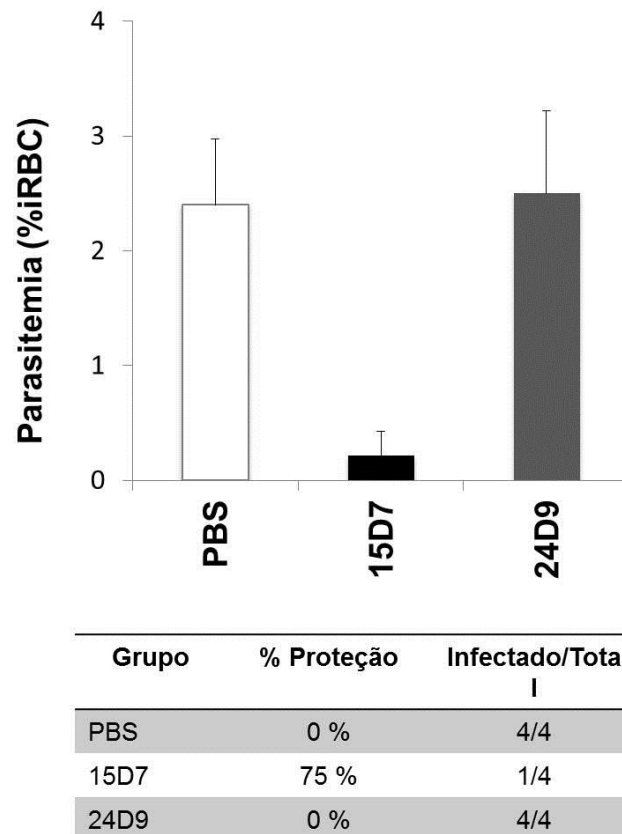


Figura 20 - Anticorpo 15D7 foi capaz de proteger animais mediante deafo com esporozoitos após transferência adotiva. Camundongos receberam por via intravenosa 100 ug de 15D7 ou de 24D9 ou PBS mais controle isotípico. No dia seguinte, os animais foram desafiados com 6.500 esporozoitos por via intradérmica.

Utilizando como molde a sequência de DNA que codifica para a proteína inteira e primers específicos, amplificamos as diferentes regiões e sub-clonamos nos vetores de expressão em procaríotos pET21b ou pET28a. As proteínas purificadas por cromatografia apresentaram tamanho esperado em eletroforese em gel de poliacrilamida.

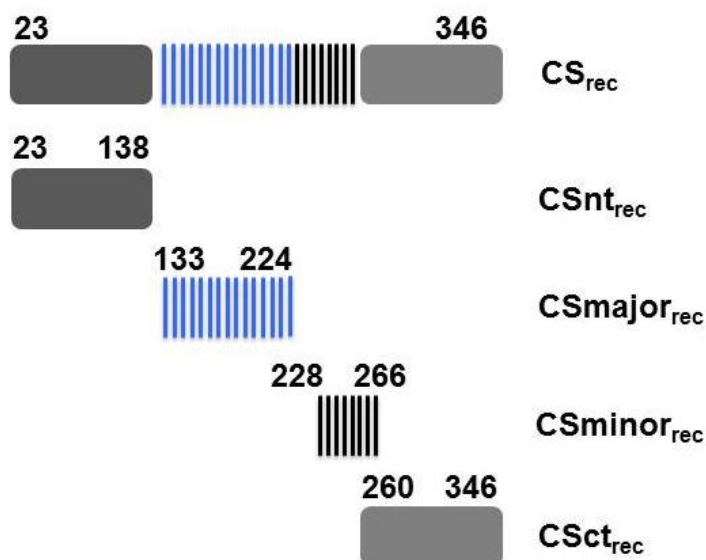


Figura 21 - Desenho esquemático da proteína CS e suas porções separadamente, em relação a proteína inteira. Os números indicam a posição do aminoácido em que cada porção inicia e termina na sequência da proteína.

Testamos a capacidade protetora das diferentes porções da proteína recombinante, utilizando a proteína inteira como controle de proteção. Camundongos Balb/C foram imunizados duas vezes com 5 ug da proteína inteira ou com cada fragmento da proteína CSr na presença de Poly I:C, com intervalo de 30 dias entre as doses (figura 22).

