Icaro Matioli Barbosa

Direcionando as proteínas MSP-1₁₉ de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium yoelii* para células dendríticas *in vivo*: análise das respostas imunes celular e humoral.

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

São Paulo

2011

Ícaro Matioli Barbosa

Direcionando as proteínas MSP-1₁₉ de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium yoelii* para células dendríticas *in vivo*: análise das respostas imunes celular e humoral.

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

Área de Concentração: Parasitologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvia Beatriz Boscardin

Versão corrigida. A versão original se encontra arquivada no Serviço de comunicação do ICB.

São Paulo
2011

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

reprodução não autorizada pelo autor

Barbosa, Icaro Matioli.

Direcionando as proteínas MSP-1₁₉ de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium yoelii* para células dendríticas *in vivo*: análise das respostas imunes celular e humoral. / Icaro Matioli Barbosa. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Dra. Silvia Beatriz Boscardin.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Direcionamento de antígenos para células dendríticas.

Versão do título para o inglês: Targeting the *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* MSP-1₁₉ protein to dendritic cells *in vivo*: analysis of cellular and humoral immune responses.

Descritores: 1. Malária 2. *Plasmodium vivax* e *Plasmodium yoelii* 3. MSP1₁₉ 4. Células Dendríticas 5. DEC205 6. Anticorpos híbridos I. Boscardin, Dra. Silvia Beatriz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0188/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Icaro Matioli Barbosa.

Título da Dissertação: Direcionando as proteínas MSP-1₁₉ de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium yoelii* para células dendríticas *in vivo*: análise das respostas imunes celular e humoral.

Orientador(a): Dra. Silvia Beatriz Boscardin.

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

( ) **Aprovado(a)**

( ) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Presidente: Nome completo: .....
Instituição: .....

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Direcionamento de Antígenos para Células Dendríticas, no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, projeto nº 2009/12625-0), do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas (INCTV- CNPq) e do Banco BNP- Paribas.

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. CEEA.002/2010

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 082/08/CEEA, datado de 26.08.08 e por solicitação da Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão dos alunos: **Eline Vital Rampazo, Ícaro Matioli Barbosa, Hugo Rezende Henriques** 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, 13 de janeiro de 2010.

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

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus.

A Prof^a.Dr^a.Silvia Beatriz Boscardin por todos os ensinamentos, paciência e apoio durante essa trajetória.

Aos meus pais Aparecido e Tania, meus irmãos Alex e Samuel por todo apoio e todos os familiares tanto da parte de pai e de mãe que também sempre de alguma forma me apoiaram dentro de suas possibilidades.

A Ana Paula Ramos de Oliveira e toda sua família e claro a ANA SOPHIA

A todos do Laboratório, Eline, Hugo, Renan, Rachel, Kelly, Hildener, JuliUUU e também o Márcio agradeço a todos pelo imenso apoio e principalmente por me suportaram.

A Joice Fernandes da Silva por tudo, pelas conversas, construção e tudo que foi vivido.

Ao Professor Maurício Rodrigues do CTCMOL e todos do seu laboratório: especialmente Laís, Mari, Ari, Ronnie, Fernando, Daniel e Bruna.

A Professora Irene Soares da FCF e todos do seu laboratório: Elaine, Mayne, Kátia, Lu.

Ao Professor Marcelo Urbano e suas alunas Kézia, Rachel Muller.

A Professora Daniela Santoro Rosa pelas valiosas dicas e apoio, os Professores Èsper e Edécio do LIM-60 que gentilmente disponibilizaram a utilização do FACS.

Ao Professor Luís Carlos, e todos do seu laboratório: Catarina, Cariri, Mari.

Leandrão, Maurício,Rodrigão, Selva, Rafa, Mari, Flávia,Márcia, Wesley, Alessandra,Bianca e toda galera do andar de cima (Muitos que não vou lembrar nome)

Pessoal do Administrativo: Sabrina, Iladir, Wilma, Ângela e Silvia.

Ao Pessoal do Biotério: Sandra, Luiz, Roberto (*in memorian*), Juliane, Anderson, Bruno

Danielle Cristina Gomes Chagas, Luiz, Ivanice respectivas famílias e José Gonzaga e incluindo a amora, por tudo.

Todos do departamento e também aqueles que diretamente ou indiretamente me ajudaram de alguma forma.

Obrigado!

"A caridade tudo sofre,
tudo crê, tudo espera, tudo
suporta"

I Coríntios 13

Resumo

Barbosa IM. Direcionando as proteínas MSP-1₁₉ de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium yoelii* para células dendríticas *in vivo*: análise das respostas imunes celular e humoral. [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Células dendríticas (DCs) são células do sistema imunológico muito importantes no processo de indução de imunidade contra patógenos. Elas são capazes de conectar as respostas imunes inata e adquirida e levar à ativação de células T e B importantes no controle da infecção. Recentemente demonstrou-se que é possível direcionar antígenos diretamente para as DCs *in vivo* através da administração de baixas doses de uma proteína recombinante híbrida consistindo de um anticorpo monoclonal específico para receptores presentes na superfície destas células em fusão com o antígeno de interesse. Quando estes anticorpos híbridos foram injetados em animais na presença de um estímulo de maturação para as DCs, forte resposta imunológica foi obtida contra diferentes antígenos. Dois dos anticorpos monoclonais utilizados tem a capacidade de ligar-se aos receptores endocíticos DEC205 (anticorpo anti-DEC205) e DCIR2 (anticorpo 33D1) presentes na superfície de duas sub-populações distintas de DCs.

Neste trabalho, nós construímos diferentes anticorpos híbridos em fusão com os genes que codificam a proteína MSP-1₁₉ presente na superfície das formas merozoítas de *Plasmodium yoelii* e *Plasmodium vivax*. A maioria dos anticorpos foi produzida com sucesso e manteve sua capacidade de ligação aos seus respectivos receptores. Ensaio de imunização mostraram que o anticorpo anti-DEC (mas não o 33D1) fusionado a qualquer das duas proteínas foi capaz de induzir principalmente uma resposta imune celular quando administrado na presença de anti-CD40+poly I:C, poly I:C ou CpG. Já a resposta imune humoral foi modulada dependendo do anticorpo híbrido (anti-DEC, 33D1 ou isotipo controle), da linhagem de camundongo e da combinação de adjuvantes utilizados.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium*. MSP-1₁₉. Células Dendríticas. Anticorpos Híbridos.

Abstract

Barbosa IM. Targeting *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii* MSP-119 proteins to dendritic cells in vivo: analysis of cellular and humoral immune responses. [master thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011

Dendritic cells (DCs) are cells of the immune system very important in the process of induction of immunity against pathogens. They are able to connect innate and acquired immune responses and lead to activation of T and B cells important in controlling infections.

Recently it was shown that it is possible to target antigens directly to DCs *in vivo* by the administration of low doses of a recombinant hybrid protein consisting of a monoclonal antibody specific for receptors present on the surface of these cells fused with the antigen of interest. When these hybrid antibodies were injected in animals in the presence of a DC maturation stimulus, strong immune response against different antigens was obtained. Two of the monoclonal antibodies used have the ability to bind to either the DEC205 (anti-DEC205) or the DCIR2 (33D1 antibody) endocytic receptors present on the surface of two distinct DC sub-populations.

In this work, we constructed different hybrid antibodies fused with the sequence encoding the MSP-1₁₉ protein present on the surface *Plasmodium yoelii* and *Plasmodium vivax* merozoites. Most antibodies were successfully produced and maintained their ability to bind to their respective receptors. Immunization trials showed that the anti-DEC antibody (but not 33D1) fused to any of the two proteins was able to induce mainly a cellular immune response when administered in the presence of anti-CD40 + poly I:C, poly I:C or CpG. On the other hand, the humoral immune response was modulated depending on the hybrid antibody (anti-DEC, 33D1 or isotype control), the mouse strain and the combination of adjuvants used.

Keywords: Malaria. *Plasmodium*. MSP-1₁₉. Dendritic Cells. Hybrid Antibodies.

Lista de Ilustrações

Figura 1- Lectinas do tipo C expressas por células dendríticas.....	24
Figura 2- Ciclo de vida dos parasitas do gênero <i>Plasmodium</i>	32
Figura 3- Clivagem proteolítica sofrida pela proteína MSP-1 durante o processo de invasão do eritrócito.....	35
Figura 4- Produção dos anticorpos híbridos anti-DEC, 33D1 e Iso em fusão com as proteínas MSP-1 ₁₉ de <i>Plasmodium yoelii</i> e MSP-1 ₁₉ _PADRE de <i>Plasmodium vivax</i>	55
Figura 5- Ensaio de ligação dos anticorpos híbridos anti-DEC-MSP-1 ₁₉ <i>P.yoelii</i> e Iso-MSP-1 ₁₉ <i>P.yoelii</i> a células CHO expressando os receptores DEC205 e DCIR2 de camundongo e DEC205 humano.	56
Figura 6- Ensaio de ligação dos anticorpos híbridos anti-DEC-MSP-1 ₁₉ _PADRE_Pv, Iso-MSP-1 ₁₉ _PADRE_Pv e 33D1-MSP-1 ₁₉ _PADRE_Pv a células CHO expressando os receptores DEC205 e DCIR2 de camundongo e DEC205 humano.	57
Figura 7- Imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP-1 ₁₉ de <i>P.yoelii</i> induz a produção de INF- γ	58
Figura 8- Imunização com o anticorpo quimérico anti-DEC-MSP-1 ₁₉ de <i>Plasmodium yoelii</i> induz produção de anticorpos no soro dos animais imunizados.....	59
Figura 9- Anticorpos anti-MSP1 ₁₉ gerados após imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP1 ₁₉ Py são incapazes de conferir proteção ao desafio com <i>P. yoelii</i>	60
Figura 10- Imunização com os anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da MSP-1 ₁₉ _PADRE_Pv na presença de adjuvantes fortes é capaz de induzir anticorpos específicos contra a proteína MSP-1 ₁₉ de <i>P.vivax</i> em camundongos C57BL/6.....	62
Figura 11- Imunização com os anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da MSP-1 ₁₉ _PADRE_Pv na presença de adjuvantes fortes é capaz de induzir anticorpos de todas as subclasses de IgG.	63
Figura 12- Imunização de camundongos induz a linfoproliferação por incorporação de timidina.	64
Figura 13- Imunização com os anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da MSP-1 ₁₉ _PADRE_Pv na presença de adjuvantes fortes é capaz de induzir anticorpos específicos contra a proteína MSP-1 ₁₉ de <i>P.vivax</i> em camundongo BALB/c.....	65
Figura 14- Imunização com os anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da MSP-1 ₁₉ _PADRE_Pv na presença de adjuvantes fortes é capaz de induzir anticorpos de todas as subclasses de IgGs contra a proteína MSP-1 ₁₉ de <i>P.vivax</i> em camundongos BALB/c.....	66
Figura 15- Imunização com os anticorpos anti-DEC ou 33D1-MSP-1 ₁₉ _PADRE induz a produção de INF- γ	67
Figura 16- Imunização com os anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da proteína MSP-1 ₁₉ _PADRE de <i>P.vivax</i> na presença de poly I:C induz altos títulos de anticorpos anti-MSP-1 ₁₉ em camundongos C57BL/6.....	69
Figura 17- Imunização com os anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da proteína MSP-119_PADRE_Pv na presença de poly I:C induz principalmente anticorpos das subclasses IgG1, IgG2c e IgG2b contra a proteína MSP-119 de <i>P.vivax</i> em camundongos C57BL/6.....	70
Figura 18- Imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP-1 ₁₉ _PADRE induz maior número de células produtoras de INF- γ quando comparada a imunização com o anticorpo 33D1_MSP-1 ₁₉ _PADRE.	72

Figura 19- Imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP-1 ₁₉ _PADRE_Pv induz maior proliferação de células T CD4 ⁺ quando comparada a imunização com o anticorpo 33D1_MSP1 ₁₉ _PADRE.	73
Figura 20- Resposta imune anti-MSP-1 ₁₉ é dependente do direcionamento do antígeno para as células DEC ⁺ ou DCIR2 ⁺ em camundongos BALB/c.	74
Figura 21- Imunização com os anticorpos anti-DEC ou 33D1 fusionados à sequência da MSP-1 ₁₉ _PADRE na presença poly I:C induz anticorpos de todas as subclasses de IgGs contra a proteína MSP-1 ₁₉ de P.vivax em camundongos BALB/c.	75
Figura 22- Imunização com os anticorpos anti-DEC e 33D1-MSP-1 ₁₉ _PADRE P. vivax é capaz de gerar altos títulos de anticorpos quando administrados tanto na presença de poly I:C ou CpG ODN.	77
Figura 23- Imunização com os anticorpos anti-DEC ou 33D1 fusionados à sequência da MSP-1 ₁₉ _PADRE na presença poly I:C induz anticorpos de todas as subclasses de IgGs contra a proteína MSP-1 ₁₉ de P.vivax em camundongos C57BL/6.	78
Figura 24- Imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP-1 ₁₉ _PADRE na presença de poly I:C induz maior proliferação de células T CD4 ⁺ quando comparada a imunização na presença de CpG ODN.	80
Figura 25- Imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP-1 ₁₉ _PADRE na presença de poly I:C induz maior frequência de células polifuncionais produtoras das citocinas INF- γ , IL-2 e TNF α simultaneamente.	82
Figura 26- Imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP-1 ₁₉ _PADRE_Pv em presença de poly I:C é mais eficiente em induzir a produção de INF- γ .	84

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1- Número de casos de malária na Amazônia Legal em 2010 e 2011.....</i>	<i>30</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

2-ME	- 2-mercaptoetanol
A	- Absorbância
ACF	- Adjuvante Completo de Freund
AIF	- Adjuvante Incompleto de Freund
AMP	- Ampicilina
APC	- Célula Apresentadora de Antígeno
BDCA-2/CD303	- Blood DC Antigen 2
BSA	- Albumina Sérica Bovina
CaCl ₂	- Cloreto de Cálcio
CD	- "Cluster of Differentiation"
Ci	- Curie (1 ci=3,7 x 10 ¹⁰ desintegrações/minuto)
CS	- Proteína Circunsporozoíta
DAB	- Diaminobenzidina
DBP	- Proteína ligadora de Duffy
DC	- Célula Dendrítica
DCIR-2	- "Dendritic cell inhibitory receptor-2"
DC-SIGN	- "Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin"
DEC205	- "Dendritic and epithelial cells, 205 kDa"
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DNase	- Desoxirribonuclease
dNTP	- Deoxi-nucleotídios
DO	- Densidade Óptica
DP	- Desvio Padrão

DTT	- 1,4-ditio-D-treitol
EBNA-1	- Epstein Barr Nuclear Antigen-1
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetracético
EGF	- Fator de Crescimento Epidermal
ELISA	- “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
ELISPOT	- “Enzyme Immunospot Assay”
GPI	- Glicosilfosfatidilinositol
H_2CO_3	- Ácido Carbônico
H_2O_2	- Água Oxigenada
H_2SO_4	- Ácido Sulfúrico
H_3PO_4	- Ácido Fosfórico
HCl	- Ácido clorídrico
HEPES	- Ácido n-2-hidroxietilpiperazina n-2-etanosulfônico
ICB	- Bloco Conservado Intraespécies
Ig	- Imunoglobulina
IL	- Interleucina
$\text{INF-}\gamma$	- Interferon-gama
IPTG	- Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
K_2HPO_4	- Fosfato de Potássio Bibásico
kDa	- Quilo Dalton
KH_2PO_4	- Fosfato de Potássio Monobásico
KHCO_3	- Bicarbonato de Potássio
KO	- “Knockout”
L	- Litro
M	- Molar
mA	- Miliampère
mg	- Miligrama

MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
MgSO ₄	- Sulfato de Magnésio
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
mm	- Milímetro
MSP	- Proteína de Superfície do Merozoíta
N	- Normal
Na ₂ CO ₃	- Carbonato de Sódio
Na ₂ HPO ₄	- Fosfato de Sódio Bibásico
Na ₂ PO ₄	- Fosfato de Sódio
NaCl	- Cloreto de Sódio
NaH ₂ PO ₄	- Fosfato de Sódio Monobásico
NaHCO ₃	- Bicarbonato de Sódio
NaNO ₂	- Nitrato de Sódio
NaOH	- Hidróxido de Sódio
ng	- Nanograma
NH ₄ Cl	- Cloreto de Amônio
(NH ₄) ₂ SO ₄	- Sulfato de Amonio
nM	- Nanomol
OPD	- Ortofenilenodiamina
pb	- Pares de Bases
PEG	- Polietilenoglicol
pmol	- Picomol
PMSF	- Fluoreto de Fenilmetil-sulfonila
RNA	- Ácido Ribonucléico
RNase	- Ribonuclease

rpm	- Rotações por Minuto
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
TAE	- Tampão Tris-acetato-EDTA
TAP	- “Transporter associated with antigen processing”
TE	- Tampão tris-EDTA
TEMED	- n, n, n', n' tetrametil etilenodiamida
TLR	- Receptor semelhante a Toll
tRNA	- RNA Transportador
U	- Unidade
V	- Volt
vol/vol	- Volume/volume
X-gal	- 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -d-galactopiranosídio
μ Ci	- Microcurie
μ g	- Micrograma
μ L	- Microlitro
μ M	- Micromolar

Sumário

1 Introdução	20
1.1 Células Dendríticas	21
1.2 Células Dendríticas e suas subpopulações	22
1.3 Receptores endocíticos e sua expressão em diferentes subpopulações de DCs.	23
1.4 Direcionamento de antígenos para DCs <i>in vivo</i> utilizando anticorpos monoclonais híbridos	26
1.5 Malária e sua distribuição mundial.....	29
1.6 Ciclo do <i>Plasmodium</i>	31
1.7 Desenvolvimento de vacinas para malária.....	33
1.8 Proteínas das formas eritrocíticas candidatas à vacina contra <i>P. vivax</i>	34
1.9 A MSP-1 e a indução de resposta imune.....	34
1.10 O epítopo DR pan alélico (“Pan allelic DR epitope”, PADRE).....	36
2 Objetivos	38
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos específicos	39
3 Metodologia	40
3.1 Animais utilizados.....	41
3.2 Preparação de Bactérias Competentes.....	41
3.3 Transformação de bactérias competentes.	42
3.4 Obtenção de DNA plasmidial em larga escala.....	42
3.5 Produção de proteínas recombinantes.	43
3.6 Produção de anticorpos por transfecção de células HEK293T.....	44
3.7 Precipitação e purificação dos anticorpos híbridos.....	45
3.8 Ensaio para detecção de LPS.....	46
3.9 Ensaio de ligação dos anticorpos híbridos a células CHO expressando os receptores DEC205 e DCIR2 de camundongo.	46
3.10 Ensaios de imunização com os anticorpos híbridos monoclonais combinados a diferentes adjuvantes.	47
3.11 Ensaio de ELISA.....	47
3.12 Ensaio de ELISA para tipagem das subclasses de imunoglobulinas G.	48

3.13 Ensaio de ELISPOT	48
3.14 Marcação intracelular de células produtoras de IFN- γ , IL-2 e TNF- α	50
3.15 A análise da resposta imune celular através de proliferação medida pela diluição do corante CFSE.	50
3.16 Análise da resposta imune celular através de proliferação medida pela incorporação de Timidina.	51
3.17 Análise estatística.	52
4 Resultados.....	53
4.1 Produção dos anticorpos híbridos em fusão com as proteínas MSP-1 ₁₉ de <i>Plasmodium yoelii</i> e MSP-1 ₁₉ _PADRE de <i>Plasmodium vivax</i>	54
4.2 Ensaio de ligação dos anticorpos híbridos a células CHO expressando os receptores DEC205 e DCIR2.....	55
4.3 Imunização de camundongos C57BL/6 com os anticorpos híbridos contendo a proteína MSP-1 ₁₉ de <i>Plasmodium yoelii</i>	57
4.4 Imunização de camundongos C57BL/6 com os anticorpos híbridos contendo a proteína MSP-1 ₁₉ _PADRE de <i>Plasmodium vivax</i> na presença de anti-CD40+poly I:C.	61
4.5 Imunização de camundongos BALB/c com os anticorpos híbridos contendo a proteína MSP-1 ₁₉ _PADRE de <i>Plasmodium vivax</i> na presença de anti-CD40+poly I:C.	65
4.6 Imunização de camundongos C57BL/6 com os anticorpos híbridos contendo a proteína MSP-1 ₁₉ _PADRE de <i>Plasmodium vivax</i> na presença de poly I:C.....	68
4.7 Imunização de camundongos BALB/c com os anticorpos híbridos contendo a proteína MSP-1 ₁₉ _PADRE de <i>Plasmodium vivax</i> na presença de poly I:C.....	74
4.8 Imunização de camundongos C57BL/6 com os anticorpos híbridos contendo a proteína MSP-1 ₁₉ _PADRE de <i>Plasmodium vivax</i> na presença de poly I:C ou CpG ODN.	76
5 Discussão	85
6 Conclusões.....	94
Referências.....	97

1 Introdução

1.1 Células Dendríticas.

Em meados da década de 70, o Dr. Ralph Steinman, trabalhando no laboratório do Dr. Zanvil Cohn (The Rockefeller University), descreveu uma nova população de células presente no baço e linfonodos de camundongos. Tais células foram caracterizadas com base em sua morfologia, localização *in vivo*, quantidade em diferentes órgãos linfóides periféricos e em suas propriedades funcionais, e foram então denominadas células dendríticas (DCs, do inglês “*dendritic cells*”) (1-4).

