FERNANDO BANDEIRA SULCZEWSKI

Mecanismo de Geração de Resposta Imune Humoral Induzida pelo Direcionamento do Antígeno $MSP1_{19}$PADRE para Duas Populações Distintas de Células Dendríticas via Receptores DEC205 e DCIR2

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

São Paulo
2017

FERNANDO BANDEIRA SULCZEWSKI

Mecanismo de Geração de Resposta Imune Humoral Induzida pelo Direcionamento do Antígeno $MSP1_{19}$PADRE para Duas Populações Distintas de Células Dendríticas via Receptores DEC205 e DCIR2

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

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

Versão original

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Sulczewski, Fernando Bandeira
Mecanismo de Geração de Resposta Imune Humoral Induzida pelo Direcionamento do Antígeno MSP119PADRE para Duas Populações Distintas de Células Dendríticas via Receptores DEC205 e DCIR2 / Fernando Bandeira Sulczewski; orientador Silvia Beatriz Boscardin; coorientador Daniela Santoro Rosa. -- São Paulo, 2017.
104 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Células Dendríticas. 2. Direcionamento de antígenos para DCs. 3. Subtipos de DCs. 4. Resposta imune celular. 5. Resposta imune humoral. I. Boscardin, Silvia Beatriz, orientador. II. Rosa, Daniela Santoro, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Fernando Bandeira Sulczewski

Titulo da Dissertação/Tese: Mecanismo de Geração de Resposta Imune Humoral Induzida pelo Direcionamento do Antígeno $MSP1_{19}$PADRE para Duas Populações Distintas de Células Dendríticas via Receptores DEC205 e DCIR2

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

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

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

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

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICBUSP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Mecanismo de Geração de Resposta Imune Humoral Induzida pelo Direcionamento do Antígeno MSP1(19)-PADRE para Duas Populações Distintas de Células Dendríticas via Receptores DEC205 e DCIR2***", registrado sob o protocolo nº ***105/2015***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **1/10/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Silvia Beatriz Boscardin**
- Membros da Equipe: *Fernando Bandeira Sulczewski (Pós-graduando), Marcio Massao Yamamoto (Técnico de Laboratório)*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Mechanisms of Generation of Humoral immune response induced by targeting of MSP1(19)-PADRE antigen to two different subsets of dendritic cells via DEC205 and DCIR2 receptors***", protocol nº ***105/2015***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **10/1/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Silvia Beatriz Boscardin**
- Team members: Fernando Bandeira Sulczewski (Graduate student), Marcio Massao Yamamoto (Técnico de Laboratório)

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	C57BL/ 6	Fêmea/Female	6-9 semanas/weeks	660

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

À minha família, em especial meus pais (Enio e Elena) que sempre estão comigo e à minha vó pela sua grande inspiração motivacional.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que me apoiaram direta ou indiretamente para chegar até esse momento da minha vida. Todos vocês foram fundamentais para a minha trajetória e a ordem é meramente didática.

Muito Obrigado às agências de fomento a pesquisa, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2015/18874-2), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por tornar esse projeto realidade.

Gostaria de agradecer a minha orientadora, professora Silvia Boscardin. Esses dois anos de convívio foram de muito crescimento profissional e pessoal, seu apoio e principalmente o seu exemplo impulsionaram várias transformações e muito desenvolvimento não apenas na minha formação, mas também na forma de ver o mundo e nas minhas relações com as pessoas. Sua dedicação, competência e sua humildade serão sempre uma grande inspiração. Muito obrigado por todo apoio, por toda ajuda, por todas as conversas, por me direcionar nesse mundo de DCs e por viabilizar a realização desse projeto passando horas discutindo os resultados me ensinando e ORIENTANDO.

Daniela Santoro Rosa, minha coorientadora. As tuas dicas foram indispensáveis para a realização deste trabalho. Muito obrigado por sentar ao meu lado, corrigir os *gates* de citometria, participar dos seminários e contribuir para a minha formação. Você também é um grande exemplo de profissional para mim.

Gostaria de agradecer muito aos colegas de laboratório. Márcio, muito obrigado por me ensinar muita coisa e sempre ajudar em tudo o que foi e vai ser preciso. Bianca, Higo, Kelly, Arthur, Natália, Evelyn, Jéssica muito obrigado pela ajuda, pelo companheirismo, pelos conselhos e por juntos fazermos sempre um trabalho em equipe. Sem ajuda de vocês esse trabalho não seria possível. Muito obrigado por acordarem às 5 horas da manhã para me ajudar. Entretanto, gostaria a cima de tudo agradecer a amizade, o apoio, os conselhos, as conversas, as risadas. Enfim, obrigado por fazerem essas experiências uma grande experiência de vida.