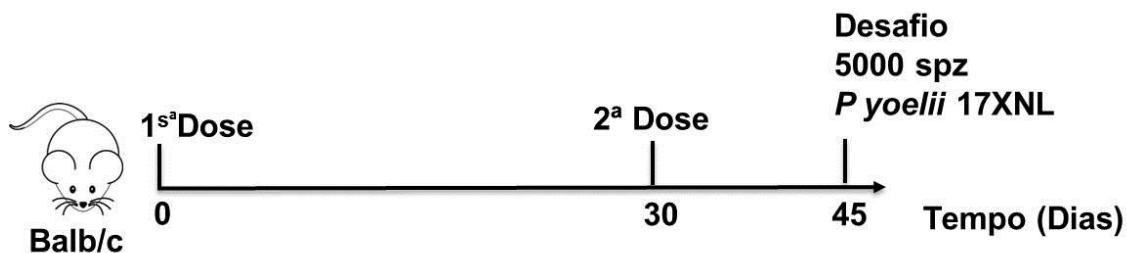


Figura 22 - Esquema do desenho experimental do ensaio de imunização com as porções recombinantes da proteína CS de *P. yoelii*. Camundongos Balb/foram imunizados com 5ug de cada porção da proteína recombinante na presença de Poly I:C (50 ug) como adjuvante, via intraperitoneal, com duas doses com intervalo de 30 dias entre a primeira e a segunda imunização. Quinze dias após a segunda imunização os animais foram desafiados com 5.000 esporozoítos de *P. yoelii* e a parasitemia avaliada pela contagem de iRBC em esfregaços sanguíneos.

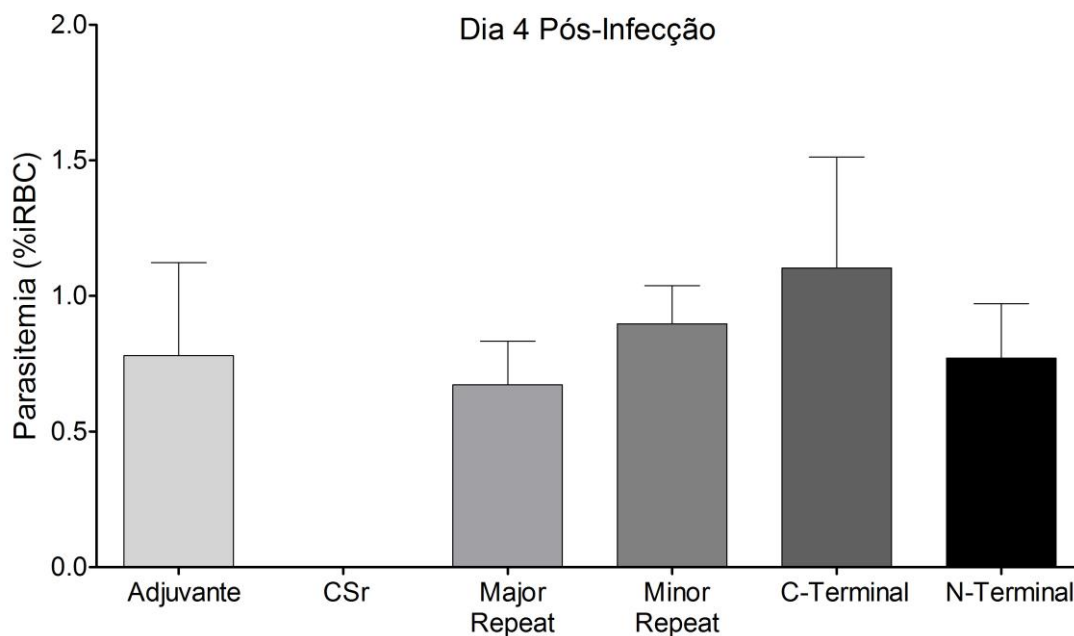


Figura 23 - Apenas a proteína CSr inteira e a proteína CSr deletada da porção N-terminal foram capazes de induzir resposta imune protetora. Camundongos Balb/C foram imunizados com 5 ug de cada uma das proteínas recombinantes em duas doses com intervalo de 30 dias. Esses animais foram desafiados 15 dias após a segunda dose. Observamos que apenas animais que receberam a proteína inteira ou a deltaN-terminal foram capazes de proteger mediante o ensaio de desafio. Dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido de pós-teste Tukey: $p < 0,05$ indicados por ** ou ***.

Observamos que apenas a proteína recombinante inteira foi capaz de proteger os animais imunizados após desafio com 5.000 esporozoítos via intradérmica. Concluimos que as imunizações com as porções da proteína separadamente não foram capazes de induzir resposta imune protetora (figura 23), nem mesmo a porção referente ao 'major repeat', alvo do anticorpo 15D7 responsável pela proteção estéril de 75% dos animais após ensaios de transferência adotiva.