Nos últimos anos, ficou bastante claro que as DCs são células apresentadoras de antígenos (APCs) capazes de iniciar e regular a resposta imune (5). Elas são encontradas na maioria dos tecidos, especialmente pele, mucosas e órgãos linfóides. Além disso, são especializadas na apresentação de antígenos e possuem capacidade migratória, o que faz com que sejam capazes de capturar antígenos na periferia e levá-los até os órgãos linfóides, onde são normalmente apresentados para células T (6).

As DCs tornam-se células apresentadoras de antígenos eficientes quando sofrem um processo de maturação, que pode ser iniciado por diferentes estímulos. Entre eles, podemos citar: a) ligantes microbianos através dos receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês, “*toll-like receptors*”), b) células do sistema inato (células NKT, por exemplo), c) complexos imunes agindo nos receptores para porção Fc de anticorpos e d) outros estímulos do ambiente ou endógenos, coletivamente conhecidos como “alarminas”. O processo de maturação resulta em uma série de mudanças fenotípicas que estão ligadas a capacidade aumentada de processar antígenos e ativar células T. Estas alterações fenotípicas incluem um aumento na produção de complexos de peptídeos ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (7), aumento da expressão de moléculas que favorecem a formação da sinapse imunológica com as células T, entre elas CD48 e CD58, além de moléculas co-estimulatórias, como CD80 e CD86) (8), produção de quimiocinas

(9), além de grandes quantidades de citocinas como interleucina (IL) -12 (10) e interferons (INF) do tipo I (11).

Por outro lado, as DCs também possuem um papel central na indução de tolerância central e periférica e estão presentes na região medular do timo gerando tolerância através da deleção de células T auto-reativas (12), podendo também induzir o aparecimento de células T reguladoras (13). Além disso, as DCs estão envolvidas no processo de tolerância periférica evitando reatividade contra auto-antígenos que, ou escaparam do processo de seleção negativa (14), ou nunca foram expressos no timo. Isso ocorre de duas formas principais. Em uma delas, na ausência de um estímulo inflamatório de maturação, o direcionamento de antígenos para as DCs leva à deleção de células T específicas para os mesmos (15-17). A outra é através da promoção da expansão e diferenciação de células T que regulam ou suprimem outras células do sistema imune (18-20). Uma tolerância periférica eficiente é particularmente importante em sítios de infecção onde DCs simultaneamente processam e apresentam antígenos próprios e não próprios.

1.2 Células Dendríticas e suas subpopulações.

No estado estacionário, ou seja, na ausência de uma infecção ou outro estímulo, existem diferentes subpopulações de DCs. O estudo destas subpopulações foi iniciado no baço de camundongos (21, 22) e no sangue humano (23). Atualmente, outros órgãos como pele e mucosas estão também sendo examinados. *Guilliams* et al. (24) propõem que existam ao menos 5 subpopulações de DCs no estado de equilíbrio, quando não ocorrem infecções: dois tipos de DCs clássicas, DC plasmocitóides (pDCs), células de Langerhans (LCs), e DCs derivadas de monócitos. Estas subpopulações possuem diferentes funções que vem sendo elucidadas ao longo dos últimos anos (25, 26).

No baço, o principal órgão para estudos de imunidade em camundongos, duas subpopulações principais de DCs podem ser distinguidas.

Ainda que ambas expressem altos níveis da integrina CD11c, uma subpopulação expressa a cadeia α da molécula CD8 e a outra não (27). As DCs CD8 α^+ são especializadas em induzir o desenvolvimento de células Th1, em capturar células mortas e em apresentar peptídeos antigênicos pela via cruzada em moléculas de MHC I. Já a subpopulação de DCs CD8 α^- parece induzir a produção de IL-4 e é mais eficiente em formar complexos peptídeo-MHC II (28-33). Em resumo, com base nos dados disponíveis, as DCs CD8 α^+ parecem ser especializadas na captura de células mortas (34) e na ativação de células T CD8 $^+$ durante infecções virais, enquanto que as DCs CD8 α^- parecem estar envolvidas preferencialmente na indução de respostas de células T CD4 $^+$, particularmente durante infecções bacterianas (26).

1.3 Receptores endocíticos e sua expressão em diferentes subpopulações de DCs.

As DCs expressam um grande número de receptores endocíticos capazes de mediar a captação de antígenos. Muitos destes são lectinas do tipo C (figura 1, (35)), que podem ser proteínas transmembrana do tipo II com um único domínio C-terminal do tipo lectina (por exemplo, Langerina/CD207, DC-SIGN/CD209, BDCA-2, Dectina-1 e DCIR-2), ou proteínas transmembrana do tipo I, com múltiplos domínios do tipo lectina (por exemplo, receptor de manose (MR)/CD206 e DEC205/CD205). Outros receptores endocíticos são os receptores para a porção Fc das imunoglobulinas G (Fc γ Rs), que medeiam a apresentação de imunocomplexos e de células tumorais revestidas com anticorpos, tanto por moléculas de MHC I quanto por MHC II. As DCs também são capazes de capturar células mortas, porém os receptores que medeiam tal processo ainda não foram descritos. Interessantemente, receptores individuais podem ser expressos em subpopulações distintas de DCs. Por exemplo, Langerina/CD207 e DEC205/CD205 são expressos em células de Langerhans (LCs) (36), enquanto DC-SIGN/CD209 e MR/CD206 são altamente expressos em DCs dermais (37) e em DCs derivadas de monócitos (38). Em camundongos, a subpopulação de DCs CD8 α^+ expressa o receptor DEC205,

bem como Langerina (39, 40), enquanto a subpopulação $CD8\alpha^-$ é DCIR2 positiva (32).

Figura 1- Lectinas do tipo C expressas por células dendríticas.

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

Adaptado de Figdor et al. (2002).

A presença de tantos receptores endocíticos permite que as DCs reconheçam e capturem diferentes ligantes. Interessantemente, esses receptores podem também mediar resultados diferentes no que se refere ao processamento e apresentação dos antígenos. Vamos considerar quatro aspectos importantes nos quais os receptores de DCs podem diferir.

Em primeiro lugar, receptores individuais podem seguir caminhos distintos dentro do citosol, conforme os diferentes domínios neles contidos. DEC-205/CD205 possui uma sequência de três aminoácidos ácidos que faz com que o receptor dirija-se e recicle lentamente em endossomos tardios

positivos para MHCII. Por outro lado, MR/CD206 recicla rapidamente através de células por endossomos jovens (6).

Uma segunda característica da função do receptor de DCs é que antígenos endocitados, por exemplo, via DEC-205 ou FcγRs, podem ser apresentados de forma cruzada via moléculas de MHC I (6). Conforme mencionado anteriormente, as DCs CD8α⁺DEC205⁺ são mais eficientes no processo de apresentação cruzada, fato que pode ser explicado pela alta expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos via moléculas de MHC I, como TAP (do inglês “Transporter associated with Antigen Processing”) e tapasina (32).

Terceiro, receptores endocíticos distintos podem ser expressos em subpopulações distintas de DCs, que podem então influenciar o subsequente processamento e apresentação dos antígenos. Utilizando proteínas fusionadas a anticorpos anti-DEC ou anti-DCIR2 (também conhecido como 33D1), *Dudziak et al.* (32) mostraram que a subpopulação de DCs CD8α⁺DEC205⁺ apresenta antígenos às células T CD8⁺ de forma mais eficiente do que a subpopulação CD8α⁺DCIR2⁺. Por outro lado, esta última subpopulação é bastante eficiente em apresentar antígenos para células T CD4⁺, provavelmente porque expressa níveis mais altos de proteases lisossomais importantes para o carregamento dos antígenos nas moléculas de MHC II. Subpopulações de DCs exibem também outras funções distintas. Um exemplo foi descrito por *Soares et al.* (36) que fusionaram um antígeno de *Leishmania*, denominado LACK, aos anticorpos anti-DEC205 e 33D1. O direcionamento do antígeno para ambas as subpopulações de DCs levou a uma apresentação eficiente para células T CD4⁺, mas a subpopulação DEC205⁺ levou esses linfócitos a produzirem INF-γ por um mecanismo independente de IL-12, mas dependente de CD70. Já a subpopulação DCIR2⁺ também induziu a produção INF-γ *in vivo*, mas por uma via dependente IL-12, e não mais de CD70.

E em quarto lugar, sabe-se que os receptores endocíticos podem associar-se a outras moléculas de sinalização, por exemplo, a dectina-1, que reconhece leveduras e partículas de zimozan, associando-se ao TLR2 (41, 42).

Em resumo, a expressão de vários receptores permite às DCs capturar antígenos eficientemente e processar peptídeos que serão apresentados por moléculas de MHC I e II para células T CD8⁺ e T CD4⁺, respectivamente. O tipo de receptor utilizado pode desempenhar um papel importante na apresentação de antígenos vacinais e ditar as características funcionais da resposta imune.

1.4 Direcionamento de antígenos para DCs *in vivo* utilizando anticorpos monoclonais híbridos.

O direcionamento de antígenos para DCs utilizando o anticorpo anti-DEC205 foi inicialmente descrito por *Hawiger* e cols (15) e *Bonifaz* e cols (17). Nesses estudos iniciais, o anticorpo anti-DEC foi conjugado ou fusionado diretamente a antígenos modelo como a ovalbumina (OVA) e lisozima de ovo de galinha (HEL). A administração desses anticorpos híbridos (anti-DEC-OVA e anti-DEC-HEL) foi capaz de direcionar os antígenos à subpopulação de DCs CD8α⁺DEC205⁺ *in vivo*. Os antígenos foram então eficientemente processados e apresentados tanto para células T CD4⁺ quanto para células T CD8⁺ transgênicas. Na ausência de inflamação, o direcionamento de antígenos resultou na indução de tolerância periférica, observada pela deleção de células T transgênicas específicas para o antígeno utilizado. Entretanto, quando os anticorpos foram administrados na presença de um estímulo de maturação para as DCs, como o anticorpo agonista anti-CD40, houve ativação prolongada de células T CD4⁺ e CD8⁺. Além disso, a imunidade induzida foi de longa duração e mais efetiva do que a induzida pela administração de potentes adjuvantes como o adjuvante completo de Freund (15, 17). Dando continuidade a esses estudos, o mesmo grupo mostrou que camundongos vacinados com o anticorpo anti-DEC-OVA na presença de anti-CD40 tornaram-se resistentes a infecção pelo vírus vaccínia transgênico expressando OVA (43). Além disso, a imunização de animais com o mesmo anticorpo promoveu a ativação de células T CD4⁺ de memória (44), importantes para a ativação de linfócitos B antígeno específicos.

Os estudos citados acima abriram a possibilidade de se utilizar anticorpos híbridos anti-DEC205 conjugados a antígenos clinicamente relevantes para a indução de imunidade protetora contra diferentes doenças prevalentes.

Boscardin et al. (44) utilizaram o anticorpo anti-DEC205 fusionado à proteína circunsporozoíta (CS) expressa no estágio pré-eritrocítico de desenvolvimento do *Plasmodium yoelii*. A administração de uma única dose do anticorpo quimérico anti-DEC-CS, na presença de um estímulo de maturação para as DCs, foi capaz de induzir células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de INF- γ em diferentes linhagens de camundongos. Além disso, a indução de resposta imune humoral também foi observada após a administração de uma dose de reforço do anticorpo, na ausência de qualquer outro adjuvante.

Em outro estudo, a imunização com o anticorpo anti-DEC205 fusionado à proteína Gag do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) foi capaz de induzir uma resposta imune mediada principalmente por células T CD4⁺ produtoras de INF- γ . Além disso, a geração de resposta imune protetora foi observada nos animais imunizados com o anticorpo anti-DEC-Gag quando estes foram desafiados com um vírus vaccínia transgênico expressando a proteína Gag (45, 46). A eficácia da imunização com DNA foi aumentada quando se utilizou um plasmídeo codificando para o anticorpo anti-DEC205 em fusão com a proteína Gag (47).

Em outro trabalho, macacos Rhesus foram imunizados com o anticorpo anti-DEC205 fusionado à proteína CS de *P. falciparum* na presença de poly (I:C). Observou-se a indução de células T CD4⁺ multifuncionais e a produção de anticorpos anti-CS com características neutralizantes, capazes de bloquear em cerca de 43% a invasão de eritrócitos pelo *P. falciparum in vitro* (48).

Mais recentemente, a imunização de primatas com o anticorpo anti-DEC205 fusionado à proteína Gag, seguida de um reforço utilizando um vírus vaccínia codificando as proteínas Gag, Pol e Nef do HIV, foi capaz de induzir forte resposta celular (49).

Além dos ensaios utilizando proteínas do vírus HIV e de *Plasmodium*, a estratégia de direcionar antígenos utilizando os anticorpos anti-DEC205 e 33D1 foi testada com um antígeno derivado da bactéria *Yersinia pestis* (agente

causador da peste pneumônica). Quando a proteína LcrV foi fundida ao anticorpo anti-DEC205 e administrada a camundongos na presença de estímulos de maturação para as DCs, forte resposta imune celular foi induzida (50). Além disso, observou-se a indução de resposta humoral com níveis de anticorpos semelhantes àqueles induzidos pela vacina comercial. Da mesma forma, a proteína LcrV direcionada para o receptor DCIR2 foi capaz de induzir proteção contra desafio utilizando uma cepa virulenta.(51).

Além de experimentos *in vivo* utilizando camundongos e macacos, o anticorpo anti-DEC205 também foi utilizado com sucesso para direcionar antígenos para as DCs de humanos *in vitro*. Bozzacco et al. (52) mostraram que ocorreu ativação de linfócitos T CD8⁺ e produção de INF- γ quando o anticorpo híbrido anti-DEC205 fusionado à proteína Gag do vírus HIV foi incubado com DCs provenientes de pacientes soropositivos, e depois reestimuladas com as células T autólogas. Gurer et al. (53) obtiveram resultados semelhantes quando utilizaram um anticorpo anti-DEC humano em fusão com o antígeno EBNA-1 do vírus Epstein-Barr.

Novos anticorpos anti-DEC205 humano foram gerados e selecionados por sua capacidade de reconhecer com alta afinidade o receptor DEC205. Esses anticorpos foram fusionados à proteína Gag de HIV e observou-se a indução de ampla resposta celular quando camundongos transgênicos expressando o DEC205 humano foram utilizados em ensaios de imunização (54). Mais interessante ainda foi o fato de que esses anticorpos, assim como o anticorpo utilizado por (52), foram também capazes levar à estimulação de células T CD8⁺ *in vitro*.

Os resultados pré-clínicos obtidos com o anticorpo anti-DEC-Gag foram tão promissores que testes clínicos de fase I foram iniciados no primeiro semestre de 2010 (<http://www.clinicaltrials.gov>, identificador NCT01127464) com objetivo de verificar a segurança, tolerabilidade e imunogenicidade do anticorpo anti-DEC-Gag em indivíduos saudáveis.

1.5 Malária e sua distribuição mundial.

Neste projeto utilizaremos o direcionamento de antígenos para DCs com anticorpos híbridos na tentativa de induzir resposta imune contra as formas sanguíneas de parasitas que causam a malária.

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida ao homem por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Aproximadamente 200 espécies do gênero *Plasmodium* que infectam aves, répteis e mamíferos já foram descritas. Quatro destas espécies infectam naturalmente o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. O *P. falciparum* e o *P. vivax* são as espécies responsáveis pela maioria dos casos de malária descritos no mundo. Mais recentemente, foram descritos casos de malária humana causados pelo parasita *P. knowlesi* (55).

Em 2009, a Organização Mundial da Saúde estimou o número de casos de malária em aproximadamente 225 milhões, tendo causado cerca de 780.000 mortes (56).

Ainda que o *P. falciparum* seja a espécie mais virulenta, o *P. vivax*, segunda espécie mais prevalente no mundo, tem uma distribuição geográfica mais ampla e coexiste com o *P. falciparum* em vários lugares. Na América Latina, cerca de 70-80% da população vive sob risco de adquirir malária causada por *P. vivax*. Estima-se que essa espécie seja responsável por cerca de 80-300 milhões de casos por ano no mundo (57).

No Brasil, existem três espécies de *Plasmodium* causadores da malária: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Há 50 anos a frequência dos casos de malária era equitativamente distribuída entre *P. falciparum* e *P. vivax*. Entretanto, nos últimos anos o *P. vivax* tem sido responsável por cerca de 80% dos casos da doença. Aproximadamente 99% dos casos de malária ocorrem na região da Amazônia legal (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), Mato Grosso e parte do Maranhão (macrorregião Nordeste). Em 2009 foram registrados na Amazônia 306.342 casos de malária. Se comparados com o relato em 2008, houve uma redução de cerca de 33% no número de casos (58). Quando comparamos os números de casos de malária no primeiro semestre de 2010 e 2011, por estado pertencente à

Amazônia legal, observamos uma redução de até 45% no número de pessoas infectadas (tabela 1).

Tabela 1- Número de casos de malária na Amazônia Legal em 2010 e 2011.

1º semestre de 2010/2011	2010	2011	Redução de
1. ACRE	18.615	10.137	45%
2. AMAZONAS	40.793	23.864	41%
3. AMAPÁ	6.195	5.002	19%
4. MARANHÃO	2.131	1.305	39%
5. MATO GROSSO	1.201	876	27%
6. PARÁ	67.462	53.289	21%
7. RONDÔNIA	20.084	12.798	36%
8. RORAIMA	11.859	8.397	29%
9. TOCANTINS	57	40	30%

Apesar dos esforços, a malária ainda é um grave problema de saúde pública no Brasil e o governo federal lançou no dia 05/09/2011 a campanha “Mobilização contra malária”, que tem por objetivo estimular o uso correto de mosquiteiros e conscientizar a população sobre a doença, a sintomatologia e o tratamento.

Embora a mortalidade causada pelo *P. vivax* seja considerada muito baixa quando comparada àquela causada pelo *P. falciparum*, sua morbidade é significativa e leva à redução no crescimento econômico. Isso ocorre porque, nos lugares onde o *P. vivax* é moderadamente endêmico, a maior parte dos habitantes vivencia de 10 a 30 episódios de malária durante o curso de sua vida. Esses episódios de malária fazem com que o paciente tenha que se ausentar da escola ou do trabalho por 5-15 dias, tendo como consequência um efeito debilitante cumulativo, com queda na produtividade, e na qualidade e expectativa de vida (59). Mais recentemente tem sido descrito um aumento na resistência a tratamentos quimioterápicos (60) além de um aumento significativo da virulência de algumas cepas de *P. vivax* (61, 62). Também tem sido relatado um aumento no número de casos de complicações graves em vários países. Estas complicações incluem anemia, síndrome respiratória,

desnutrição e malária cerebral (63). No caso específico do Brasil, há relatos de que a infecção pelo *P. vivax* possa causar formas graves e letais da doença, sendo que os principais problemas estão relacionados com alterações hematológicas, ruptura esplênica, disfunções renais e pulmonares (64).

1.6 Ciclo do *Plasmodium*.

O ciclo de vida do parasito, representado na figura 2, se inicia quando mosquitos *Anopheles* fêmeas infectados injetam uma pequena quantidade de esporozoítos no tecido subcutâneo, durante a hematofagia (65). Esses, por sua vez, entram na corrente sanguínea e chegam ao fígado, onde invadem e se replicam dentro de hepatócitos, diferenciando-se em merozoítos. Posteriormente, esses merozoítos são liberados na corrente sanguínea, em vesículas conhecidas como merossomos (66).

Nas infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*, parte dos esporozoítos desenvolve-se rapidamente dentro dos hepatócitos dando origem a esquizontes e posteriormente a merozoítos, enquanto outros ficam em estado de latência no fígado, sendo denominados de hipnozoítos (67).

Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos rapidamente invadem eritrócitos. Nesta fase do desenvolvimento se estabelece um ciclo de invasão, replicação e ruptura, quando os merozoítos se multiplicam dentro das hemácias que se rompem, liberando no sangue, parasitos que infectam novas hemácias (figura 2). Cada ciclo tem duração de aproximadamente 48 ou 72 horas (dependendo da espécie de *Plasmodium*) e acredita-se que o aparecimento da febre malárica esteja relacionado com a liberação das formas merozoítas no final de cada ciclo.

Figura 2- Ciclo de vida dos parasitas do gênero Plasmodium.

Fonte: Sturm et al, 2006

Durante o ciclo eritrocítico, uma parte dos merozoítos dá origem aos gametócitos masculinos e femininos. Essas formas, quando ingeridas pelo mosquito no momento da picada, sobrevivem e transformam-se em micro ou macro gametas. No aparelho digestivo do hospedeiro invertebrado ocorre a fecundação, formando-se o zigoto (diplóide) que evolui para uma estrutura móvel conhecida como oocineto. Este, por sua vez, atravessa a membrana peritrófica do intestino do mosquito e se diferencia em oocisto, que sofre um processo conhecido como esporogonia dando origem a milhares de esporozoítos haplóides. Os esporozoítos são liberados na hemolinfa do inseto e migram para as glândulas salivares. Estes esporozoítos maduros são então transmitidos a outros hospedeiros durante uma nova picada do inseto vetor.

1.7 Desenvolvimento de vacinas para malária.

Em regiões endêmicas para malária, indivíduos permanentemente expostos normalmente desenvolvem manifestações clínicas mais leves ou permanecem assintomáticos. Essa “imunidade” clínica fornece evidências indiretas de que é possível o desenvolvimento de imunidade protetora e de longa duração, que poderia ser desenvolvida através de métodos de vacinação (68).

Outras evidências provenientes de estudos em humanos sugerem que uma vacina profilática para malária é possível: a imunização de voluntários humanos com esporozoítas irradiados foi capaz de conferir 90% de proteção estéril contra a infecção transmitida pela picada de mosquitos infectados (69, 70). A imunidade adquirida naturalmente é construída progressivamente durante as duas primeiras décadas de vida dos indivíduos que vivem em países onde a malária é endêmica, resultando em um grande impacto na severidade da doença. Evidências apontam para uma forte conexão entre a geração de imunidade protetora e a contínua estimulação antigênica, sendo perdida rapidamente na ausência de exposição ao parasito (71, 72). Além disso, observa-se que essa imunidade clínica pode ser transferida. Ensaios demonstraram que a transferência adotiva de anticorpos provenientes de pessoas residentes em área endêmica a indivíduos que nunca tiveram contato com a doença foram capazes de promover proteção contra a infecção (73, 74).

Durante o complexo ciclo de vida do parasito, três estágios parasitários foram identificados como alvos potenciais da resposta imune. São eles: formas pré-eritrocíticas, formas eritrocíticas e formas sexuais. Sendo o estágio eritrocítico responsável pelos sintomas clínicos, uma vacina capaz de bloquear a invasão de eritrócitos seria capaz de reduzir tanto a morbidade quanto a mortalidade dos indivíduos infectados.

1.8 Proteínas das formas eritrocíticas candidatas à vacina contra *P. vivax*.

Os mecanismos de proteção durante a fase eritrocítica do desenvolvimento incluem a inibição da invasão das hemácias por anticorpos capazes de neutralizar proteínas da superfície do merozoíto e de estimular a fagocitose de eritrócitos infectados.

Alguns antígenos de *P. vivax* foram identificados e caracterizados imunologicamente. Dentre eles destacam-se a proteína ligadora de Duffy (do inglês “Duffy binding protein”, DBP) e a proteína 1 da superfície do merozoíto (MSP-1) (75-78).

1.9 A MSP-1 e a indução de resposta imune.

A proteína MSP-1 é expressa abundantemente na superfície dos merozoítos e é alvo da resposta humoral adquirida durante a infecção (79). Faz parte de um complexo de proteínas que inclui a MSP-6 e a MSP-7, e é sintetizada durante a esquizogonia como um precursor de aproximadamente 195 kDa, ancorada à membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (80). No momento da invasão, a MSP-1 é processada por serino proteases (81) em quatro fragmentos de 83, 30, 38 e 42 kDa, que permanecem ligados à superfície do parasita. O fragmento de 42 kDa (MSP-1₄₂) sofre novo processamento resultando em dois fragmentos menores: um de 33 kDa (MSP-1₃₃) e outro de 19 kDa (MSP-1₁₉) (80, 82, 83). Neste segundo processamento a MSP-1₃₃ é liberada juntamente com os outros fragmentos e a MSP-1₁₉ permanece ligada pela âncora de GPI à superfície do merozoíto sendo então carregada para dentro do eritrócito juntamente com o parasita (84). A figura 3, extraída de *Holder e cols* (84), mostra um esquema representativo das sucessivas clivagens sofridas pela MSP-1 durante a invasão dos eritrócitos.

A MSP-1 de *P. vivax* (Pv200) é uma proteína polimórfica que consiste de vários domínios dimórficos e conservados (ICBs, do inglês “*interspecies conserved blocks*”) (85). Vários estudos mostraram a alta antigenicidade das

diferentes regiões desta proteína a partir de cepas presentes no Brasil (86, 87) e na Colômbia (78).

O fragmento Pv200L da MSP1 de *P. vivax*, definido como homólogo do fragmento Pf190L, foi produzido em *Escherichia coli* e mostrou-se altamente imunogênico em ensaios utilizando camundongos BALB/c e macacos *Aotus* (78). Primatas imunizados com a proteína recombinante Pv220L formulada em Montanide ISA-720 apresentaram forte resposta humoral específica e protetora, determinada em ensaios de desafio com *P. vivax*, com redução da anemia e eliminação dos parasitas (78).

Figura 3- Clivagem proteolítica sofrida pela proteína MSP-1 durante o processo de invasão do eritrócito.

Fonte: Adaptado de Holder et al. (2009).

Nas diferentes espécies de *Plasmodium*, a MSP-1₁₉ possui dois domínios estruturados de maneira semelhante ao fator de crescimento epidermal (do inglês "Epidermal growth factor", EGF). A região N-terminal da MSP-1₁₉ contém um fragmento altamente conservado com vários epítomos para células B e T que em *P. falciparum* foram denominados Pf190L. Este fragmento, expresso como uma proteína recombinante, foi capaz de induzir

proteção parcial contra desafio infeccioso em primatas (88). A partir desses resultados foi desenvolvida uma vacina multivalente chamada de “combinação B” capaz de induzir proteção parcial em ensaios clínicos, sendo a subunidade 190L o componente mais imunogênico (89).

O potencial imunoprotetor de proteínas recombinantes baseadas na região C-terminal da MSP-1 (MSP1₁₉) foi demonstrado em vários modelos experimentais (90). O sucesso de imunizações em roedores e macacos com a MSP-1₁₉ de *P. yoelii* e *P. falciparum*, respectivamente, estimulou tentativas de vacinações experimentais utilizando proteínas recombinantes de *P. cynomolgi* e *P. vivax* (75, 91-94). Diferentes grupos vêm desenvolvendo trabalhos sobre a imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas na MSP-1₁₉ de *P. vivax* em modelos experimentais utilizando camundongos, coelhos e macacos. (95-103).

1.10 O epítopo DR pan alélico (“Pan allelic DR epitope”, PADRE).

O epítopo PADRE é um peptídeo sintético não natural que se liga com afinidade alta ou intermediária a 15 dos 16 tipos mais comuns de moléculas de HLA-DR (104, 105). Devido a sua promiscuidade de ligação, o peptídeo PADRE poderia solucionar problemas relacionados ao extremo polimorfismo das moléculas de HLA na população humana. Além disso, esse peptídeo foi desenhado para ser altamente imunogênico em seres humanos (105). Quando a imunogenicidade deste peptídeo foi avaliada utilizando-se células T humanas em ensaios de proliferação, ele foi cerca de 100x mais potente do que o controle constituído do epítopo universal do toxóide tetânico (106). Esta propriedade representa uma característica importante do epítopo PADRE, sugerindo sua utilidade potencial como um carregador capaz de induzir uma resposta de células T auxiliares em construções vacinais desenhadas para uso em seres humanos. Além dessas características, o epítopo PADRE é capaz de ligar-se a moléculas de MHC II murinas (I-A^b) expressas por camundongos da

linhagem C57BL/6. Desta forma, é possível validar o efeito do PADRE em modelo murino.

Experimentos interessantes foram realizados com o epítopo PADRE fusionado a peptídeos codificando para epítopos de células B da proteína CS de *P. yoelii*. Observou-se uma forte resposta de IgGs e estes anticorpos reagiram com esporozoítos intactos e também inibiram a infecção de células hepáticas *in vitro* (107). O epítopo PADRE também foi utilizado com muito sucesso para melhorar a resposta humoral contra epítopos compostos por carboidratos, que normalmente são pouco imunogênicos (108).

A proteína MSP1₁₉ também já foi fusionada ao epítopo PADRE e forte resposta imune humoral foi observada quando diferentes adjuvantes foram utilizados (96, 109). Mais interessante ainda foi o fato de o epítopo PADRE fusionado a MSP1₁₉ ter sido utilizado para imunização de primatas não humanos (*Callithrix jacchus jacchus*) (103).

Os dados apresentados acima indicam que o epítopo PADRE parece fornecer a ajuda necessária para que as células B sejam capazes de gerar elevados títulos de anticorpos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Direcionar as proteínas MSP-1₁₉ de *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) e de *Plasmodium yoelii* (*P. yoelii*) para células dendríticas *in vivo* e analisar as respostas imunes celular e humoral geradas contra estas proteínas.

2.2 Objetivos específicos

- a) Produção dos anticorpos híbridos por transfecção transiente de células HEK293T e purificação dos mesmos a partir dos sobrenadantes das culturas;
- b) Análise da ligação destes anticorpos aos receptores DEC205 e DCIR2 de camundongos;
- c) Produção das proteínas recombinantes MSP-1₁₉ e MSP-1₁₉_PADRE de *P. vivax* e MSP-1₁₉ de *P. yoelii*;
- d) Imunização de camundongos com os anticorpos híbridos monoclonais produzidos na presença dos adjuvantes anti-CD40+poly I:C, poly I:C e CpG ODN;
- e) Análise das respostas imunes celular e humoral geradas após aplicação desses protocolos de imunização;
- f) Desafio dos animais imunizados com os anticorpos híbridos contendo a MSP-1₁₉ de *P. yoelii*.

3 Metodologia

3.1 Animais utilizados.

Camundongos C57BL/6 ou BALB/c com idades entre 5-12 semanas foram obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Parasitologia do ICB/USP. Os animais foram mantidos em condições livres de patógenos durante o curso dos estudos. Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pelo comitê de ética de experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (protocolo número 082).

3.2 Preparação de Bactérias Competentes.

Uma colônia de bactérias *Escherichia coli* DH5α ou BL21DE3 foi inoculada em 3 mL de meio de cultura LB (Luria-Bertani, Invitrogen), seguindo incubação por 16 horas a 37 °C, sob agitação constante (200 rpm). O inóculo foi então diluído em 200 mL de meio LB e incubado a 37 °C sob agitação constante até que a densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) estivesse entre 0,6-0,8. O recipiente contendo as bactérias foi então incubado em gelo por 30 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 1.400 X g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, as bactérias foram ressuspensas em 75 mL de uma solução de $CaCl_2$ 0,1 M e incubadas em gelo por 12 horas. Após nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado bacteriano foi ressuspendido em 2 mL de uma solução de $CaCl_2$ 0,1 M/glicerol 15%.

As bactérias foram então dispensadas em alíquotas de 50 µL, congeladas rapidamente em gelo seco contendo álcool e posteriormente estocadas a -70 °C.

3.3 Transformação de bactérias competentes.

Para as transformações, 50-100 ng do DNA plasmidial foram adicionados a tubos de microcentrifuga contendo alíquotas de 10 µL de bactérias competentes e 90 µL da solução de CaCl_2 0,1 M. Após incubação em gelo por 30 minutos, os tubos foram colocados a 42 °C por exatamente 40 segundos e recolocados em gelo por 5 minutos. Em seguida, acrescentaram-se 100 µL de meio LB e os tubos foram incubados a 37 °C durante 1 hora, sob agitação (200 rpm). O volume total da mistura foi semeado em placas de LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina ou 50 µg/mL de kanamicina (dependendo do plasmídeo utilizado) que foram incubadas a 37 °C durante a noite para seleção dos clones resistentes ao antibiótico.

3.4 Obtenção de DNA plasmidial em larga escala.

Para a produção de plasmídeos contendo as sequências das cadeias leve e pesada dos anticorpos híbridos recombinantes, colônias bacterianas foram inoculadas em 200 mL de meio LB/AMP e incubadas a 37 °C durante 16 horas, sob agitação constante. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o “QIAGEN Plasmid Maxi Kit” (QIAGEN) seguindo a orientação do fabricante. Brevemente, 200 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para tubos de 250 mL e centrifugados a 8.000 X g por 20 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e aos precipitados bacterianos acrescentou-se 10 mL do tampão P1 (contendo RNase A), seguindo homogeneização em “vortex”. Foram adicionados então 10 mL do tampão P2 e os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 5 minutos (com 6 a 8 inversões a cada 2 minutos). Após a adição de 10 mL do tampão P3 previamente gelado, os tubos foram invertidos por 8 vezes e incubados em gelo por 20 minutos. Seguiu-se centrifugação a 20.000 X g por 30 minutos a 4 °C e os sobrenadantes foram transferidos para colunas QIAGEN Tip-500 previamente equilibradas com 10 mL do tampão QBT. Os sobrenadantes foram despejados na coluna através de uma gaze colocada na abertura. Após a passagem do sobrenadante por

gravidade, as colunas foram lavadas duas vezes com 30 mL de tampão QC. A eluição foi feita diretamente em um tubo falcon de 50 mL utilizando-se 15 mL do tampão QF. O DNA plasmidial foi precipitado pela adição de 10,5 mL de isopropanol a temperatura ambiente. Os tubos foram então centrifugados a 8.000 X g por 45 minutos e lavados com 5 mL de etanol 70%. Os precipitados contendo DNA foram secos por 20-30 minutos a temperatura ambiente e ressuspensos em 400 µL de água MilliQ. A concentração foi determinada utilizando-se espectrofotômetro.

3.5 Produção de proteínas recombinantes.

Os plasmídeos pET14b-MSP-1₁₉ *P.vivax* (gentilmente cedido pela Dra. Irene da Silva Soares, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP), pET14b-MSP-1₁₉_PADRE *P.vivax* e pET28a-MSP-1₁₉ *P.yoelii* (gentilmente cedidos pelo Dr. Mauricio M. Rodrigues, UNIFESP) foram utilizados para transformar bactérias BL21DE3. Uma colônia foi cultivada a 37 °C sob agitação constante em frascos contendo LB ampicilina (100 µg/mL) ou kanamicina (50 µg/mL). Quando a preparação alcançou DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8, adicionou-se 0,01 mM de IPTG. A cultura foi então incubada a 37 °C por 4 horas sob agitação constante. As bactérias foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em tampão de sonicação (NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,0, NaCl 120 mM, PMSF 1 mM). A lise ocorreu no gelo com o auxílio de um sonicador (Branson Sonifier Ultrasonic Processor 450, USES). Três ciclos de sonicação foram aplicados consistindo de pulsos de 5 minutos com 5 minutos de intervalo na potência 45. O lisado bacteriano foi centrifugado a 18,000 X g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi incubado sob agitação com uma resina de Ni²⁺-NTA-Agarose (QIAGEN).

Após uma hora, a resina foi aplicada a uma coluna e lavada extensivamente com tampão de sonicação, seguido de tampão de lavagem (57 mM NaH₂PO₄, pH 6,0, 128 mM NaCl e 10% glicerina). As proteínas ligadas foram eluídas com tampão de lavagem contendo imidazol 0,5 M (Sigma) e dialisadas contra 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. Após centrifugação a 18,000 X g por

30 minutos a 4 °C e filtragem em membrana de 0.22 µm, as proteínas recombinantes MSP-1₁₉_P.vivax, MSP-1₁₉_PADRE_P.vivax e MSP-1₁₉_P.yoelii foram purificadas por cromatografia de troca iônica utilizando-se uma coluna Mono Q (Pharmacia) equilibrada com 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, acoplada a um sistema de FPLC (Pharmacia). As proteínas foram eluídas com um gradiente linear de 0-1 M de NaCl em tampão Tris-HCl. As frações eluídas foram analisadas em géis de SDS-PAGE e coradas com Coomassie Blue. As frações contendo as diferentes proteínas MSP-1₁₉ recombinantes foram dialisadas contra PBS, dosadas novamente e armazenadas a -20 °C.