5 DISCUSSÃO

O método de direcionar proteínas para DCs visa uma melhor apresentação do antígeno para o sistema imune, não somente “entregando” o antígeno diretamente para células centrais na indução de resposta imunológica, mas também, promovendo sua ativação, essencial para o início da resposta. Nesse trabalho, nosso objetivo central foi, através do direcionamento da proteína CS de *P. yoelii*, induzir uma melhora na resposta imune gerada por esse antígeno visando a proteção dos animais imunizados. Sendo assim os nossos experimentos foram sempre realizados utilizando anticorpo α DEC205.CS e Poly I:C como adjuvante, um indutor de maturação das DCs, agonista de TLR3 e MDA5, receptor altamente expresso no subtipo de DCs DEC205⁺.

Os primeiros experimentos de imunização visaram determinar se a resposta imune gerada pela proteína CS de *P. yoelii* direcionada para DCs poderia, de fato, proteger camundongos mediante ensaios de desafio. Como controle utilizamos a proteína não direcionada, na forma de proteína recombinante. Além da utilização desse controle experimental, mostrou-se importante a utilização da proteína CS em um sistema no qual a proteína estivesse ligada ao anticorpo, mas que esse não fosse capaz de direcionar. Nesse momento, não possuíamos um controle isotópico carregando a proteína CS. Por isso optamos pela forma mais simples e disponível. Submetemos o anticorpo a um processo de desnaturação para que perdesse a sua capacidade de ligação, e conseqüentemente, o direcionamento na proteína.

Outro ponto que acreditamos ser importante para determinar esses dois tipos de controle da proteína não direcionada foi o fato de a proteína recombinante e a carregada pelo anticorpo serem produzidas em sistemas de expressão distintos, procarioto e eucarioto, respectivamente, utilizando códons

otimizados para cada um. Nesse caso não sabemos até que ponto esse fator pode promover diferenças de estrutura terciária, por exemplo, da proteína final. Concluimos, então, que o melhor seria utilizar a proteína não direcionada na forma recombinante e carregada pelo anticorpo desnaturado.

As imunizações foram realizadas em duas doses com intervalos de 14 dias entre elas. A escolha desse intervalo ocorreu pois alguns resultados prévios realizados no laboratório com a proteína CSr haviam sido obtidos com imunizações nesse intervalo de tempo, o que havia induzido proteção estéril em diversos experimentos.

Mas em nossos resultados obtidos com a proteína direcionada vimos que a proteção, com esse método, foi inexistente. Ao contrário dos controles da proteína não direcionada que mostraram forte proteção mediante ensaios de desafio com esporozoítos, em alguns casos, com índices de esterilidade alcançando 100% dos animais imunizados.

Esses resultados levantaram a alguns questionamentos relacionados com o mecanismo que envolveria a proteção induzida pelas imunizações com a proteína não direcionada, e também, se de alguma forma, o tempo entre as doses poderia estar interferindo na indução da resposta quando os animais foram imunizados com α DEC205.CS. Descobrimos que DCs quando ativadas via TLR9 podem ter algumas de suas funções prejudicadas, ficando refratárias a novos estímulos num espaço de 21 dias quando da primeira ativação (49). Essa foi uma descoberta importante pois nossos experimentos são realizados com Poly I:C, um adjuvante que através da ligação ao TLR3 é capaz de induzir maturação nessas células e, conseqüentemente, ativação da resposta imune aos antígenos em questão. Mas até aquele momento não havia indícios que o

mesmo poderia ocorrer quando as DCs fossem ativadas por essa via. Mesmo assim decidimos testar se poderia ocorrer interferência na resposta pelo curto período entre uma imunização e outra.

Contudo, mesmo após o aumento de tempo entre a primeira e segunda doses, o padrão de proteção continuou o mesmo. Animais imunizados com doses espaçadas por 30 dias ou por 90 dias apenas ficaram protegidos quando imunizados com a proteína não direcionada. Curiosamente os animais que receberam as duas doses com espaçamento maior apresentaram uma infecção menor, observado pelos controles que receberam Poly I:C. Apenas evidenciamos diferença significativa no dia 5 pós infecção, e não no quarto dia, como foi observado nos camundongos imunizados com tempo menor entre a primeira e segunda doses. Concluimos então que o tempo não estava sendo um fator determinante para a indução de resposta protetora durante o direcionamento, pois mesmo com aumento de tempo entre as doses os animais continuavam suscetíveis.