3.6 Produção de anticorpos por transfecção de células HEK293T.

Foram utilizadas placas de 150 mM (Costar ou TPP) semeadas com 7,5x10⁶ células HEK293T (gentilmente cedidas pelo Dr. Armando Moraes Ventura) em meio DMEM, acrescido de 2 mM L-glutamina, 10 U/mL antibiótico-antimicótico, 1 mM piruvato de sódio e 5% de soro fetal bovino com baixa concentração de IgG (Invitrogen). Após dois dias em cultura (quando a confluência estava em torno de 70%), o meio das placas foi substituído por meio DMEM contendo os aditivos acima, sendo o soro fetal bovino substituído por 1% de nutridoma (Roche). Em seguida, as células foram transfectadas utilizando-se 10 µg de cada um dos plasmídeos que codificam para as cadeias leve e pesada dos anticorpos anti-DEC205, 33D1 ou Iso em fusão com as proteínas MSP-1₁₉_PADRE de *P. vivax* ou MSP-1₁₉ de *P. yoelii* na presença de polietilenimina (0,45 mg/mL, Sigma). Brevemente, os 10 µg de cada plasmídeo foram dissolvidos em 1 mL de uma solução de 150 mM de NaCl. Após curta agitação, 100 µL de uma solução de polietilenimina 0,45 mg/mL foram adicionados e a mistura foi submetida a agitação por 10 segundos, seguida de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. O volume final de 1,1 mL foi então adicionado a cada placa utilizado-se uma pipeta de 1mL. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% CO₂ por 7 dias.

3.7 Precipitação e purificação dos anticorpos híbridos.

Passados os 7 dias de incubação, os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados e centrifugados a 7.500 X g por 20 minutos para precipitação de debris celulares. As proteínas presentes foram então precipitadas adicionando-se $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ numa relação volume dos sobrenadantes: peso de 60% (ou seja, 1 L de sobrenadante para 600 g de sulfato de amônio). Os sobrenadantes foram então incubados sob lenta agitação a 4 °C por 16-20 horas. Seguiram-se então mais duas centrifugações a 10.000 X g por 45 minutos para coletar as proteínas precipitadas. Os precipitados foram ressuspensos em PBS (50 mL para cada 1 L de cultura inicial) e centrifugados novamente nas mesmas condições anteriores para remoção de qualquer partícula não dissolvida. O sobrenadante desta segunda centrifugação foi então colocado em membranas de diálise (Pierce) e dialisado contra 2 L de PBS gelado (para cada 50 mL de sobrenadante) por 16-20 horas. O volume removido da membrana de diálise foi incubado com esferas de proteína G (Amersham) na proporção de 1 mL de esferas para 50 mL de sobrenadante, sob rotação, a 4 °C por 16-20 horas. A suspensão foi então centrifugada a 800 X g por 5 minutos e as esferas contendo os anticorpos foram adicionadas a colunas de cromatografia (BioRad). Após duas lavagens contendo 5 mL de PBS gelado, a eluição foi realizada em alíquotas de 500 µL utilizando-se tampão glicina 0,1 M, pH 3,0. Para evitar a degradação dos anticorpos devido ao pH ácido, acrescentou-se a cada alíquota 50 µL de tampão Tris-HCl 1 M, pH 8,0.

A concentração de anticorpos em cada alíquota foi então estimada pelo método de Bradford (Amresco) e as alíquotas mais concentradas foram agrupadas e novamente dialisadas contra PBS gelado.

3.8 Ensaio para detecção de LPS.

Para dosagem de LPS nas amostras contendo os anticorpos híbridos, utilizou-se o kit QCL-1000 (Lonza). Brevemente, 5 µg de cada anticorpo quimérico foram diluídos em um volume final de 50 µL de água livre de pirógeno. Em seguida, cada amostra foi incubada a 37 °C. Após estabilização da temperatura, foram adicionados 50 µL de lisado de amebócitos de limulus. Após incubação a 37 °C por 10 minutos, foram adicionados 100 µL de uma solução cromógena, seguindo incubação por mais 6 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de ácido acético a 25%. As amostras foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nm. Uma curva contendo concentrações conhecidas de LPS (1, 0.5, 0.25 e 0.125 EU/mL) foi utilizada para auxiliar na quantificação de LPS nas amostras testadas.

3.9 Ensaio de ligação dos anticorpos híbridos a células CHO expressando os receptores DEC205 e DCIR2 de camundongo.

Os anticorpos purificados foram diluídos nas seguintes concentrações: 10, 1, 0,1 µg/ml. Estes anticorpos foram então incubados com 100.000 células CHO expressando constitutivamente os receptores DEC205 (CHO-DEC) ou DCIR2 (CHO-DCIR), gentilmente cedidas pelo Dr. Michel Nussenzweig (The Rockefeller University). Como controle negativo, as mesmas concentrações de anticorpos foram incubadas com células CHO que expressam o receptor DEC205 humano. Após 30 minutos de incubação, as células foram lavadas com tampão de FACS (PBS+2% soro fetal bovino) e incubadas com um anticorpo secundário anti-camundongo marcado com PE (Jackson Laboratories) na diluição de 1:2000. As amostras foram então lidas em citômetro de fluxo (FACS Calibur ou FACS Canto) e analisadas utilizando-se o software FlowJo (TreeStar).

3.10 Ensaios de imunização com os anticorpos híbridos monoclonais combinados a diferentes adjuvantes.

O protocolo de imunização foi realizado com a administração intraperitoneal de duas doses de cada anticorpo quimérico na presença de polyI:C (50 µg/animal) ou poly I:C mais anti-CD40 (25 µg/animal) ou ainda CpG ODN 1826 (25 µg/animal), com 45 dias de intervalo entre cada dose. A quantidade de anticorpos administrada em cada dose variou e está indicada nas legendas das figuras apresentadas na seção de resultados. A análise da resposta imune celular ocorreu entre 45-60 dias após a administração da segunda dose. Para análise da resposta imune humoral, os animais foram sangrados 5 dias antes e 14 dias após a administração da segunda dose.

3.11 Ensaio de ELISA.

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

a) Preparo dos Soros:

Foi coletado sangue dos camundongos 5 dias antes ou 14 dias após a administração da segunda dose. Após duas horas de incubação a temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 10.000 X g por 5 minutos à temperatura ambiente. Os soros foram então separados e armazenados em tubos eppendorf de 1,5 mL a -20 °C.

b) Sensibilização das Placas:

Foram utilizadas placas de ELISA ("High binding", Costar). A cada poço foram adicionados 100 ng da proteína MSP-1₁₉ de *P. vivax* ou 250 ng da proteína MSP-1₁₉ de *P. yoelii* diluídas em PBS 1X. As placas foram então deixadas à temperatura ambiente por 16-18 horas e posteriormente lavadas três vezes com a solução de PBS-Tween20 0,02% (PBS-T0,02).

c) Diluição dos Soros e Reação Imunoenzimática:

Cada poço foi então bloqueado com 150 µL de uma solução de bloqueio (PBS-T0,02+ leite 5%+ BSA 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram incubadas por 2 horas com 100 µL dos soros (diluídos em PBS-T0,2+ leite 5%+ BSA 0,25%) em diluições seriadas (fator de diluição 3). O conteúdo dos poços foi desprezado e as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T0,02. O anticorpo secundário contendo anti-IgG de camundongo ligada a peroxidase (Jackson Laboratories) diluído em PBS-T0,02+ leite 5%+ BSA 0,25% na proporção de 1:10.000 foi adicionado e incubado por mais 2 horas à temperatura ambiente (50 µL/poço). Após mais três lavagens com PBS-T0,02, cada poço recebeu 100 µL do substrato preparado da seguinte maneira: 10 mg de OPD (Sigma) dissolvidos em 10 mL de uma solução contendo fosfato de sódio 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M (pH 4,7) acrescido de 10 µL de H₂O₂ 30%. Depois de 15 minutos, a reação foi interrompida com 50 µL de uma solução de H₂SO₄ 4 N. As placas foram lidas em leitor BioTek ELx800 (Biotek) em comprimento de onda de 595 nM. Os títulos foram calculados como o logaritmo ($\log_{10}$) considerando-se a diluição em que a DO₅₉₅ estivesse maior que 0,1.

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

Para a tipagem, a única modificação feita foi a utilização de anticorpos anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c ou IgG3 conjugados com peroxidase (Southern Biotech) diluídos 1:2.000, como anticorpos secundários.

3.13 Ensaio de ELISPOT.

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

anticorpo monoclonal foi removida em ambiente estéril e as placas foram então lavadas 3 vezes com tampão estéril. As placas foram bloqueadas pela incubação dos poços com 200 µL de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino por, pelo menos, 2 horas a 37 °C.

As células respondedoras foram obtidas dos baços de 2-3 camundongos imunizados com os diferentes anticorpos híbridos ou controles. As hemácias foram lisadas na presença do tampão ACK (EDTA 0,1mM, NH₄Cl 0,15 mM, KHCO₃ 1 mM). As células foram então lavadas 3 vezes com meio RPMI, ressuspensas em meio RPMI completo contendo 10% de soro fetal bovino (R10) e 30 U de IL-2 humana recombinante e diluídas para uma concentração de 1 a 1,5 X 10⁶ células/mL.

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

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

Após o isolamento, as células respondedoras foram plaqueadas em uma concentração de 1×10^6 células/poço e incubadas com os antígenos específicos, em meio R10 contendo 2 $\mu\text{g/mL}$ do anticorpo agonista αCD28 . Alguns poços foram incubados com 1 $\mu\text{g/mL}$ de αCD3 como controle positivo. Após uma hora de incubação, cada poço recebeu 0,5 μL de Golgi Plug (Brefeldina A, BD Pharmingen) e as placas foram incubadas por mais 12-16 horas. Após este período, as placas foram centrifugadas por 5 minutos a 1000 X g e os sobrenadantes foram descartados por inversão. Acrescentou-se 150 μL de tampão de FACS e as triplicatas foram combinadas em um único poço. Seguiu-se incubação com os seguintes anticorpos para marcação extracelular: anti-CD4-PerCP-Cy5.5 e anti-CD8-PE-Cy7 por 45 minutos em tampão FACS no gelo. Após esse período, as células foram lavadas 3 vezes com tampão FACS e ressuspensas em 200 μL de PharmingenStain buffer (BD Pharmingen) seguida por mais uma centrifugação, posteriormente adicionando-se 100 μL /poço de Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen). As células foram ressuspensas e incubadas por 15 minutos no gelo. Após esse período, as placas foram centrifugadas e lavadas por 3 vezes com tampão Permwash (BD Pharmingen). As células foram então incubadas com os seguintes anticorpos para marcação intracelular: anti-CD3-APC-Cy7, anti-IL2-FITC, anti-TNF α -PE e anti-INF γ -APC por 45 minutos no gelo. Após mais 3 lavagens com tampão Permwash, as células foram ressuspensas em tampão de FACS e lidas no citômetro FACS Canto (BD). Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos da BD Pharmingen.

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

Os baços dos camundongos foram coletados e processados como descrito no item 3.13. Após a lise das hemácias e contagem das células,

retirou-se o volume correspondente 50×10^6 células e as mesmas foram colocadas em um volume final de 1 mL. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em PBS previamente aquecido a 37 °C contendo o corante CFDA na concentração de final de 1,25 μ M (Vybrant CFDA SE – Cell Tracer Kit, Molecular Probes). As células foram então incubadas a 37 °C por 10 minutos em banho-maria e agitadas a cada 2 minutos para se obter uma marcação homogênea. Após esse período, as células foram centrifugadas a 1000 X g por 5 minutos e lavadas por 3 vezes com o dobro do volume usado na marcação. Finalmente, as células foram ressuspensas em 1 mL de R10 e contadas novamente. Cada poço recebeu 3×10^5 células. As placas foram então incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ por 5 dias. Após este período, as placas foram centrifugadas, lavadas em tampão FACS e as triplicatas foram combinadas em um único poço. A marcação fenotípica foi feita com os seguintes anticorpos: anti-CD4-PerCP-Cy5.5, anti-CD8-PE-Cy7 e anti-CD3-APC-Cy7 por 45 minutos em tampão FACS e no gelo. As placas foram lavadas por 3 vezes com tampão FACS e as amostras lidas no citômetro FACS Canto.

3.16 Análise da resposta imune celular através de proliferação medida pela incorporação de Timidina.

Os baços dos camundongos foram coletados e processados como descrito no item 3.13. Após a lise das hemácias e contagem das células, retirou-se o volume correspondente 5×10^5 células e as mesmas foram colocadas em um volume final de 1 mL de meio completo por baço de camundongo. Cada poço recebeu 3×10^5 células. As placas foram então incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ por 5 dias, sendo pulsadas com Timidina H³⁺ possuindo 0,5 μ Ci de atividade radioativa por poço com $\pm$ 96 horas de cultura, ficando mais 48 horas em incubadas. Após este período as células crescidas em cultura foram recolhidas em membranas Printed Filtermat A (Glass Fiber Filter size 90x120 mM) nº cat.1450-421, seladas em sample bag 1450-432 com 5 mL de Betaplate Scintillation liquid nº cat.1205-440 e submetidas a contagem de radiação emitida por incorporação de timidina.no equipamento

Microbeta Trilux 1450 LSC & Luminescence Counter e os resultados obtidos foram calculados dividindo-se o número de contagens obtidas nos poços que receberam estímulo por poços que não receberam nenhum estímulo, sendo esse ensaio realizado em triplicata.

3.17 Análise estatística.

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

4 Resultados

4.1 Produção dos anticorpos híbridos em fusão com as proteínas MSP-1₁₉ de *Plasmodium yoelii* e MSP-1₁₉_PADRE de *Plasmodium vivax*.

Os genes da MSP-1₁₉ de *P. yoelii* (Py) e MSP-1₁₉_PADRE de *P. vivax* (Pv) foram clonados pela Prof. Dra. Silvia B. Boscardin nos vetores de expressão contendo as cadeias pesadas dos anticorpos anti-DEC205, 33D1 e isotipo controle (Iso). A produção dos anticorpos híbridos foi realizada por transfecção transiente conforme descrito na seção “Material e Métodos” (itens 3.6 e 3.7). Desta forma, geramos diferentes anticorpos híbridos contendo as porções variáveis dos anticorpos anti-DEC205, 33D1 e Iso fusionados com as porções constantes da imunoglobulina IgG1 de camundongo e, em seguida, com nossos antígenos de interesse (para detalhes da geração dos plasmídeos contendo as cadeias leve e pesada dos anticorpos, ver (15)).

A figura 4 mostra um SDS-PAGE em condições redutoras contendo os anticorpos híbridos anti-DEC-MSP-1₁₉ Py e Iso-MSP-1₁₉Py (Figura 4A) e os anticorpos anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE Pv, 33D1-MSP-1₁₉_PADRE Pv e Iso-MSP-1₁₉_PADRE Pv (Figura 4B). Duas cadeias (uma pesada e uma leve) podem ser visualizadas. As cadeias pesadas variam de tamanho de acordo com o peso molecular da proteína inserida em fusão. Já as cadeias leves giram em torno de 25kDa (figura 4 A e B). Como controles, corremos também na figura 4A o anticorpo anti-DEC205 sem qualquer inserção e o anticorpo anti-DEC-CS que contém a proteína circunsporozoita de *Plasmodium falciparum*. Encontramos problemas apenas com a purificação do anticorpo 33D1-MSP-1₁₉ Py que aparece degradado ao final de cada transfecção (dados não mostrados). Desta forma, este último anticorpo não foi utilizado em nossos protocolos de imunização.

Figura 4- Produção dos anticorpos híbridos anti-DEC, 33D1 e Iso em fusão com as proteínas MSP-1₁₉ de *Plasmodium yoelii* e MSP-1₁₉_PADRE de *Plasmodium vivax*.

SDS-PAGE em condições redutoras dos anticorpos purificados a partir de sobrenadantes de culturas transfectadas com os plasmídeos contendo as cadeias pesada e leve de cada anticorpo. Os pesos moleculares estão indicados à esquerda em kDa e a concentração do gel A é 4-12% e a do gel B de 12%. O gel A ainda contém o anticorpo anti-DEC original de rato e o anticorpo anti-DEC-CS como controles, enquanto que o gel B contém o anticorpo anti-DEC-CS.

4.2 Ensaio de ligação dos anticorpos híbridos a células CHO expressando os receptores DEC205 e DCIR2.

Após sua purificação, cada um dos anticorpos foi dosado pelo ensaio de Bradford, testado para contaminação com LPS (os níveis de LPS detectados foram menores do que 0,125 EU/mL, dados não mostrados) e submetido a um ensaio de ligação a células CHO expressando os receptores DEC205 e DCIR2 de camundongo e também DEC205 humano como controle negativo (figuras 5 e 6). Incubamos as células com três diferentes concentrações de cada anticorpo: 10, 1 e 0,1 µg/mL. A figura 5 mostra a ligação dos anticorpos

híbridos contendo a proteína MSP-1₁₉ de *P. yoelii*. O anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉ Py ligou-se ao receptor DEC205 de camundongo (figura 5B). Para nossa surpresa, o anticorpo quimérico contendo o isotipo controle (Iso-MSP-1₁₉ Py) apresentou algum grau de ligação a todas as células analisadas (figura 5 D-F).

Figura 5- Ensaio de ligação dos anticorpos híbridos anti-DEC-MSP-1₁₉ *P.yoelii* e Iso-MSP-1₁₉ *P.yoelii* a células CHO expressando os receptores DEC205 e DCIR2 de camundongo e DEC205 humano.

Cem mil células CHO expressando os diferentes receptores foram incubadas com 10, 0,1 e 0,1 µg/mL dos diferentes anticorpos híbridos por 30 minutos e posteriormente incubadas na presença de anti-IgG de camundongo marcada com PE. Trinta mil eventos foram adquiridos utilizando-se o citômetro FACSCalibur. A análise foi feita utilizando-se o software FlowJo (TreeStar).

O ensaio de ligação a células CHO-DEC e CHO-DCIR2 mostrou que o anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE_Pv liga-se especificamente ao receptor DEC de camundongo (figura 6B) enquanto que o 33D1-MSP-1₁₉_PADRE_Pv liga-se ao receptor DCIR2 (figura 6I). No entanto, resultado semelhante ao obtido com o anticorpo Iso-MSP-1₁₉ Py foi obtido quando utilizamos o anticorpo Iso-MSP-1₁₉_PADRE_Pv (figura 6E), ou seja, observamos alguma ligação do isotipo controle a um componente celular. No entanto, este efeito parece ser menos pronunciado do que aquele visto na figura 5. Decidimos prosseguir com

as imunizações e observar se esta ligação inespecífica teria algum efeito *in vivo*.

Figura 6- Ensaio de ligação dos anticorpos híbridos anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE_Pv, Iso-MSP-1₁₉_PADRE_Pv e 33D1-MSP-1₁₉_PADRE_Pv a células CHO expressando os receptores DEC205 e DCIR2 de camundongo e DEC205 humano.

A análise foi feita como descrito na figura 5.

4.3 Imunização de camundongos C57BL/6 com os anticorpos híbridos contendo a proteína MSP-1₁₉ de *Plasmodium yoelii*.

Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados com 5 µg dos anticorpos anti-DEC-MSP-1₁₉ Py ou Iso-MSP-1₁₉ Py na presença de 25 µg de anti-CD40 e 50 µg de poly I:C como adjuvantes. Como controle negativo, um grupo de animais foi imunizado somente com os adjuvantes. Trinta dias após a administração da primeira dose, os animais receberam uma dose de reforço contendo 5 µg de cada anticorpo em presença de poly I:C somente. Para nossa surpresa, fomos incapazes de detectar anticorpos 14 dias após a administração

da dose de reforço (dados não mostrados). Por outro lado, quando a resposta imune celular foi avaliada pela produção de $\text{INF-}\gamma$ por ELISPOT, detectamos uma resposta específica e dose dependente contra a proteína recombinante $\text{MSP-1}_{19}\text{Py}$ produzida em bactérias (figura 7).

Figura 7- Imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉ de *P.yoelii* induz a produção de $\text{INF-}\gamma$.

Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados com os anticorpos anti-DEC-MSP-1₁₉ de *P.yoelii* ou Iso-MSP-1₁₉ de *P.yoelii* na presença de 25 μg de anti-CD40 e 50 μg de poly I: C ou somente com os adjuvantes. Trinta dias após a administração da primeira dose, os animais receberam um reforço com a mesma quantidade de anticorpo, porém na presença de poly I:C somente. A resposta imune celular foi avaliada por ELISPOT cinquenta dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 10, 1 e 0,1 μg/mL da proteína recombinante MSP-1_{19} de *P.yoelii*. O gráfico mostra o número de células produtoras de $\text{INF-}\gamma$ por milhão de células totais descontando-se o número de spots formados na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam média $\pm$ desvio padrão.

A administração de 1 dose do anticorpo quimérico anti-DEC205 contendo a proteína $\text{MSP-1}_{19}\text{Py}$ na presença de anti-CD40 e poly I:C seguida

de outra administrada somente na presença de poly I:C foi incapaz de induzir uma resposta imune humoral detectável contra a proteína MSP-1₁₉ Py recombinante, apesar da resposta imune celular detectada por ELISPOT. Decidimos então imunizar outro grupo de animais com 3 doses do anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉ Py, mas somente na presença de poly I:C. Como controle utilizamos a proteína MSP-1₁₉ Py recombinante administrada nas mesmas condições. A figura 8 mostra os títulos de anticorpos após a administração de cada uma das doses. Como podemos observar, após a 3^a dose, 3 de 5 animais imunizados com o anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉ Py (símbolos pretos) passaram a apresentar títulos de anticorpos anti-MSP-1₁₉. Por outro lado, detectamos anticorpos anti-MSP-1₁₉ em somente um animal imunizado com a proteína recombinante. Concluímos que o direcionamento da MSP-1₁₉ Py para as DCs é capaz de induzir uma resposta de anticorpos anti-MSP-1₁₉ somente após a administração de uma 3^a dose.

Figura 8- Imunização com o anticorpo quimérico anti-DEC-MSP-1₁₉ de *Plasmodium yoelii* induz produção de anticorpos no soro dos animais imunizados.

Camundongos C57BL/6 foram imunizados com 5µg do anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉ ou com 0,7 µg da proteína MSP-1₁₉Py recombinante (quantidade de proteína equivalente ao número de moléculas de MSP-1₁₉ presentes em 5µg do anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉), na presença de 50µg de polyI:C. Cada animal recebeu 3 doses com intervalo de 30 dias. Quatorze dias após a administração de cada dose, os animais foram sangrados e um ensaio de ELISA foi realizado com seus soros e com a proteína MSP-1₁₉Py recombinante adsorvida na placa. O gráfico mostra o título de anticorpos em escala logarítmica de cada animal. As médias de cada grupo também estão representadas.

Decidimos então desafiar os animais imunizados com hemácias infectadas com *Plasmodium yoelii* (cepa 17XL). Os níveis de parasitemia foram monitorados nos dias 3, 4, 5, 6 e 13 após o desafio. Não observamos nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos (figura 9). Com base nos resultados obtidos até agora, podemos concluir que os anticorpos gerados nos animais imunizados com o anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉ Py e que reconhecem a proteína recombinante são incapazes de proteger os animais contra desafio. Este fato pode ter ocorrido devido ao baixo título de anticorpos observado nestes animais; porém maiores estudos serão necessários para que possamos confirmar ou descartar esta possibilidade.

Figura 9- Anticorpos anti-MSP1₁₉ gerados após imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP1₁₉Py são incapazes de conferir proteção ao desafio com *P. yoelii*.

Camundongos C57BL/6 imunizados como descrito na figura 8 foram desafiados com 10⁶ hemácias infectadas com *P. yoelii* cepa 17XL. A parasitemia foi determinada em diferentes dias contando-se o número de hemácias infectadas em um total de 100 hemácias. Os dados estão apresentados como a média das porcentagens de hemácias infectadas ± desvio padrão de 5 animais/grupo.

4.4 Imunização de camundongos C57BL/6 com os anticorpos híbridos contendo a proteína MSP-1₁₉_PADRE de *Plasmodium vivax* na presença de anti-CD40+poly I:C.

Nossa inabilidade em detectar uma resposta imune humoral contra a MSP-1₁₉ de *P. yoelii* pode ter sido devida à baixa imunogenicidade desta proteína. De fato, esta MSP-1₁₉ parece ser a menos imunogênica de todas as proteínas MSP-1₁₉ (Dr. Mauricio M. Rodrigues, comunicação pessoal). A proteína MSP-1₁₉ de *P. vivax* é mais imunogênica, tendo sido utilizada com sucesso em vários protocolos de imunização (103, 109). Com o intuito de aumentar mais a imunogenicidade desta proteína, decidimos incluir um epítipo promíscuo para diferentes moléculas de HLA DR humana (chamado de PADRE), mas que também é reconhecido pelo MHC de camundongos C57BL/6 (109).

Grupos de camundongos foram imunizados com duas doses dos anticorpos híbridos contendo a MSP-1₁₉_PADRE_Pv na presença dos estímulos de anti-CD40 e poly I:C, conforme foi feito com os anticorpos contendo a MSP-1₁₉ Py. Como podemos observar na figura 10, houve diferença entre os títulos de anticorpos gerados antes e após a administração da segunda dose. Quando comparamos os títulos de anticorpos induzidos nos animais imunizados com anti-DEC, 33D1 e Iso, observamos diferenças estatísticas entre os animais imunizados com o anticorpo anti-DEC (círculos pretos) e Iso (quadrados pretos). Concluimos então que o direcionamento do antígeno para as DCs DEC205⁺ na presença de anti-CD40 e poly I:C é capaz de induzir uma resposta humoral superior àquela induzida nos animais imunizados com o isotipo controle.

Figura 10- Imunização com os anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da MSP-1₁₉_PADRE_Pv na presença de adjuvantes fortes é capaz de induzir anticorpos específicos contra a proteína MSP-1₁₉ de *P.vivax* em camundongos C57BL/6.

Grupos de camundongos foram imunizados com 5 µg dos anticorpos híbridos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados a MSP-1₁₉_PADRE_Pv na presença de 25 µg de anti-CD40 e 50 µg de poly I:C ou somente com os adjuvantes. Quarenta e cinco dias depois após da administração da primeira dose, os animais receberam um reforço com a mesma quantidade de anticorpo, porém na presença de poly I:C somente. A quantidade de anticorpos anti-MSP-1₁₉ foi analisada por ELISA 5 dias antes (símbolos sem preenchimento) e 14 dias após dias (símbolos preenchidos) a administração da dose de reforço. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizados em escala log₁₀ e os animais estão representados individualmente. As barras horizontais representam a média de cada grupo. *** p<0,05.

Para entender esses resultados, decidimos analisar as subclasses de imunoglobulinas G geradas pelas diferentes imunizações. Como podemos ver na figura 11, fomos capazes de detectar IgG1, IgG2c, IgG2b e IgG3 em todos os grupos analisados. A razão IgG1/IgG2c indica que a imunização de todos os grupos foi capaz de induzir uma resposta mista com indução tanto de IgG1 quanto de IgG2c.

Figura 11- Imunização com os anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da MSP-1₁₉_PADRE_Pv na presença de adjuvantes fortes é capaz de induzir anticorpos de todas as subclasses de IgG.

Grupos de camundongos foram imunizados como descrito na figura 10. As subclasses de IgGs foram determinadas 14 dias após a administração do reforço utilizando-se anticorpos específicos para cada subclasse. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizado em escala $\log_{10}$. As médias $\pm$ desvios padrão estão representadas para cada subclasse e cada grupo. Os números dentro das caixas indicam a proporção IgG1/IgG2c.

A análise da resposta imune celular foi feita através da detecção de proliferação por incorporação de timidina tritiada (figura 12). Observamos forte resposta proliferativa tanto nos esplenócitos dos animais imunizados com anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE_Pv quanto nos esplenócitos dos animais imunizados com 33D1-MSP-1₁₉_PADRE_Pv. Esta resposta mostrou-se dose dependente sendo diminuída com a diluição da proteína recombinante MSP-1₁₉_PADRE_Pv (comparar as barras pretas, brancas e hachuradas). Em contraste, células de baço dos animais imunizados com o isotipo controle apresentaram uma menor capacidade proliferativa.

Figura 12- Imunização de camundongos induz a linfoproliferação por incorporação de timidina.

Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados conforme descrito na figura 10. A resposta imune celular foi avaliada pela incorporação de timidina $\pm$ 60 dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 10, 1 e 0,1 μ g/mL da proteína recombinante MSP-1₁₉_PADRE_Pv. O índice de estimulação foi calculado dividindo-se o número de contagens obtidas nos poços que estimulados com a proteína recombinante pelo número de contagens nos poços que não receberam nenhum estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam média $\pm$ desvio padrão.

Estes resultados nos levam a concluir que o direcionamento de antígenos para diferentes subpopulações de DCs, utilizando tanto o anticorpo anti-DEC quanto o 33D1 e na presença de anti-CD40 e poly I:C, é capaz de induzir forte resposta imune celular.

4.5 Imunização de camundongos BALB/c com os anticorpos híbridos contendo a proteína MSP-1₁₉_PADRE de *Plasmodium vivax* na presença de anti-CD40+poly I:C.

Além da imunização de camundongos C57BL/6, também realizamos experimentos com camundongos BALB/c. As células desses animais não são capazes de reconhecer o peptídeo PADRE. Desta forma, fomos também capazes de avaliar a resposta imune humoral e celular na ausência deste epítipo.

A figura 13 mostra os títulos de anticorpos obtidos nos grupos de camundongos imunizados com os três anticorpos híbridos também em presença de anti-CD40 e poly I:C.

Figura 13- Imunização com os anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da MSP-1₁₉_PADRE_Pv na presença de adjuvantes fortes é capaz de induzir anticorpos específicos contra a proteína MSP-1₁₉ de *P.vivax* em camundongo BALB/c.

Grupos de camundongos foram imunizados com 5µg dos anticorpos híbridos anti-DEC, 33D1 ou Iso na presença de 25 µg de anti-CD40 e 50 µg de poly I:C ou somente com os adjuvantes. Quarenta e cinco dias depois após da administração da primeira dose, os animais receberam um reforço com a mesma quantidade de anticorpo porém na presença de poly I:C. A quantidade de anticorpos anti-MSP1₁₉ *P.vivax* foi analisada por ELISA 5 dias antes (símbolos sem preenchimento) e 14 dias após dias (símbolos preenchidos) a administração da dose de reforço. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizados em escala log₁₀ e os animais estão representados individualmente. As barras horizontais representam a média de cada grupo. * p< 0,05 e *** p< 0,001.

Podemos observar que, na ausência da influência do epítipo PADRE, o direcionamento dos antígenos para as células DEC205⁺ é mais eficiente em induzir uma resposta anti-MSP-1₁₉, pois observamos uma diferença estatística maior comparando os grupos imunizados com anti-DEC e Iso (figura 13, comparar círculos e quadrados pretos). Da mesma forma que a observada para os animais C57BL/6, a resposta imune humoral aumentou consideravelmente (cerca de 100x) após a administração da segunda dose (comparar símbolos brancos e pretos).

Figura 14- Imunização com os anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da MSP-1₁₉_PADRE_Pv na presença de adjuvantes fortes é capaz de induzir anticorpos de todas as subclasses de IgGs contra a proteína MSP-1₁₉ de *P.vivax* em camundongos BALB/c.

Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados como descrito na figura 13. As subclasses de IgGs foram determinadas 14 dias após a administração do reforço utilizando-se anticorpos específicos para cada subclasse. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizado em escala log₁₀. As médias ± desvios padrão estão representadas para cada subclasse e cada grupo.

Da mesma forma que observado para animais C57BL/6, a imunização de camundongos BALB/c com os diferentes anticorpos híbridos foi capaz de induzir a produção de todas as subclasses de IgGs (figura 14). No entanto, ao contrário do que observamos nos animais C57BL/6, no caso dos BALB/c, a relação IgG1/IgG2a foi maior nos animais imunizados com o anticorpo 33D1-MSP-1₁₉_PADRE_Pv.

A análise da resposta imune celular foi feita por ELISPOT para detecção de células produtoras de INF- γ . Como podemos observar na figura 15, fomos capazes de detectar células produtoras de INF- γ tanto nos animais imunizados com anti-DEC quanto com 33D1-MSP-1₁₉_PADRE_Pv.

Figura 15- Imunização com os anticorpos anti-DEC ou 33D1-MSP-1₁₉_PADRE induz a produção de INF- γ .

Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com os anticorpos anti-DEC, 33D1 e Iso-MSP-1₁₉_PADRE como descrito na figura 13. A resposta imune celular foi avaliada por ELISPOT $\pm$ trinta dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 10, 1 e 0,1 μ g/mL da proteína recombinante MSP-1₁₉ *P.vivax* da proteína recombinante O gráfico mostra o número de células produtoras de INF- γ por milhão de células totais descontando-se o número de spots formados na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam médias $\pm$ desvio padrão.

No entanto, esta resposta não foi muito forte e detectamos ainda uma resposta inespecífica expressiva quando os esplenócitos dos animais imunizados somente com os adjuvantes foram incubados com 10 µg/mL da proteína MSP-1₁₉_PADRE_Pv. Esta resposta é provavelmente contra outro epítopo presente na proteína MSP-1₁₉ pois o epítopo PADRE não deveria ser reconhecido pelo haplótipo H2^d de camundongos BALB/c.

Concluimos que a imunização de camundongos BALB/c com os anticorpos híbridos é capaz de induzir resposta imune humoral em todos os grupos imunizados sendo, no entanto, maior nos animais imunizados com o anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE_Pv. No caso da resposta imune celular, detectamos resposta uma resposta superior ao controle tanto nos animais imunizados com anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE_Pv quanto com 33D1-MSP-1₁₉_PADRE_Pv quando usamos 10 µg/mL da proteína MSP-1₁₉_PADRE_Pv na cultura.

4.6 Imunização de camundongos C57BL/6 com os anticorpos híbridos contendo a proteína MSP-1₁₉_PADRE de *Plasmodium vivax* na presença de poly I:C.

Em seguida, decidimos utilizar somente o adjuvante poly I:C em nossos protocolos de imunização. Esta atitude justifica-se frente ao fato que a utilização de um anticorpo anti-CD40 não foi aprovada para uso em humanos. Além disso, um derivado do poly I:C (poly ICLC, ver www.clinicaltrials.gov, identificador NCT01127) já está sendo utilizado em ensaios clínicos de fase 1 em associação com um anticorpo quimérico anti-DEC contendo a proteína Gag do vírus HIV.

Desta forma, imunizamos grupos de camundongos C57BL/6 com os diferentes anticorpos híbridos na presença de poly I:C. O esquema de imunização foi idêntico ao utilizado nos protocolos descritos nas seções anteriores.

Figura 16- Imunização com os anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da proteína MSP-1₁₉_PADRE de *P.vivax* na presença de poly I:C induz altos títulos de anticorpos anti-MSP-1₁₉ em camundongos C57BL/6.

Grupos de camundongos foram imunizados com 5 µg dos anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da proteína MSP-1₁₉_PADRE na presença de 50 µg de poly I:C ou somente com poly I:C. Quarenta e cinco dias após a administração da primeira dose, os animais receberam um reforço com a mesma quantidade da primeira dose. A quantidade de anticorpos anti-MSP-1₁₉ foi analisada por ELISA 5 dias antes (símbolos sem preenchimento) e 14 dias após a administração da dose de reforço. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizados em escala log₁₀ e os animais estão representados individualmente. As barras horizontais representam a média de cada grupo. *** p < 0,05.

Para nossa surpresa, a imunização dos camundongos C57BL/6 com todos os anticorpos híbridos levou à produção de elevados títulos de anticorpos anti-MSP-1₁₉ após a segunda dose, quando administrados na presença de poly I:C (figura 16). Não houve diferença estatística significativa entre nenhum dos grupos após a administração da segunda dose (figura 16, símbolos pretos).

Em seguida, analisamos as subclasses de imunoglobulinas IgG e detectamos principalmente IgG1, IgG2b e IgG2c (figura 17). Interessantemente, na ausência de anti-CD40, não detectamos IgG3 nos grupos imunizados com anti-DEC ou 33D1-MSP-1₁₉_PADRE_Pv. A análise da razão IgG1/IgG2c revelou uma resposta mista com elevados títulos tanto de IgG1 quanto de IgG2c (figura 17, ver valores acima dos gráficos).

Podemos concluir então que, na presença de poly I:C, o direcionamento do antígeno para as diferentes subpopulações de DCs não melhora a resposta imune humoral pois títulos semelhantes foram obtidos na presença (anti-DEC ou 33D1) ou ausência (Iso) de direcionamento.

Figura 17- Imunização com os anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da proteína MSP-119_PADRE_Pv na presença de poly I:C induz principalmente anticorpos das subclasses IgG1, IgG2c e IgG2b contra a proteína MSP-119 de *P.vivax* em camundongos C57BL/6.

Grupos de camundongos foram imunizados como descrito na figura 16. As subclasses de IgGs foram determinadas 14 dias após a administração do reforço utilizando-se anticorpos específicos para cada subclasse. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizado em escala log10. As médias $\pm$ desvios padrão estão representadas para cada subclasse e cada grupo.

Resultados bastante interessantes foram obtidos quando analisamos a resposta imune celular induzida nos diferentes grupos. Esta análise foi feita por duas técnicas: detecção de células produtoras de INF- γ por ELISPOT e proliferação celular analisada por diluição do corante CFSE (figuras 18 e 19, respectivamente).