Visto isso, decidimos descartar, na sequência, o envolvimento da resposta celular direta na proteção. Para isso, os animais foram imunizados com as mesmas quantidades de proteína como nos experimentos anteriores, mas nesse caso decidimos utilizar um tempo de 30 dias entre as duas doses. Dias antes do desafio os animais foram depletados de linfócitos T CD4⁺ ou linfócitos T CD8⁺. Como resultado não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de infecção entre os animais depletados de nenhuma das populações de linfócitos. Nesse caso concluimos que a resposta celular não tem uma participação direta na indução de proteção.

Em todos os experimentos realizados procedemos com a coleta de soro dos animais, de forma individual, para que pudéssemos determinar os níveis de anticorpos α CS gerados durante as imunizações. Nossas análises mostraram que animais imunizados com a proteína não direcionada apresentavam títulos de anticorpos significativamente maiores em comparação com os animais imunizados com a proteína direcionada. Além disso, percebemos que havia uma correlação positiva entre a proteção e os níveis de resposta humoral induzidos em cada grupo. A análise dos dados até esse momento nos levava a crer que havia um forte envolvimento da resposta humoral na proteção estéril observada nas imunizações com a proteína não direcionada.

Especulamos que isto pode ter ocorrido porque a proteína direcionada pelo anticorpo α DEC205.CS intacto foi mais rapidamente endocitada pelas DCs, ficando menos disponível para as células B. Fato que pode ser inferido pelo resultado de experimentos anteriores demonstrando que a internalização via DEC205 ocorre dentro de minutos após a ativação do receptor (50). Já o anticorpo desnaturado, por não ser internalizado diretamente pela ligação ao receptor, pode ter ficado mais tempo na circulação dos animais, e por isso a proteína estaria mais acessível aos linfócitos B, resultando em uma resposta humoral com títulos mais elevados nos grupos que receberam a proteína não direcionada. Mesmo sabendo que existe a ativação e 'entrega' de antígenos aos linfócitos B pelas DCs, esse processo poderia estar sendo prejudicado por algum processo envolvendo o direcionamento.

Apesar de participar na proteção contra o *Plasmodium sp* durante o ciclo pré eritrocítico, esperávamos que a resposta celular direta, por exemplo por

linfócitos T CD8⁺, tivesse um envolvimento maior que a resposta imune humoral.

Fizemos mais alguns questionamentos, após a análise desses resultados, para tentar entender essa correlação. Queríamos saber se a proteção observada nos grupos que receberam a proteína recombinante ou o anticorpo desnaturado estava mais envolvida com os títulos de anticorpos observados ou com a qualidade da resposta humoral gerada. Pois até então havíamos quantificado apenas IgG total específica para a proteína recombinante e os níveis de anticorpos estavam muito diferentes entre os animais que receberam a proteína direcionada ou não direcionada.

A análise dos anticorpos IgG total gerados contra a proteína CS mostrou que, apesar de a imunização com CSr ter gerado títulos de anticorpos iguais ao anticorpo desnaturado, esses não apresentavam a mesma avidéz. Esse é um parâmetro que determina a força com que os anticorpos reconhecem seus antígenos de forma mais estável. Isso é importante pois quanto maior a avidéz dos anticorpos específicos menor o título de anticorpos que será necessário para a eliminação do antígeno, pois anticorpos com maior avidéz conseguem ligar a pequenas concentrações de antígeno.

Aliás, se observarmos bem, os anticorpos gerados pela imunização com a CSr apresentaram o mesmo grau de avidéz que os anticorpos gerados pela proteína direcionada. Esse resultado nos levou a crer que avidéz dos anticorpos pode sim ser um fator a considerar quando analisamos a proteção induzida pela resposta imune. Justamente porque observamos três combinações distintas que correlacionam resposta humoral, avidéz e proteção. Quando direcionamos a proteína para DCs não houve proteção, os títulos de

anticorpos foram menores, assim como a avidéz. Quando as imunizações foram realizadas utilizando o anticorpo desnaturado vimos proteção com altos títulos de anticorpos de alta avidéz. Mas quando utilizamos a CSr nas imunizações observamos proteção com altos títulos de anticorpos mas que apresentaram baixa avidéz. Nesse caso observamos que altos títulos de anticorpos são capazes de proteger sem possuir alta avidéz. Mas não podemos dizer, ainda, que baixos títulos de anticorpos com alta avidéz protegem.