A figura 18 mostra o número de células produtoras de INF- γ nos diferentes grupos de animais imunizados que responderam contra as proteínas MSP-1₁₉_PADRE ou MSP-1₁₉ recombinantes. A primeira informação interessante que obtemos analisando o gráfico é que a resposta imune celular parece ser direcionada contra o peptídeo PADRE pois não observamos um número muito elevado de células produtoras de INF- γ quando os esplenócitos dos animais foram estimulados com diferentes doses da proteína MSP-1₁₉ recombinante (ver barras cinzas) e a baixa resposta observada parece ser inespecífica (vista no grupo que recebeu somente poly I:C). Além disso, detectamos um número de células produtoras de INF- γ bastante reduzido nos animais imunizados com o anticorpo 33D1-MSP-1₁₉_PADRE. Por outro lado, a imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE_*Pv* induziu o maior número de células produtoras de INF- γ , sendo cerca de 3x maior que o número de células induzido pela imunização com o isotipo controle.

Figura 18- Imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE induz maior número de células produtoras de INF- γ quando comparada a imunização com o anticorpo 33D1_MSP-1₁₉_PADRE.

Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados com os anticorpos anti-DEC, 33D1 e Iso-MSP-1₁₉_PADRE de *P. vivax* como descrito na figura 16. A resposta imune celular foi avaliada por ELISPOT $\pm$ trinta dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 10, 1 e 0,1 μ g/mL das proteínas recombinantes MSP-1₁₉-PADRE e MSP-1₁₉ *P.vivax*. O gráfico mostra o número de células produtoras de INF- γ por milhão de células totais descontando-se o número de spots formados na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam média $\pm$ desvio padrão.

Além da análise do número de células produtoras de INF- γ , analisamos ainda a capacidade proliferativa dos linfócitos T CD4⁺ estimulados com as duas proteínas recombinantes. Como mostra a figura 19, os animais imunizados com o anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE_Pv apresentaram maior resposta proliferativa contra a proteína MSP-1₁₉_PADRE recombinante. No entanto, detectamos também proliferação contra a proteína MSP-1₁₉ (comparar barras pretas com barras cinzas). Já a proliferação detectada no grupo que recebeu o anticorpo quimérico 33D1-MSP-1₁₉_PADRE foi cerca de 2,5-5x menor.

Figura 19- Imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE_Pv induz maior proliferação de células T CD4⁺ quando comparada a imunização com o anticorpo 33D1_MSP1₁₉_PADRE.

Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados como descrito na figura 16. A resposta imune celular foi avaliada por proliferação com diluição de CFSE 40 dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 10, 1 e 0,1 µg/mL das proteínas recombinantes MSP-1₁₉_PADRE ou MSP-1₁₉ *P.vivax*. O gráfico mostra a porcentagem de células CD3⁺CD4⁺ que perderam CFSE (CFSElow).

Desta forma, concluímos que o direcionamento de antígenos para as células DEC205⁺ na presença de poly I:C é mais eficiente do que seu direcionamento para as DCs DCIR2⁺. Além disso, a maior parte da resposta parece estar direcionada contra o epítipo PADRE.

4.7 Imunização de camundongos BALB/c com os anticorpos híbridos contendo a proteína MSP-1₁₉_PADRE de *Plasmodium vivax* na presença de poly I:C.

Repetimos o experimento descrito na seção anterior utilizando camundongos BALB/c. Para nossa surpresa, e ao contrário do que tínhamos visto até o momento, a imunização de camundongos BALB/c com os anticorpos anti-DEC ou 33D1-MSP-1₁₉_PADRE_Pv induziu uma resposta de anticorpos anti-MSP-1₁₉ 100x maior do que a observada nos animais imunizados com o isotipo controle (figura 20, comparar círculos e triângulos pretos com quadrados pretos). Este resultado nos leva a concluir que no caso da resposta imune humoral, o direcionamento do antígeno para as DCs DEC⁺ e DCIR2⁺ confere vantagem quando o epítipo PADRE não é funcional e se os anticorpos forem administrados na ausência de anti-CD40. Quando o mesmo é funcional (em camundongos C57BL/6), os títulos de anticorpos anti-MSP-1₁₉ são parecidos entre os grupos imunizados com α DEC, 33D1 ou Iso-MSP-1₁₉_PADRE_Pv.

Figura 20- Resposta imune anti-MSP-1₁₉ é dependente do direcionamento do antígeno para as células DEC⁺ ou DCIR2⁺ em camundongos BALB/c.

Grupos de camundongos foram imunizados com 5 μ g dos anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da proteína MSP-1₁₉_PADRE-Pv na presença de 50 μ g de poly I:C ou somente com o adjuvante. Quarenta e cinco dias depois da administração da primeira dose, os animais receberam uma dose de reforço. A produção de anticorpos anti-MSP-1₁₉ foi analisada por ELISA 5 dias antes (símbolos sem preenchimento) e 14 dias após dias (símbolos preenchidos) a administração da dose de reforço. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizados em escala log₁₀ e os animais estão representados individualmente. As barras horizontais representam a média de cada grupo.

A análise das subclasses de IgGs mostrou também uma resposta mista com um predomínio da subclasse IgG1 (figura 21).

Figura 21- Imunização com os anticorpos anti-DEC ou 33D1 fusionados à sequência da MSP-1₁₉_PADRE na presença poly I:C induz anticorpos de todas as subclasses de IgGs contra a proteína MSP-1₁₉ de *P.vivax* em camundongos BALB/c.

Grupos de camundongos foram imunizados como descrito na figura 20. As subclasses de IgGs foram determinadas 14 dias após a administração do reforço utilizando-se anticorpos específicos para cada subclasse. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizado em escala $\log_{10}$. As médias $\pm$ desvios padrão estão representadas para cada subclasse e cada grupo.

A resposta imune celular foi analisada por ELISPOT para detecção de células produtoras de INF- γ . Infelizmente, fomos incapazes de detectar qualquer resposta específica quando comparamos os grupos (dados não mostrados).

4.8 Imunização de camundongos C57BL/6 com os anticorpos híbridos contendo a proteína MSP-1₁₉_PADRE de *Plasmodium vivax* na presença de poly I:C ou CpG ODN.

Na tentativa de comparar o efeito de outros adjuvantes, realizamos alguns experimentos utilizando CpG ODN (ligante de TLR9). Escolhemos imunizar camundongos C57BL/6 com os anticorpos híbridos contendo a proteína MSP-1₁₉_PADRE_Pv para podermos analisar de maneira eficiente tanto a resposta imune celular quanto a humoral.

A figura 22 mostra os grupos de animais imunizados com os diferentes anticorpos híbridos (círculos, triângulos e quadrados) ou somente com a proteína MSP-1₁₉_PADRE-Pv recombinante (triângulos invertidos), tanto na presença de poly I:C (símbolos azuis) quanto CpG ODN (símbolos vermelhos). Interessantemente pudemos observar que a imunização dos animais com os uma concentração 10x menor de anticorpos híbridos anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE ou 33D1-MSP-1₁₉_PADRE tanto na presença de poly I:C quanto CpG foi capaz de induzir a produção de altos títulos de anticorpos anti-MSP-1₁₉, que não foram estatisticamente diferentes entre si. Por outro lado, no caso dos animais imunizados com o isotipo controle, observamos que na presença de CpG ODN, os títulos foram estatisticamente menores quando comparados aos títulos observados nos animais imunizados com os dois anticorpos híbridos. Desta forma, concluímos que o direcionamento do antígeno em presença de CpG ODN tanto para as células DEC205⁺ quanto DCIR2⁺ é capaz de aumentar a resposta imune humoral quando comparado à ausência do mesmo. Mais interessante ainda foi a observação feita quando imunizamos os animais com a proteína MSP-1₁₉_PADRE recombinante (ver triângulos invertidos). Neste caso, utilizamos tentamos imunizar os animais com a mesma quantidade de MSP-1₁₉_PADRE contida nos anticorpos híbridos. Para nossa surpresa, os animais imunizados somente com a proteína recombinante não associada a nenhum anticorpo apresentaram uma resposta entre 10 (imunização com CpG ODN) e 100x (imunização com poly I:C) menor do que aquela detectada nos animais imunizados com o isotipo controle (comparar

triângulos com triângulos invertidos). Este dado sugere que a fusão do antígeno ao isotipo controle pode estabilizá-lo, permitindo que seja gerada uma resposta imune mais robusta. Esse fato se pode observar, especialmente, no que diz respeito à administração dos anticorpos híbridos na presença de poly I:C.

Figura 22- Imunização com os anticorpos anti-DEC e 33D1-MSP-1₁₉_PADRE *P. vivax* é capaz de gerar altos títulos de anticorpos quando administrados tanto na presença de poly I:C ou CpG ODN.

Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados com 0,5 µg dos anticorpos anti-DEC, 33D1 ou Iso fusionados à sequência da MSP-1₁₉_PADRE ou somente com 0,07 µg da proteína MSP-1₁₉_PADRE recombinante na presença de 50 µg de poly I:C (azul) ou de 25 µg de CpG ODN (vermelho). Quarenta e cinco dias depois após da administração da primeira dose, os animais receberam um reforço com a mesma quantidade da primeira dose. A quantidade de anticorpos anti-MSP-1₁₉ *P. vivax* foi analisada por ELISA +/- 5 dias antes (símbolos sem preenchimento) e 14 dias após dias (símbolos preenchidos) a administração da dose de reforço. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizados em escala log₁₀ e os animais estão representados individualmente. As barras horizontais representam as médias de cada grupo.

Quando fomos analisar os subtipos de anticorpos gerados pelas diferentes imunizações, observamos a indução de IgG1, IgG2c e IgG2b principalmente (figura 23) tanto nos grupos imunizados com poly I:C quanto

com CpG ODN. Interessantemente, observamos uma diferença quando analisamos a razão IgG1/IgG2c entre o grupo imunizado com o anticorpo anti-DEC-MSP1₁₉_PADRE na presença de poly I:C (0,4) ou de CpG ODN (3,6). Esta diferença pode ser devida à modulação da resposta humoral induzida pelas DCs DEC205⁺ na presença dos dois ligantes de TLRs. O mesmo não ocorreu quando administramos 33D1 ou o isotipo controle.

Figura 23- Imunização com os anticorpos anti-DEC ou 33D1 fusionados à sequência da MSP-1₁₉_PADRE na presença poly I:C induz anticorpos de todas as subclasses de IgGs contra a proteína MSP-1₁₉ de *P.vivax* em camundongos C57BL/6.

Grupos de camundongos foram imunizados como descrito na figura 22. As subclasses de IgGs foram determinadas 14 dias após a administração do reforço utilizando-se anticorpos específicos para cada subclasse. O gráfico mostra o título de anticorpos dos diferentes grupos normalizado em escala log₁₀. As médias ± desvios padrão estão representadas para cada subclasse e cada grupo.

Para analisar a resposta imune celular, utilizamos três ensaios diferentes. A análise da proliferação das células T CD4⁺ em cultura foi feita através da marcação das células com CFSE (figura 24). No caso dos animais imunizados com o anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE em presença de poly I:C, observamos forte resposta proliferativa vista tanto quando usamos a proteína recombinante MSP-1₁₉_PADRE (figura 25A), e também quando utilizamos o peptídeo PADRE (figura 24B). A resposta proliferativa obtida quando analisamos as células dos animais imunizados com 33D1 ou com o Iso-MSP-1₁₉_PADRE foi bem menor ou quase indetectável. Por outro lado, no caso dos animais imunizados com CpG ODN, pudemos observar resposta tanto nos animais imunizados com anti-DEC quanto naqueles imunizados com 33D1. No entanto, esta proliferação foi menor do que a observada nos animais imunizados com o anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE em presença de poly I:C.

É importante também notar que a resposta parece ser dirigida contra o peptídeo PADRE pois não observamos uma resposta robusta quando utilizamos a proteína recombinante MSP-1₁₉ (figura 24A). Como controle negativo do peptídeo PADRE, utilizamos um outro peptídeo conhecido como PASTOR (103) que não é reconhecido pelo haplótipo dos camundongos C57BL/6.

Figura 24- Imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE na presença de poly I:C induz maior proliferação de células T CD4⁺ quando comparada a imunização na presença de CpG ODN.

Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados como descrito na figura 22. A resposta imune celular foi avaliada por proliferação com diluição de CFSE 40 dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 1µg/mL das proteínas recombinantes MSP1₁₉_PADRE ou MSP-1₁₉ *P.vivax*. (A) ou com 5µg/mL do peptídeo sintético PADRE ou PASTOR (B). O gráfico mostra a porcentagem de células CD3⁺CD4⁺ que perderam CFSE (CFSElow).

Além disso, analisamos também a produção das citocinas INF- γ , TNF- α e IL-2 *ex vivo* pelas células dos animais imunizados com os diferentes anticorpos híbridos ou com a proteína recombinante na presença de poly I:C ou CpG ODN (figura 25). Detectamos células T CD4⁺ triplo positivas (INF- γ ⁺IL-2⁺TNF- α ⁺), duplo positivas (INF- γ ⁺IL-2⁺TNF- α ⁻ e INF- γ ⁺IL-2⁻TNF- α ⁺) ou produtoras de um só tipo de citocina (INF- γ ⁺IL-2⁻TNF- α ⁻ ou INF- γ ⁻IL-2⁻TNF- α ⁺) nos animais imunizados com o anticorpo quimérico anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE em presença de poly I:C (figura 25, barras pretas). Já os animais imunizados com o mesmo anticorpo em presença de CpG ODN também produziram células triplo positivas (figura 25, barras azuis escuras), além de células produtoras somente de IL-2 ou TNF- α . Interessantemente, produção somente de IL-2 foi detectada nos animais imunizados com anti-DEC, 33D1 e Iso_MSP-1₁₉_PADRE, além da proteína recombinante na presença de CpG ODN. Resultados semelhantes foram obtidos quando as células foram pulsadas com o peptídeo PADRE (figura 25B). Não fomos capazes de detectar produção de células produtoras de IL-2 e TNF- α nos animais imunizados com o anti-DEC-MSP1₁₉_PADRE em presença de CpG quando reestimuladas somente com o peptídeo PADRE.

Figura 25- Imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE na presença de poly I:C induz maior frequência de células polifuncionais produtoras das citocinas INF- γ , IL-2 e TNF α simultaneamente.

Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados como descrito na figura 22. A resposta imune celular foi avaliada por marcação intracelular para as citocinas INF- γ , IL-2 e TNF- α .

A análise do ensaio de ELISPOT mostrou um resultado semelhante (figura 26). Um maior número de células produtoras de IFN- γ foi detectado nos esplenócitos dos animais imunizados com anti-DEC-MSP-1₁₉+poly I:C, tanto na presença da proteína MSP1₁₉_PADRE (910,8 $\pm$ 47,9) quanto na presença do peptídeo PADRE (862,4 $\pm$ 30,7, veja barras pretas e cinzas). Quando analisamos o número de células produtoras de IFN- γ nos esplenócitos (re-estimulados com a proteína MSP1₁₉_PADRE recombinante) dos animais imunizados com anti-DEC-MSP1₁₉_PADRE + CpG ODN (141,9 $\pm$ 16,3), percebemos que a resposta foi cerca de 6,4x menor quando comparada à resposta obtida com polyI:C (910,8 $\pm$ 47,9) . Mais interessante ainda foi o dado obtido com a imunização com 33D1-MSP1₁₉_PADRE+ CpG ODN. Ao contrário do que observamos no ensaio de proliferação com CFSE (figura 24), neste caso, o número de células produtoras de IFN- γ foi cerca de 5x menor (141,9 $\pm$ 16,3 versus 28,6 $\pm$ 3,3) quando comparamos os animais imunizados com anti-DEC ou 33D1-MSP1₁₉_PADRE na presença de CpG ODN, respectivamente. Os dados obtidos quando os esplenócitos foram re-estimulados com o peptídeo PADRE apresentaram o mesmo padrão.

Analizados em conjunto, esses dados indicam que a forma mais eficiente de se obter tanto resposta humoral quanto celular é direcionar o antígeno para as DCs DEC205+ na presença de poly I:C.

Figura 26- Imunização com o anticorpo anti-DEC-MSP-1₁₉_PADRE_Pv em presença de poly I:C é mais eficiente em induzir a produção de INF- γ .

Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados com os anticorpos anti-DEC, 33D1 e Iso-MSP-1₁₉_PADRE ou com a proteína recombinante como descrito na figura 22. A resposta imune celular foi avaliada por ELISPOT trinta dias após a administração da dose de reforço. Os esplenócitos foram incubados com 1 µg/mL das proteínas recombinantes MSP-1₁₉ ou MSP1₁₉_PADRE *P.vivax* ou com 5 µg/mL do peptídeo sintético PADRE ou PASTOR. O gráfico mostra o número de células produtoras de INF- γ por milhão de células totais descontando-se o número de spots formados na ausência de qualquer estímulo. O ensaio foi feito em triplicata e as barras indicam média $\pm$ desvio padrão.

5 Discussão

Como vimos na sessão resultados, fomos capazes de produzir com sucesso os anticorpos anti-DEC-MSP1₁₉ e Iso-MSP1₁₉ de *P. yoelii* e também os anticorpos anti-DEC, 33D1 e Iso contendo a MSP1₁₉_PADRE de *P. vivax* (figura 4). No entanto, fomos incapazes de produzir o anticorpo 33D1-MSP1₁₉ de *P. yoelii*. Desconhecemos a razão pela qual falhamos em produzir este anticorpo. O sequenciamento dos clones utilizados no protocolo de transfecção indicou que a sequência de DNA da proteína MSP1₁₉ *P. vivax* estava em fase com a sequência da cadeia pesada do anticorpo 33D1. Devemos considerar, no entanto, que cada anticorpo híbrido é uma proteína única que não tem equivalente na natureza. A composição de aminoácidos da proteína de fusão é peculiar a cada anticorpo e pode certamente influenciar na sua produção.

Uma vez que conseguimos produzir os anticorpos com sucesso, decidimos verificar se os mesmos mantinham sua capacidade de ligação aos seus respectivos receptores. Para tanto, fizemos ensaios de ligação utilizando células CHO transfectadas de forma estável com os receptores DEC205 murino, DEC205 humano e DCIR2 murino (figuras 5 e 6). Os anticorpos híbridos anti-DEC205 foram capazes de ligar-se de forma dose dependente às células CHO expressando o receptor DEC205 murino e não o DEC205 humano. Por outro lado, o anticorpo quimérico 33D1-MSP1₁₉_PADRE ligou-se especificamente a células CHO expressando o receptor DCIR2. Resultados semelhantes foram obtidos com outros anticorpos híbridos previamente produzidos (15, 33, 44, 45, 51).