Seguindo essa mesma linha, na tentativa de entender a proteção relacionada com a proteína não direcionada, realizamos testes para isotipagem dos anticorpos produzidos. Observamos que animais imunizados com a proteína não direcionada, na forma do anticorpo desnaturado, apresentaram níveis de IgG2b maiores quando comparados com animais que receberam a proteína direcionada. Uma das características desse isotipo, IgG2b, é conseguir se ligar a antígenos expressos por células infectadas promovendo o bloqueio direto ou aumentando as vias de sinalização para isso, sem que haja a necessidade do recrutamento de moléculas efetoras para isso (51), mas até então não temos informações mais precisas se essa diferença sendo significativa em termos de título, também foi importante em termos de proteção.

Os resultados obtidos até esse momento, na tentativa de dissecar a resposta humoral, nos trouxeram mais alguns questionamentos. Vimos que a avidéz se mostrou uma variável que pode ser importante para a proteção. Também vimos que o único isotipo com maior concentração no soro dos animais que receberam a proteína não direcionada foi a IgG2b, mas sem mais informações. Então buscamos meios de tentar medir o viés de outras duas

variáveis na indução da resposta protetora: a quantidade e os isotipos dos anticorpos circulantes induzidos durante as imunizações.

Para isso tínhamos a nossa disposição dois anticorpos monoclonais que reconheciam porções diferentes da proteína CS. Em um primeiro momento testamos a eficiência de reconhecimento dos anticorpos frente a proteína recombinante, e pelos testes de ELISA pudemos observar que eram igualáveis, ou seja, poderíamos injetar quantidades iguais dos anticorpos sem problemas quanto a um dos monoclonais reconhecer mais a proteína do que o outro.

Mas, como já mencionado no texto, tivemos a preocupação de utilizar proteínas CS expressas em dois sistemas como controles: em sistema eucarioto, produzida por células HEK293T, carregada pelo anticorpo híbrido, e a expressa em sistema procarioto, produzida por bactérias *E. coli*. Nesse momento também nos preocupamos em corroborar os resultados obtidos no ELISA, mas com a proteína nativa. Utilizando esporozoítos fizemos um teste de ligação com os anticorpos 15D7 e 24D9 que, para nossa surpresa, mostrou que apenas o anticorpo 15D7 foi capaz de reconhecer a proteína nativa, de forma dose dependente. Através de ensaios de transferência adotiva, utilizando 100 ug de cada um dos anticorpos, observamos que apenas o 15D7, anticorpo que reconheceu a proteína expressa na superfície do parasito, foi capaz de proteger os animais mediante ensaios de desafio.

Podemos pensar que depois da análise do ensaio de ligação esse resultado era esperado. Afinal, se o anticorpo 24D9 não foi capaz de reconhecer a proteína nativa, seria difícil que houvesse contenção da infecção sem que ocorresse uma interação direta do anticorpo com antígeno.

Observando esses resultados, vimos a importância desses testes para duas questões importantes dentro dos nossos experimentos. O primeiro ponto foi o mencionada acima. Para análise futura, o ensaio de ligação em esporozoítos pode ser utilizado para selecionar anticorpos com uma maior probabilidade de promover proteção, evitando assim que a triagem seja realizada em ensaios *in vivo* utilizando animais sem a real necessidade. O segundo ponto nos mostra que nosso pensamento anterior estava, de certa forma, correto, quanto a conformação da proteína expressa em diferentes sistemas pois o anticorpo 24D9 foi capaz de reconhecer a proteína recombinante produzida em *E. coli*, mas não reconheceu a proteína nativa, e também se mostrou não protetor. Então a conformação da proteína produzida em diferentes sistemas de expressão pode sim ser diferente, e consequentemente inferir resultados que não sejam completamente corretos. Isso porquê em nossas análises da resposta humoral utilizamos a CSr como antígeno adsorvido à placa. Desta forma, a análise do título dos anticorpos totais α CS por esse método não pode ser utilizada para inferir a capacidade protetora da resposta humoral gerada, pois nem todo anticorpo que reconhece a proteína por ELISA pode ter a capacidade de reconhecer a proteína nativa e, por consequência, não seria capaz de bloquear a infecção, como vimos.

Outro ponto importante que destacamos foi que, utilizando esses dois anticorpos 15D7 e 24D9, conseguimos mapear uma parte da proteína CS, o 'major repeat', que pode ser melhor utilizada como alvo de novos estudos que visam a geração de resposta imune protetora.

Para compreendermos melhor a resposta gerada contra essa porção, separamos a proteína CS de *P. yoelii* em diferentes porções: N-terminal, C-

terminal, 'major repeat' e 'minor repeat'. Os animais foram imunizados com as diferentes porções, e após o desafio vimos que apenas a proteína inteira foi capaz de gerar proteção. Nem mesmo a porção conhecida como 'major repeat' induziu resposta imune capaz de proteger os animais mediante desafio. Lembrando que o anticorpo monoclonal protetor utilizado durante os ensaios de transferência adotiva reconhece especificamente essa região da CSr. Contudo, o fato de a imunização somente com o 'major repeat' não ter gerado resposta protetora não foi difícil de ser interpretado. A região da proteína correspondente ao 'major repeat' não contém epítomos para linfócitos T CD4⁺, por exemplo, que poderiam auxiliar na indução de uma melhor resposta imune, com promoção de troca de classes pelas IgG. Além disso, nos experimentos de transferência adotiva, onde o mAb 15D7 protege os animais de infecção, o anticorpo utilizado foi purificado e injetado na quantidade de 100 ug. Infelizmente não conseguimos medir o título real no soro dos animais, que seria referente a transferência dessa quantidade de anticorpo. Tentamos essa medição por experimentos de ELISA no soro dos camundongos 24 horas após a transferência, mas não obtivemos sucesso. Esse dado seria importante para que pudéssemos utilizar como base o título de anticorpos para obtenção de uma resposta protetora.

6 CONCLUSÕES

Quando iniciamos o projeto tínhamos como foco aumentar a capacidade protetora da resposta imune gerada utilizando um novo método vacinal. Nossa hipótese havia sido fundamentada em dados mostrando que o direcionamento induzia resposta imune celular e humoral contra antígenos como OVA e, também, contra a proteína CS de *P. yoelii*, mas sem ensaios que demonstrassem correlação com a capacidade protetora dessa resposta gerada. Com objetivos centrados na busca por repostas que corroborassem ou refutassem nossa hipótese, utilizamos o anticorpo α DEC205.CS para direcionar esse antígeno e verificar se a resposta gerada era capaz de proteger animais contra o desafio.

A medida que avançamos nossos experimentos, observamos que nossos controles de proteína não direcionada foram capazes de proteger os animais em índices de até 100% em alguns casos, diferente dos nossos grupos experimentais, que receberam a proteína direcionada, onde não houve proteção.

Ao longo do trabalho fizemos diversos questionamentos, na tentativa de entender esses resultados, mas muitos permaneceram sem resposta. Algumas dessas questões para serem respondidas requerem soluções a longo prazo, como por exemplo, a pesquisa para entender a influência da avidéz e dos isotipos de IgG na proteção relativa aos grupos controles.

Acreditamos que esse trabalho trará bons resultados. Por isso estamos investindo em meios de responder às questões que ficaram em aberto. Novas técnicas estão sendo empregadas para que possamos entender, de forma mais precisa, o papel de cada componente e a qualidade da resposta imune na

proteção observada. Desenvolvimento de anticorpos monoclonais, modificação de isotipos, são algumas das técnicas a serem empregadas em novos experimentos.

Nosso pensamento foi sempre em busca de meios que possam trazer a ciência mais próxima de uma solução eficaz no combate de uma doença que tem como principais vítimas crianças.

REFERÊNCIAS

Referências*

1. WHO | World Malaria Report 2013. World Health Organization; [cited 2014 Oct 8]; Available from: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/
2. Garcia LS. Malaria. Clin Lab Med [Internet]. 2010 Mar [cited 2012 Mar 6];30(1):93–129. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20513543>
3. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H. Naturally Acquired Plasmodium knowlesi Malaria in Human, Thailand. Emerg Infect Dis [Internet]. 2004 Dec [cited 2015 Sep 18];10(12):2211–3. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3323387&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. Lancet [Internet]. 2004 Mar [cited 2015 Oct 7];363(9414):1017–24. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673604158364>
5. Formaglio P, Amino R. Looking for blood. Elife [Internet]. eLife Sciences Publications Limited; 2015 Oct 6 [cited 2015 Oct 7];4:e11284. Available from: <http://elifesciences.org/content/4/e11284.abstract>
6. 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 [Internet]. 2006 Sep 1 [cited 2015 Sep 6];313(5791):1287–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16888102>
7. Choudhury HR, Sheikh NA, Bancroft GJ, Katz DR, De Souza JB. Early nonspecific immune responses and immunity to blood-stage nonlethal Plasmodium yoelii malaria. Infect Immun [Internet]. 2000 Nov [cited 2015 Oct 8];68(11):6127–32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97689&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. Mohan K, Moulin P, Stevenson MM. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection. J Immunol [Internet]. 1997 Nov 15 [cited 2015 Oct 8];159(10):4990–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9366426>
9. Murphy KM. Immunobiology. 2011. In: Janeaway CA. [ed]. Janeaway's Immunobiology. 8 ed. London and New York: Garland Science Taylor and Francis Group; 2011. Página 59.