Iniciamos então protocolos de imunização com os anticorpos híbridos contendo a proteína MSP1₁₉ de *P. yoelii* em presença de poly I:C e do anticorpo agonista anti-CD40. Utilizamos esta combinação porque ela havia sido utilizada com sucesso com outros anticorpos híbridos previamente produzidos (33, 44, 45). Quando fomos detectar a resposta imune celular por ELISPOT através da produção de células produtoras de IFN- γ , observamos um maior número destas células no baço dos animais imunizados com o anticorpo anti-DEC-MSP1₁₉Py (figura 7). Esta resposta foi dependente da quantidade de proteína utilizada na re-estimulação das culturas. Estes resultados confirmam o que vem sendo observado em diversos modelos experimentais nos últimos

anos (15, 33, 44, 45, 51): o direcionamento do antígeno para as DCs DEC205⁺ é capaz de suscitar resposta imune celular. Quando fomos analisar a resposta humoral através da análise da produção de anticorpos anti-MSP1₁₉ de *P. yoelii*, fomos incapazes de detectar qualquer resposta após a administração de duas doses (dados não mostrados). Na tentativa de melhorar a resposta imune humoral, administramos uma terceira dose aos animais. Desta vez, observamos que 4 de 5 animais apresentaram níveis detectáveis de anticorpos (figura 8), sendo que três deles apresentaram títulos de anticorpos em torno de 1:10.000. Com esses resultados, decidimos desafiar os animais com hemácias infectadas com a cepa 17XL de *P. yoelii* (figura 9). Não detectamos proteção nos animais imunizados com o anticorpo anti-DEC-MSP1₁₉Py, apesar dos títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉ obtidos. Este dado indica que os anticorpos gerados são incapazes de bloquear a infecção das hemácias pelas formas merozoítas. Dados apresentados na literatura (92, 110) mostraram que anticorpos anti-MSP1₁₉ de *P. yoelii* gerados através de imunização, foram capazes de reduzir a parasitemia de animais imunizados com a mesma cepa por nós utilizada. Uma redução na mortalidade foi inclusive obtida quando camundongos naive receberam soro de animais imunizados com a MSP1₁₉ e foram subsequentemente desafiados (110). Porém, devemos ressaltar que a imunização empregada nestes artigos foi feita com cerca de 60 ug de uma proteína bacteriana fundida à glutathione S-transferase (GST) na presença de um adjuvante forte conhecido como Ribi. Nossa estratégia utiliza cerca de 0,7 ug da proteína MSP1₁₉ (quantidade de MSP1₁₉ presente em 5 ug do anticorpo híbrido) e um adjuvante que já vem sendo testado em seres humanos em sua forma mais estável poly I:C:L:C (ver www.clinicaltrials.gov identificador NCT0112746). Sendo assim, acreditamos ser possível ainda melhorar a imunogenicidade de nossa estratégia vacinal.

Conforme foi proposto no projeto, decidimos também testar a imunogenicidade de anticorpos híbridos contendo a proteína MSP1₁₉ de *P. vivax*, por ser este um patógeno relevante para o ser humano. Como mencionamos acima, todos anticorpos híbridos contendo a proteína MSP1₁₉ de *P. vivax* foram produzidos com sucesso. É também importante mencionar que

neste caso, nós decidimos adicionar um epítopo universal de células T capaz de ligar-se a 15 dos 16 HLAs DR mais prevalentes na população humana (104, 105, 108). Este epítopo, quando fusionado à sequência da proteína MSP1₁₉, foi capaz de melhorar substancialmente os títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉ em camundongos (96, 109) e em primatas não humanos (103).

Quando comparamos os títulos de anticorpos dos animais C57BL/6 imunizados com todos os anticorpos híbridos contendo a MSP1₁₉_PADRE_Pv em presença de anti-CD40 e poly I:C, percebemos uma diferença estatística entre os títulos gerados antes e após a administração da segunda dose. De fato, a segunda dose parece aumentar os títulos entre 10-100x (figura 10). Para nossa surpresa, até o grupo imunizado com o isotipo controle apresentou títulos relativamente altos de anticorpos após a administração da segunda dose (apesar de o direcionamento do antígeno para as DCs DEC205⁺ apresentar um título estatisticamente mais alto). Esta elevada resposta gerada pela administração do isotipo controle não havia sido ainda descrita na literatura (44, 54) e estamos tentando entender a razão da mesma. Uma hipótese é que a fusão da MSP1₁₉_PADRE com o isotipo controle seja capaz de estabilizar a proteína e mantê-la na circulação por mais tempo. De fato, as imunoglobulinas da subclasse IgG possuem meia vida longa no soro (111). Quando fomos verificar a qualidade da resposta analisando as subclasses de imunoglobulinas G geradas, detectamos todas as subclasses de IgGs presentes nos animais imunizados (figura 11). A razão IgG1/IgG2c indicou uma resposta mista Th1/Th2. Resultados semelhantes já haviam sido observados na literatura (44, 54). A análise da resposta imune celular foi feita através de um ensaio de proliferação. Verificamos que tanto o direcionamento do antígeno para as DCs DEC205⁺ quanto DCIR2⁺ foi capaz de levar a proliferação específica de células T CD4⁺ contra a proteína MSP1₁₉_PADRE (figura 12). Novamente, este resultado foi esperado e corrobora com outros já descritos na literatura e que mostram que o direcionamento dos antígenos para ambas as populações de DCs é capaz de induzir resposta imune celular (32, 33, 51).

Como mencionamos na introdução, o peptídeo PADRE é capaz de ligar-se ao HLA de camundongos C57BL/6 e induzir a ativação de células T CD4⁺

que assistem as células B na produção de elevados títulos de anticorpos (109). Desta forma, estávamos esperando que camundongos C57BL/6 fossem capazes de produzir títulos de anticorpos quando imunizados com qualquer construção contendo a proteína MSP1₁₉_PADRE. Para avaliarmos se o mesmo fenômeno ocorreria na ausência da influência do epítipo PADRE, imunizamos camundongos BALB/c, que não são capazes de reconhecer este epítipo. A imunização desta linhagem de camundongos com os anticorpos híbridos na presença de anti-CD40 e poly I:C mostrou que, assim como vimos com camundongos C57BL/6, os títulos de anticorpos subiram cerca de 100x após a administração da dose de reforço. Além disso, o direcionamento do antígeno para as DCs DEC205⁺ foi capaz de induzir títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉ 10x maiores do que os induzidos nos animais imunizados com o isotipo controle (figura 13). Neste modelo, ficou então mais claro que o direcionamento do antígeno para as DCs DEC205⁺ pode melhorar a magnitude da resposta imune humoral. Quando analisamos as subclasses de IgG geradas, percebemos que camundongos BALB/c também foram capazes de produzir todas as subclasses (figura 14). Interessantemente, a razão IgG1/IgG2a ficou um pouco menor nos grupos imunizados com o anticorpo anti-DEC-MSP1₁₉_PADRE ou isotipo controle do que no grupo imunizado com 33D1-MSP1₁₉_PADRE. Uma resposta com este perfil já havia sido descrita na literatura nos animais imunizados com anticorpos híbridos contendo as proteínas CS de *P. yoelii* e Gag de HIV (44, 54). A análise da resposta imune celular feita por ELISPOT mostrou que o direcionamento do antígeno tanto para as DCs DEC205⁺ e quanto para DCIR2⁺ foi capaz de induzir células T produtoras de IFN- γ (figura 15). No entanto, esta resposta só foi detectada com maior precisão quando as células foram re-estimuladas com 10 ug/mL da proteína recombinante.

Nosso próximo objetivo foi realizar os experimentos de imunização utilizando somente poly I:C como adjuvante. Decidimos testar outros adjuvantes alternativos porque o anticorpo agonista anti-CD40 (conhecido como dacetuzumab) tem sido utilizado em ensaios de fase 1, principalmente

em pacientes com câncer (linfoma não-Hodgkin). Uma série de efeitos colaterais não muito intensos foi descrita nestes pacientes (112).

Grupos de camundongos C57BL/6 foram então imunizados com duas doses dos anticorpos híbridos em presença somente de poly I:C. Para nossa surpresa, os títulos de anticorpos não diferiram após a administração da segunda dose em nenhum dos grupos imunizados. Desta forma, concluímos que somente na presença de poly I:C, o direcionamento do antígeno para as DCs DEC205⁺ ou DCIR2⁺ não é capaz de induzir títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉ estatisticamente diferentes (figura 16). Até o momento, não conhecemos nenhum artigo que tenha realizado este tipo de comparação somente em presença de poly I:C. Quando analisamos as subclasses de IgGs (figura 17), percebemos que houve alterações significativas na razão IgG1/IgG2c quando estas foram comparadas às razões obtidas nos animais imunizados com anti-CD40 e poly I:C (figura 11). No entanto, fomos incapazes de detectar IgG3 ou detectamos títulos muito baixos nos animais imunizados com os anticorpos híbridos na presença somente com poly I:C. Esta diferença pode ter a ver com o tipo de estímulo fornecido pela combinação anti-CD40⁺ poly I:C. Sabe-se que a molécula CD40 está também bastante expressa na superfície de células B e seu engajamento é fundamental para a mudança de classe das imunoglobulinas (113).

Resultados bastante interessantes foram obtidos quando fizemos a análise da resposta imune celular por ELISPOT (figura 18) ou por proliferação utilizando diluição de CFSE (figura 19). Observamos a indução de uma boa quantidade de células produtoras de IFN- γ (cerca de 600 por milhão de esplenócitos) no baço de animais imunizados com o anticorpo anti-DEC-MSP1₁₉_PADRE_Pv somente quando os mesmos foram re-estimulados com a proteína MSP1₁₉_PADRE. Esta resposta foi dose dependente, sendo reduzida quando diminuimos a quantidade de proteína. Pelos dados obtidos, percebemos que a resposta foi majoritariamente direcionada contra o peptídeo PADRE pois detectamos resposta bem mais baixa quando os esplenócitos foram incubados com diferentes concentrações da proteína MSP1₁₉. Este fato já havia sido observado por Rosa et al. (109) que detectaram resposta celular

bem mais baixa contra peptídeos da MSP1₁₉ quando os animais haviam sido imunizados com a MSP1₁₉_PADRE. Por outro lado, quando estes mesmos autores imunizaram os animais com a MSP1₁₉ e testaram suas células com re-estímulo da própria proteína recombinante (MSP1₁₉), foi possível detectar uma resposta proliferativa das células re-estimuladas com a concentração de 10 ug/mL. Eles concluíram então que há epítomos para células T reconhecidas por camundongos C57BL/6 na proteína MSP1₁₉, porém quando o epítomo PADRE é usado para as imunizações, toda a resposta de células T CD4⁺ é dirigida contra ele.

Outra observação bastante interessante foi feita nos animais imunizados com o anticorpos 33D1-MSP1₁₉_PADRE_Pv. Para nossa surpresa, detectamos uma resposta muito baixa contra o peptídeo PADRE (figura 19), ao contrário do que foi observado nos animais imunizados com este anticorpo híbrido na presença de anti-CD40 e poly I:C. Não sabemos ao certo porque isto ocorreu mas podemos especular que possa ser devido a ausência do receptor TLR3 na superfície das DCs DCIR2⁺. De fato, ensaios de expressão de RNA utilizando as duas subpopulações de DCs mostraram que as DCs DEC205⁺ expressam bastante TLR3 enquanto que as células DCIR2⁺ não (Dr. Michel Nussenzweig, comunicação pessoal).

Quando camundongos BALB/c foram imunizados nas mesmas condições, observamos que o direcionamento do antígeno para as DCs tanto DEC205⁺ quanto DCIR2⁺ foi capaz de conferir significativo aumento (cerca de 100x) no título de anticorpos anti-MSP1₁₉, quando comparado ao título obtido nos animais imunizados com o isotipo controle (figura 20). Dados semelhantes foram obtidos por Boscardin et al. e por Cheong et al. utilizando as proteínas CS de *P. yoelii* e Gag do HIV (44, 54). A análise das subclasses de IgG mostrou uma predominância do isotipo IgG1 (razão IgG1/IgG2a) maior que 1 (figura 21). Até o momento, não temos ciência de nenhum artigo científico que tenha analisado a resposta humoral induzida em animais imunizados com os anticorpos anti-DEC ou 33D1 na presença somente de poly I:C. Porém, a imunização de primatas não humanos com o anticorpo anti-DEC contendo a

proteína CS de *P. falciparum* induziu elevados títulos de anticorpos anti-CS quando administrado na presença de poly I:C:L:C (48).

Finalmente, decidimos comparar as respostas induzidas pela imunização de camundongos C57BL/6 com os diferentes anticorpos híbridos na presença de poly I:C ou CpG ODN. A análise dos títulos de anticorpos mostrou que o direcionamento da MSP1₁₉_PADRE para as subpopulações DEC205⁺ ou DCIR2⁺ foi capaz de induzir títulos semelhantes quando comparamos os animais imunizados com poly I:C ou com CpG ODN (figura 22). Mais do que isso, nos animais imunizados com CpG ODN, o direcionamento do antígeno para as duas populações de DCs foi capaz de induzir títulos mais do que 100x maiores do que na ausência de direcionamento. Mais importante, quando grupos de animais foram imunizados com uma quantidade de MSP1₁₉_PADRE equivalente àquela presente nos anticorpos híbridos, a resposta foi cerca de 1000x menor do que aquela observada quando a MSP1₁₉ foi direcionada para as DCs DEC205⁺ ou DCIR2⁺. Este dado mostra claramente que o direcionamento do antígeno para as subpopulações de DCs é superior em induzir uma resposta de anticorpos do que a administração da proteína sozinha. Outra observação bastante interessante foi a de que os animais imunizados com o isotipo controle apresentaram títulos de anticorpos maiores do que aqueles injetados com a mesma quantidade de proteína recombinante. Este resultado parece indicar que o isotipo controle poderia estar estabilizando a proteína. A análise dos subtipos de IgGs mostrou uma diferença entre os animais imunizados com o anticorpo anti-DEC_MSP-1₁₉_PADRE na presença de poly I:C ou CpG ODN. Enquanto a razão IgG1/IgG2c foi mais baixa na presença de poly I:C, aumentou em presença de CpG ODN (figura 23). No caso da imunização com CpG ODN, há relatos na literatura mostrando que a imunização de camundongos C57BL/6 com a proteína recombinante MSP1₁₉_PADRE em presença de CpG ODN induz uma razão IgG1/IgG2c igual a 10 (114). Em nosso caso, a razão obtida foi de 3,6. Desta forma, acreditamos que o adjuvante utilizado tem influência na modulação da resposta imune humoral induzida pelo direcionamento do antígeno para as DCs.

Finalmente, a análise da resposta imune celular foi realizada nestes animais de três diferentes formas: proliferação por diluição de CFSE, marcação intracelular de citocinas e ELISPOT para detecção de células produtoras de IFN- γ (figuras 24, 25 e 26). Nossos dados indicam que a imunização de camundongos com o anticorpo anti-DEC-MSP1₁₉_PADRE não só é mais eficiente para induzir proliferação de linfócitos T, mas também induz a formação de células polifuncionais e produtoras de IFN- γ . Confirmamos com estes experimentos que a resposta é direcionada majoritariamente pelo epítipo PADRE. A resposta induzida pela utilização do anticorpo anti-DEC-MSP1₁₉_PADRE juntamente com CpG ODN, apesar de induzir uma resposta humoral semelhante àquela induzida pela utilização do mesmo anticorpo com poly I:C, foi bem inferior a esta última quando comparamos a resposta imune celular.

Todos estes dados, analisados juntos, nos levam a crer que o anticorpo anti-DEC205 em fusão com a proteína MSP1₁₉_PADRE foi mais imunogênico quando administrado em presença de qualquer adjuvante (ou combinação) testado neste estudo. De fato, nos últimos anos vários estudos vem demonstrando sistematicamente que a imunização com anticorpos híbridos baseados no anticorpo anti-DEC205 é capaz de induzir forte resposta celular (e algumas vezes humoral) contra a proteína a ele fusionada (32, 33, 43-47, 51, 54, 115). Os dados gerados em camundongos foram importantes para pavimentar o caminho para estudos realizados em primatas não humanos (48, 49). A imunização de macacos com o anticorpo híbrido anti-DEC-Gag em polyI:C:L:C seguida de uma dose do vírus vaccinia recombinante contendo esta mesma proteína foi capaz de induzir uma resposta de células T bastante robusta em primatas não humanos (49). Neste momento, um anticorpo anti-DEC humano está sendo utilizado juntamente com poly I:C:L:C para imunização de indivíduos saudáveis, na tentativa de avaliar-se imunogenicidade, tolerabilidade e segurança desta vacina (ver (116)). Nos próximos anos, teremos a oportunidade de avaliar se os estudos clínicos corroboram os estudos pré-clínicos. Enquanto isso, a busca da melhor combinação anticorpo híbrido – adjuvante continua.

6 Conclusões

- A imunização com três doses do anticorpo anti-DEC-MSP1₁₉ *P. yoelii* em presença de poly I:C é capaz de induzir uma resposta de anticorpos anti-MSP1₁₉. No entanto, proteção contra as formas eritrocíticas de *P. yoelii* não foi obtida.
- A imunização de camundongos C57BL/6 e BALB/c com os anticorpos híbridos MSP1₁₉_PADRE *P. vivax* + anti-CD40+ poly I:C induz anticorpos anti-MSP1₁₉. Para a resposta humoral, o direcionamento para as DCs DEC205⁺ e DCIR2⁺ parece só conferir vantagem quando o epítipo PADRE não é reconhecido por células T do animal. Quando o mesmo é reconhecido (em camundongos C57BL/6), os títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉ não foram tão diferentes entre os grupos imunizados com anti-DEC, 33D1 ou Iso-MSP1₁₉_PADRE. Foram detectadas todas as subclasses de IgGs em ambas as linhagens. O direcionamento do antígeno tanto para as DCs DEC205⁺ quanto DCIR2⁺ induziu uma resposta imune celular específica contra a MSP-1₁₉ nos animais imunizados com os anticorpos anti-DEC e 33D1-MSP1₁₉_PADRE de *P. vivax*. O mesmo não ocorreu nos animais imunizados com isotipo controle.
- A imunização de camundongos C57BL/6 ou BALB/c com duas doses dos anticorpos híbridos contendo a MSP1₁₉_PADRE *P. vivax* em presença de poly I:C induz resposta de anticorpos anti-MSP1₁₉. No caso da resposta imune humoral, o direcionamento do antígeno para as DCs DEC205⁺ confere vantagem quando o epítipo PADRE não é funcional. Quando o mesmo é funcional (em camundongos C57BL/6), os títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉ são parecidos entre os grupos imunizados com anti-DEC, 33D1 ou Iso-MSP1₁₉. Foram detectadas as subclasses IgG1, 2b e 2c em camundongos C57BL/6 e todas as subclasses em camundongos BALB/c. Somente o direcionamento do antígeno para as DCs DEC205⁺ induziu uma resposta imune celular específica contra a MSP-1₁₉_PADRE. Em camundongos C57BL/6, toda a resposta celular é direcionada contra o epítipo PADRE.
- A imunização de camundongos C57BL/6 com duas doses de 0,5 µg dos anticorpos híbridos contendo a MSP1₁₉_PADRE *P. vivax* em presença de poly I:C ou CpG ODN induziu resposta de anticorpos anti-MSP1₁₉. No caso da resposta imune humoral, o direcionamento do antígeno em presença de poly

I:C para as DCs DEC205⁺ ou DCIR2⁺ não conferiu vantagem quando o epítipo PADRE é funcional pois os títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉ são parecidos entre os grupos imunizados com anti-DEC, 33D1 ou Iso-MSP1₁₉. Já no caso da administração de CpG ODN, o direcionamento do antígeno para as DCs DEC205⁺ ou DCIR2⁺ conferiu vantagem quando comparado a ausência do mesmo. Baixa ou nenhuma produção de IgG3 foi vista nos animais imunizados com poly I:C ou CpG ODN. O direcionamento do antígeno para as DCs DEC205⁺ normalmente induziu uma resposta imune celular específica contra a MSP-1₁₉_PADRE, independentemente do adjuvante utilizado. A resposta imune celular nos animais imunizados com o anticorpo anti-DEC MSP1₁₉_PADRE foi maior na presença de poly I:C do que de CpG ODN. A resposta imune celular obtida pelo direcionamento do anticorpo 33D1-MSP1₁₉_PADRE em presença de poly I:C ou CpG foi bem menor do que aquela obtida na presença de anti-CD40+poly I:C.