*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

10. De Souza JB, Williamson KH, Otani T, Playfair JH. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infect Immun* [Internet]. 1997 May [cited 2015 Oct 14];65(5):1593–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=175180&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
11. Chua CLL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Oct 14];29(1):26–34. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492212001808>
12. Moxon CA, Grau GE, Craig AG. Malaria: modification of the red blood cell and consequences in the human host. *Br J Haematol* [Internet]. 2011 Sep [cited 2015 Aug 13];154(6):670–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3557659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Stoute JA. Complement receptor 1 and malaria. *Cell Microbiol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2015 Oct 14];13(10):1441–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21790941>
14. Serghides L, Patel SN, Ayi K, Kain KC. Placental chondroitin sulfate A-binding malarial isolates evade innate phagocytic clearance. *J Infect Dis* [Internet]. 2006 Jul 1 [cited 2015 Sep 14];194(1):133–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16741892>
15. Couper KN, Barnes T, Hafalla JCR, Combes V, Ryffel B, Secher T, et al. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010 Jan [cited 2015 Oct 14];6(1):e1000744. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2813278&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
16. Dasari P, Heber SD, Beisele M, Torzewski M, Reifenberg K, Orning C, et al. Digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* released during erythrocyte rupture dually activates complement and coagulation. *Blood* [Internet]. 2012 May 3 [cited 2015 Oct 14];119(18):4301–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22403252>
17. Pratt-Riccio LR, Bianco C, Totino PRR, Perce-Da-Silva DDS, Silva LA, Riccio EKP, et al. Antibodies against the *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein from naturally exposed individuals living in a Brazilian malaria-endemic area can inhibit in vitro parasite growth. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2011 Aug [cited 2015 Oct 14];106 Suppl :34–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21881755>

18. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvaray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med* [Internet]. 1995 Aug 1 [cited 2015 Oct 14];182(2):409–18. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192140&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
19. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Münz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* [Internet]. 2002 Feb 4 [cited 2015 Oct 14];195(3):343–51. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193591&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2006 Jan [cited 2015 Oct 21];311:17–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17048704>
21. Overstreet MG, Chen Y-C, Cockburn I a, Tse S-W, 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* [Internet]. 2011 Jan [cited 2013 Sep 29];6(1):e15948. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3014941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
22. Cockburn IA, Chen Y-C, Overstreet MG, Lees JR, van Rooijen N, Farber DL, et al. Prolonged antigen presentation is required for optimal CD8+ T cell responses against malaria liver stage parasites. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010 May [cited 2013 Sep 29];6(5):e1000877. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2865532&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
23. Perlaza B-L, Sauzet J-P, Brahimi K, BenMohamed L, Druilhe P. Interferon- γ , a valuable surrogate marker of *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic stages protective immunity. *Malar J* [Internet]. 2011 Jan [cited 2013 Sep 29];10(1):27. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3046914&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
24. Lumsden JM, Cranmer MA, Krzych U. An early commitment to expression of a particular TCRVbeta chain on CD8(+) T cells responding to attenuated *Plasmodium berghei* sporozoites is maintained following challenge with infectious sporozoites. *Parasite Immunol* [Internet]. Jan [cited 2013 Sep 29];32(9-10):644–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20691016>
25. Balam S, Romero JF, Bongfen SE, Guillaume P, Corradin G. CSP--a model for in vivo presentation of *Plasmodium berghei* sporozoite antigens by hepatocytes. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Oct 8];7(12):e51875. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3525584&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