Referências

1.Steinman RM, Adams JC, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. J Exp Med. 1975 Apr 1;141(4):804-20.

2.Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med. 1973 May 1;137(5):1142-62.

3.Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. J Exp Med. 1974 Feb 1;139(2):380-97.

4.Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. J Exp Med. 1974 Jun 1;139(6):1431-45.

5.Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. Curr Top Microbiol Immunol. 2006;311:17-58.

6.Boscardin SB, Nussenzweig MC, Trumfheller C, Steinman RM. Vaccines based on dendritic cell biology. In: Levine MM, editor. New generation vaccines 4. ed. New York: Informa Healthcare; 2009. p. 327-39.

7.Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa C, et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. J Exp Med. 2000 Mar 20;191(6):927-36.

8.Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, et al. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on

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

dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med*. 1994 Nov 1;180(5):1849-60.

9.Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, et al. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol*. 1999 May;29(5):1617-25.

10.Edwards AD, Manickasingham SP, Sporri R, Diebold SS, Schulz O, Sher A, et al. Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J Immunol*. 2002 Oct 1;169(7):3652-60.

11.Dalod M, Salazar-Mather TP, Malmgaard L, Lewis C, Asselin-Paturel C, Briere F, et al. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med*. 2002 Feb 18;195(4):517-28.

12.Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med*. 1997 Feb 3;185(3):541-50.

13.Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Cao W, Liu YJ. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature*. 2005 Aug 25;436(7054):1181-5.

14.Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity*. 2000 Dec;13(6):829-40.

15.Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*. 2001 Sep 17;194(6):769-79.

- 16.Liu K, Iyoda T, Saternus M, Kimura Y, Inaba K, Steinman RM. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J Exp Med*. 2002 Oct 21;196(8):1091-7.
- 17.Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*. 2002 Dec 16;196(12):1627-38.
- 18.Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*. 2005 Dec;6(12):1219-27.
- 19.Tarbell KV, Yamazaki S, Steinman RM. The interactions of dendritic cells with antigen-specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity. *Semin Immunol*. 2006 Apr;18(2):93-102.
- 20.Yamazaki S, Bonito AJ, Spisek R, Dhodapkar M, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4293-302.
- 21.Crowley M, Inaba K, Witmer-Pack M, Steinman RM. The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell Immunol*. 1989 Jan;118(1):108-25.
- 22.Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders DJ, Ardavin CF, Wu L, et al. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med*. 1992 Jul 1;176(1):47-58.

23. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med*. 1997 Mar 17;185(6):1101-11.
24. Guillemins M, Henri S, Tamoutounour S, Ardouin L, Schwartz-Cornil I, Dalod M, et al. From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *Eur J Immunol*. 2010 Aug;40(8):2089-94.
25. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jan;7(1):19-30.
26. Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jul;7(7):543-55.
27. Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol*. 2000 Mar 15;164(6):2978-86.
28. Maldonado-Lopez 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*. 1999 Feb 1;189(3):587-92.
29. Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Feb 2;96(3):1036-41.
30. den Haan JM, Bevan MJ. A novel helper role for CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 21;97(24):12950-2.
31. Schnorrer P, Behrens GM, Wilson NS, Pooley JL, Smith CM, El-Sukkari D, et al. The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not

dictated by antigen capture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jul 11;103(28):10729-34.

32.Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C, Yamazaki S, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*. 2007 Jan 5;315(5808):107-11.

33.Soares H, Waechter H, Glaichenhaus N, Mougneau E, Yagita H, Mizenina O, et al. A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *J Exp Med*. 2007 May 14;204(5):1095-106.

34.Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, Omatsu Y, Akiyama Y, Maeda Y, et al. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med*. 2002 May 20;195(10):1289-302.

35.Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol*. 2002 Feb;2(2):77-84.

36.Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*. 2000 Jan;12(1):71-81.

37.Ebner S, Ehammer Z, Holzmann S, Schwingshackl P, Forstner M, Stoitzner P, et al. Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int Immunol*. 2004 Jun;16(6):877-87.

38.Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demarex N, et al. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol*. 2002 Mar 1;168(5):2118-26.

- 39.Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, et al. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol*. 2001 Jul 15;167(2):741-8.
- 40.Cheong C, Idoyaga J, Do Y, Pack M, Park SH, Lee H, et al. Production of monoclonal antibodies that recognize the extracellular domain of mouse langerin/CD207. *J Immunol Methods*. 2007 Jul 31;324(1-2):48-62.
- 41.Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*. 2003 May 5;197(9):1107-17.
- 42.Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*. 2003 May 5;197(9):1119-24.
- 43.Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med*. 2004 Mar 15;199(6):815-24.
- 44.Boscardin SB, Hafalla JC, Masilamani RF, Kamphorst AO, Zebroski HA, Rai U, et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):599-606.
- 45.Trumpfheller C, Finke JS, Lopez CB, Moran TM, Moltedo B, Soares H, et al. Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):607-17.
- 46.Trumpfheller C, Caskey M, Nchinda G, Longhi MP, Mizenina O, Huang Y, et al. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 19;105(7):2574-9.

- 47.Nchinda G, Kuroiwa J, Oks M, Trumpfheller C, Park CG, Huang Y, et al. The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells. *J Clin Invest*. 2008 Apr;118(4):1427-36.
- 48.Tewari K, Flynn BJ, Boscardin SB, Kastenmueller K, Salazar AM, Anderson CA, et al. Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4+ T cell responses to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP) and alphaDEC-CSP in non human primates. *Vaccine*. 2010 Oct 21;28(45):7256-66.
- 49.Flynn BJ, Kastenmuller K, Wille-Reece U, Tomaras GD, Alam M, Lindsay RW, et al. Immunization with HIV Gag targeted to dendritic cells followed by recombinant New York vaccinia virus induces robust T-cell immunity in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Apr 26;108(17):7131-6.
- 50.Do Y, Park CG, Kang YS, Park SH, Lynch RM, Lee H, et al. Broad T cell immunity to the LcrV virulence protein is induced by targeted delivery to DEC-205/CD205-positive mouse dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2008 Jan;38(1):20-9.
- 51.Do Y, Koh H, Park CG, Dudziak D, Seo P, Mehandru S, et al. Targeting of LcrV virulence protein from *Yersinia pestis* to dendritic cells protects mice against pneumonic plague. *Eur J Immunol*. 2010 Oct;40(10):2791-6.
- 52.Bozzacco L, Trumpfheller C, Siegal FP, Mehandru S, Markowitz M, Carrington M, et al. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 23;104(4):1289-94.
- 53.Gurer C, Strowig T, Brilot F, Pack M, Trumpfheller C, Arrey F, et al. Targeting the nuclear antigen 1 of Epstein-Barr virus to the human endocytic receptor DEC-205 stimulates protective T-cell responses. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1231-9.

- 54.Cheong C, Choi JH, Vitale L, He LZ, Trumpfheller C, Bozzacco L, et al. Improved cellular and humoral immune responses in vivo following targeting of HIV Gag to dendritic cells within human anti-human DEC205 monoclonal antibody. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3828-38.
- 55.Luchavez J, Espino F, Curameng P, Espina R, Bell D, Chiodini P, et al. Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. *Emerg Infect Dis*. 2008 May;14(5):811-3.
- 56.WHO. World Health Statistics 2010. WHO; 2010 [updated 2010; cited 17/02/2010]; Available from: <http://www.who.int/whosis/whostat/2010/en/>.
- 57.Sina B. Focus on *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol*. 2002 Jul;18(7):287-9.
- 58.SVS. Ministério da Saúde. 2011. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1526
- 59.Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Jan-Feb;64(1-2 Suppl):97-106.
- 60.Baird JK. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Nov;48(11):4075-83.
- 61.Rogerson SJ, Carter R. Severe vivax malaria: newly recognised or rediscovered. *PLoS Med*. 2008 Jun 17;5(6):e136.
- 62.Galinski MR, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*: who cares? *Malar J*. 2008;7 Suppl 1:S9.
- 63.Price RN, Tjitra E, Guerra CA, Yeung S, White NJ, Anstey NM. Vivax malaria: neglected and not benign. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Dec;77(6 Suppl):79-87.

64.de Lacerda MV, Zackiewicz C, Alecrim WD, Alecrim MG. The neglected *Plasmodium vivax*: are researchers from endemic areas really concerned about new treatment options? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007 Jul-Aug;40(4):489-90.

65.Amino R, Thiberge S, Blazquez S, Baldacci P, Renaud O, Shorte S, et al. Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc*. 2007;2(7):1705-12.

66.Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006 Sep 1;313(5791):1287-90.

67.Bray RS, Krotoski WA, Cogswell FB, Garnham PC, Rodriguez M, Guy MW, et al. Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. III. Further attempts to find early forms and to correlate hypnozoites with growing exo-erythrocytic schizonts and parasitaemic relapses in *Plasmodium cynomolgi bastianellii* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985;79(2):269-73.

68.Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol*. 2006 Jan-Feb;28(1-2):35-49.

69.Clyde DF. Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. *Am J Trop Med Hyg*. 1975 May;24(3):397-401.

70.Clyde DF. Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies, 1971-75. *Bull World Health Organ*. 1990;68 Suppl:9-12.

71.Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol*. 2003 Aug;133(2):145-52.

72.Doolan DL, Dobano C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. Clin Microbiol Rev. 2009 Jan;22(1):13-36, Table of Contents.

73.Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg. 1991 Sep;45(3):297-308.

74.McGregor IA. The Passive Transfer of Human Malarial Immunity. Am J Trop Med Hyg. 1964 Jan;13:SUPPL 237-9.

75.Prabha MR, Pereira P, Chowta N, Hegde BM. Clinical implications of hypocalcemia in malaria. Indian J Med Res. 1998 Aug;108:62-5.

76.Yazdani SS, Shakri AR, Mukherjee P, Baniwal SK, Chitnis CE. Evaluation of immune responses elicited in mice against a recombinant malaria vaccine based on Plasmodium vivax Duffy binding protein. Vaccine. 2004 Sep 9;22(27-28):3727-37.

77.Arevalo-Herrera M, Solarte Y, Zamora F, Mendez F, Yasnot MF, Rocha L, et al. Plasmodium vivax: transmission-blocking immunity in a malaria-endemic area of Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2005 Nov;73(5 Suppl):38-43.

78.Valderrama-Aguirre A, Quintero G, Gomez A, Castellanos A, Perez Y, Mendez F, et al. Antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of Plasmodium vivax MSP1 PV200I: a potential malaria vaccine subunit. Am J Trop Med Hyg. 2005 Nov;73(5 Suppl):16-24.

79.Riley EM, Allen SJ, Wheeler JG, Blackman MJ, Bennett S, Takacs B, et al. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of Plasmodium falciparum are associated with reduced malaria morbidity. Parasite Immunol. 1992 May;14(3):321-37.

- 80.Blackman MJ, Scott-Finnigan TJ, Shai S, Holder AA. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. *J Exp Med.* 1994 Jul 1;180(1):389-93.
- 81.Koussis K, Withers-Martinez C, Yeoh S, Child M, Hackett F, Knuepfer E, et al. A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. *EMBO J.* 2009 Mar 18;28(6):725-35.
- 82.Holder AA, Blackman MJ, Burghaus PA, Chappel JA, Ling IT, McCallum-Deighton N, et al. A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992;87 Suppl 3:37-42.
- 83.Quin SJ, Seixas EM, Cross CA, Berg M, Lindo V, Stockinger B, et al. Low CD4(+) T cell responses to the C-terminal region of the malaria merozoite surface protein-1 may be attributed to processing within distinct MHC class II pathways. *Eur J Immunol.* 2001 Jan;31(1):72-81.
- 84.Holder AA. The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria. *Parasitology.* 2009 Oct;136(12):1445-56.
- 85.del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, David PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 May 1;88(9):4030-4.
- 86.Souares IS, Levitus G, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infect Immun.* 1997 May;65(5):1606-14.

- 87.Yeom JS, Kim ES, Lim KJ, Oh JH, Sohn MJ, Yoo SB, et al. Naturally acquired IgM antibody response to the C-terminal region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea: use for serodiagnosis of vivax malaria. *J Parasitol.* 2008 Dec;94(6):1410-4.
- 88.Herrera S, Herrera MA, Certa U, Corredor A, Guerrero R. Efficiency of human *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidates in *Aotus lemurinus* monkeys. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992;87 (Suppl 3):423-8.
- 89.Graves P, Gelband H. Vaccines for preventing malaria (blood-stage). *Cochrane Database Syst Rev.* 2006(4):CD006199.
- 90.Good MF. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. *Trends Parasitol.* 2005 Jan;21(1):29-34.
- 91.Siddiqui WA, Tam LQ, Kramer KJ, Hui GS, Case SE, Yamaga KM, et al. Merozoite surface coat precursor protein completely protects *Aotus* monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 May;84(9):3014-8.
- 92.Daly TM, Long CA. A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii yoelii* 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice. *Infect Immun.* 1993 Jun;61(6):2462-7.
- 93.Lyon JA, Angov E, Fay MP, Sullivan JS, Girourd AS, Robinson SJ, et al. Protection induced by *Plasmodium falciparum* MSP1(42) is strain-specific, antigen and adjuvant dependent, and correlates with antibody responses. *PLoS ONE.* 2008;3(7):e2830.
- 94.Singh S, Miura K, Zhou H, Muratova O, Keegan B, Miles A, et al. Immunity to recombinant *plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP1): protection in *Aotus nancymai* monkeys strongly correlates with anti-MSP1

antibody titer and in vitro parasite-inhibitory activity. *Infect Immun.* 2006 Aug;74(8):4573-80.

95.Dutta S, Ware LA, Barbosa A, Ockenhouse CF, Lanar DE. Purification, characterization, and immunogenicity of a disulfide cross-linked *Plasmodium vivax* vaccine candidate antigen, merozoite surface protein 1, expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2001 Sep;69(9):5464-70.

96.Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine.* 2001 Nov 12;20(3-4):385-96.

97.Souares IS, Rodrigues MM. Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from *Pichia pastoris*. *Parasitology.* 2002 Mar;124(Pt 3):237-46.

98.Espinosa AM, Sierra AY, Barrero CA, Cepeda LA, Cantor EM, Lombo TB, et al. Expression, polymorphism analysis, reticulocyte binding and serological reactivity of two *Plasmodium vivax* MSP-1 protein recombinant fragments. *Vaccine.* 2003 Mar 7;21(11-12):1033-43.

99.Sierra AY, Barrero CA, Rodriguez R, Silva Y, Moncada C, Vanegas M, et al. Splenectomised and spleen intact Aotus monkeys' immune response to *Plasmodium vivax* MSP-1 protein fragments and their high activity binding peptides. *Vaccine.* 2003 Oct 1;21(27-30):4133-44.

100.Sachdeva S, Ahmad G, Malhotra P, Mukherjee P, Chauhan VS. Comparison of immunogenicities of recombinant *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 19- and 42-kiloDalton fragments expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2004 Oct;72(10):5775-82.

- 101.Dutta S, Kaushal DC, Ware LA, Puri SK, Kaushal NA, Narula A, et al. Merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* induces a protective response against *Plasmodium cynomolgi* challenge in rhesus monkeys. *Infect Immun*. 2005 Sep;73(9):5936-44.
- 102.Barrero CA, Delgado G, Sierra AY, Silva Y, Parra-Lopez C, Patarroyo MA. Gamma interferon levels and antibody production induced by two PvMSP-1 recombinant polypeptides are associated with protective immunity against *P.vivax* in Aotus monkeys. *Vaccine*. 2005 Jul 1;23(31):4048-53.
- 103.Rosa DS, Iwai LK, Tzelepis F, Bargieri DY, Medeiros MA, Soares IS, et al. Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). *Microbes Infect*. 2006 Jul;8(8):2130-7.
- 104.Alexander J, Fikes J, Hoffman S, Franke E, Sacci J, Appella E, et al. The optimization of helper T lymphocyte (HTL) function in vaccine development. *Immunol Res*. 1998;18(2):79-92.
- 105.Alexander J, Sidney J, Southwood S, Ruppert J, Oseroff C, Maewal A, et al. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity*. 1994 Dec;1(9):751-61.
- 106.Panina-Bordignon P, Tan A, Termijtelen A, Demotz S, Corradin G, Lanzavecchia A. Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol*. 1989 Dec;19(12):2237-42.
- 107.Franke ED, Hoffman SL, Sacci JB, Jr., Wang R, Charoenvit Y, Appella E, et al. Pan DR binding sequence provides T-cell help for induction of protective

antibodies against *Plasmodium yoelii* sporozoites. *Vaccine*. 1999 Mar 5;17(9-10):1201-5.

108.Alexander J, del Guercio MF, Maewal A, Qiao L, Fikes J, Chesnut RW, et al. Linear PADRE T helper epitope and carbohydrate B cell epitope conjugates induce specific high titer IgG antibody responses. *J Immunol*. 2000 Feb 1;164(3):1625-33.

109.Rosa DS, Tzelepis F, Cunha MG, Soares IS, Rodrigues MM. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. *Immunol Lett*. 2004 Apr 15;92(3):259-68.

110.Daly TM, Long CA. Humoral response to a carboxyl-terminal region of the merozoite surface protein-1 plays a predominant role in controlling blood-stage infection in rodent malaria. *J Immunol*. 1995 Jul 1;155(1):236-43.

111.Fahey JL, Wunderlich J, Mishell R. The Immunoglobulins of Mice. I. Four Major Classes of Immunoglobulins: 7s Gamma-2-, 7s Gamma-1-, Gamma-1a (Beta-2a)-, and 18s Gamma-1m-Globulins. *J Exp Med*. 1964 Aug 1;120:223-42.

112.Advani R, Forero-Torres A, Furman RR, Rosenblatt JD, Younes A, Ren H, et al. Phase I study of the humanized anti-CD40 monoclonal antibody dacetuzumab in refractory or recurrent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 10;27(26):4371-7.

113.Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol*. 2009 Jan;9(1):15-27.

114.Rosa DS, Bastos KR, Bargieri DY, Tzelepis F, Nomizo A, Russo M, et al. Role of interferon-gamma during CpG oligodeoxynucleotide-adjuvanted immunization with recombinant proteins. *Vaccine*. 2007 Aug 10;25(32):6007-17.

115.Nchinda G, Amadu D, Trumpfheller C, Mizenina O, Uberla K, Steinman RM. Dendritic cell targeted HIV gag protein vaccine provides help to a DNA vaccine including mobilization of protective CD8+ T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Mar 2;107(9):4281-6.

116.Clinical Trials Web Page. 2011. www.clinicaltrials.gov