26. Seder RA, Chang L-J, Enama ME, Zephir KL, Sarwar UN, Gordon IJ, et al. Protection Against Malaria by Intravenous Immunization with a Nonreplicating Sporozoite Vaccine. *Science* [Internet]. 2013 Aug 8 [cited 2013 Sep 19];341(6152):1359–65. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/341/6152/1359.abstract>
27. Schwartz L, Brown G V, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malar J* [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Oct 27];11:11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3286401&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
28. 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* [Internet]. 2001 Sep 17;194(6):769–79. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2195961&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Trumpfheller C, Finke JS, López 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* [Internet]. 2006 Mar 20 [cited 2014 Oct 8];203(3):607–17. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2118242&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
30. Pulendran B, Palucka K, Banchereau J. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* [Internet]. 2001 Jul 13 [cited 2013 Sep 29];293(5528):253–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452116>
31. Steinman RM. Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity* [Internet]. 2008 Sep 19 [cited 2013 Sep 27];29(3):319–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18799140>
32. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2013 Sep 23];7(1):19–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170756>
33. Villadangos J a, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2007 Jul [cited 2013 Sep 24];7(7):543–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17589544>
34. 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. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Jul 9];31:563–604. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3853342&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

35. Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart B a, van Kooyk Y. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2004 Jan [cited 2012 Mar 5];22:33–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032573>
36. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumppfeller C, Yamazaki S, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* [Internet]. 2007 Jan 5 [cited 2012 Mar 8];315(5808):107–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17204652>
37. Maldonado-López R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, et al. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* [Internet]. 1999 Mar 1 [cited 2013 Sep 29];189(3):587–92. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192907&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
38. Mashayekhi M, Sandau MM, Dunay IR, Frickel EM, Khan A, Goldszmid RS, et al. CD8α(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity* [Internet]. 2011 Aug 26 [cited 2013 Sep 29];35(2):249–59. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3171793&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
39. Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S-I, 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* [Internet]. 2004 Mar 15 [cited 2013 Sep 24];199(6):815–24. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2212731&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
40. 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* [Internet]. 2002 Dec 9 [cited 2014 Sep 15];196(12):1627–38. Available from: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20021598>
41. Ko H-J, Chung J-Y, Nasa Z, Chan J, Siatskas C, Toh B-H, et al. Targeting MOG expression to dendritic cells delays onset of experimental autoimmune disease. *Autoimmunity* [Internet]. 2011 May [cited 2013 Sep 29];44(3):177–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20883147>
42. Pan W, Ravot E, Tolle R, Frank R, Mosbach R, Türbachova I, et al. Vaccine candidate MSP-1 from *Plasmodium falciparum*: a redesigned 4917 bp polynucleotide enables synthesis and isolation of full-length protein from *Escherichia coli* and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1999 Mar 15;27(4):1094–103. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=148291&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

43. Boscardin SB, Hafalla JCR, Masilamani RF, Kamphorst AO, Zebroski H a, Rai U, et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med* [Internet]. 2006 Mar 20 [cited 2012 Mar 16];203(3):599–606. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2118236&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
44. Fehres CM, Garcia-Vallejo JJ, Unger WWJ, van Kooyk Y. Skin-resident antigen-presenting cells: instruction manual for vaccine development. *Front Immunol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Sep 29];4(June):157. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3687254&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
45. Cheong C, Choi J-H, Vitale L, He L-Z, Trumpfheller C, Bozzacco L, et al. Improved cellular and humoral immune responses in vivo following targeting of HIV Gag to dendritic cells within human anti-human DEC205 monoclonal antibody. *Blood* [Internet]. 2010 Nov 11 [cited 2012 Mar 4];116(19):3828–38. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2981538&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
46. Do Y, Park CG, Kang Y-S, 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* [Internet]. 2008 Jan [cited 2012 May 30];38(1):20–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2864640&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
47. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* [Internet]. 1976 May 7 [cited 2014 Jul 9];72:248–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
48. Wilson NS, Behrens GMN, Lundie RJ, Smith CM, Waithman J, Young L, et al. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat Immunol* [Internet]. 2006 Mar [cited 2015 Nov 30];7(2):165–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni1300>
49. Wilson NS, Behrens GMN, Lundie RJ, Smith CM, Waithman J, Young L, et al. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat Immunol* [Internet]. 2006 Mar [cited 2013 Sep 29];7(2):165–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415871>
50. Birkholz K, Schwenkert M, Kellner C, Gross S, Fey G, Schuler-Thurner B, et al. Targeting of DEC-205 on human dendritic cells results in efficient MHC class II-restricted antigen presentation. *Blood* [Internet]. 2010 Sep 30 [cited 2012 Apr 7];116(13):2277–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20566893>
51. Proetzel GEH. *Antibody Methods and Protocols*. 2012. 297 p.