Muito obrigado ao Laboratório de Vacinas Experimentais da UNIFESP (Juliana, Marcelo, Edgar, Marcela, Victória e Fernanda) por todo o apoio e por todas as discussões de resultados. Gostaria de agradecer também ao Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, em especial a Bruna e a Carol pela grande ajuda com o Citômetro, ao Laboratório de Imunoparasitologia Experimental e o Laboratório de Leishmanioses.

Gostaria de agradecer também aos meus amigos. Flávia e Bruna obrigado por me entenderem e sempre estar ao meu lado nesse período. Aliás, Flávia muito obrigado por dividir seus conhecimento de citometria comigo, aprendi muito contigo. Raquel, minha prima, obrigado por estar ao meu lado até mesmo longe, você sempre faz parte da minha trajetória.

Dérick muito obrigado por fazer esse período mais humano. Você trouxe mais alegria e sentido para minha vida. O teu suporte foi fundamental nessa última etapa do mestrado. Muito obrigado por me incentivar, por acreditar em mim e me encorajar, as tuas palavras me ajudaram muito. Muito obrigado por aguentar os meus momentos de estresse e sempre me ajudar a sair deles.

Minha irmã, Aline, suas palavras foram sempre reconfortantes. Muito obrigado por estar sempre do meu lado, por acreditar em mim. Muito obrigado também por sempre manter todos unidos. Muito obrigado Germano por participar desse processo e contribuir em tudo o que foi preciso.

Vó, muito obrigado pelo incentivo, desde criança as tuas palavras “tem que estudar nêne” guiaram meus passos até aqui e continuarão guiando por toda a minha vida.

Muito obrigado pai e mãe, vocês sempre me dão um apoio incondicional. Muito obrigado por acreditarem em mim sempre, até mesmo nos momentos que eu mesmo duvidei. Consegui chegar até aqui somente com todo o apoio de vocês, suas palavras foram indispensáveis para que tudo isso fosse possível. Muito obrigado por todo o suporte, por me apoiarem nas decisões “malucas” e entenderem a necessidade de cada vez estar mais longe de vocês. Quero agradecer por serem meus maiores exemplos de seres humanos, de caráter, de dedicação, de vida e principalmente por me darem absolutamente tudo (amor, carinho, educação, ensinamentos, lições, etc) o que conseguiram sem medir esforços para tal.

Trabalho 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 auxílios financeiros concedidos pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2015/18874-2), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

"Não há questões pequenas, as que parecem tal são questões grandes não compreendidas... Constitui a Natureza mecanismo harmônico em que todas as peças, ainda mesmo as que pareçam desempenhar papel acessório, concorrem para o conjunto funcional. É o homem superficial que ao contempla-la, distingue arbitrariamente, seus órgãos em essenciais e secundários. Mas o pensador discreto, ao contrário, contenta-se com classifica-las em conhecidas e pouco conhecidas, prescindindo de tamanho e efeitos úteis imediatos." Santiago Ramón y Cajal

RESUMO

SULCZEWSKI, F.B. **Mecanismo de geração de resposta imune humoral induzida pelo direcionamento do antígeno $MSP1_{19}$PADRE para duas populações distintas de células dendríticas via receptores DEC205 e DCIR2.** [104 páginas. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2017.

As células dendríticas (DCs) são células do sistema imune inato que são especializadas na instrução de repostas imunes adaptativas. Entretanto, há vários subtipos de DCs com diferentes biologias e especializações que podem igualmente instruir respostas distintas. No baço murino, as DCs convencionais podem ser classificadas em $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$. As DCs $CD8\alpha^+$ expressam o receptor endocítico DEC205 e são especializadas na apresentação cruzada de antígenos. Por outro lado, as DCs $CD8\alpha^-$ expressam outro receptor endocítico conhecido como DCIR2 e são principalmente associadas à apresentação de antígenos pela via fagocitica. Anticorpos monoclonais (mAbs) αDEC205 e αDCIR2 conjugados a proteínas antigênicas estão sendo largamente utilizados como estratégia de direcionamento de antígenos para as DCs $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$. Este trabalho tem como objetivo analisar as respostas imunes celular e humoral induzidas pelo direcionamento de uma proteína modelo para esses dois subtipos de DCs via os receptores DEC205 e DCIR2 após a administração de uma ou duas doses dos mAbs chiméricos. Foi utilizado o antígeno quimérico $MSP1_{19}$PADRE conjugado aos mAbs αDEC205 e αDCIR2 juntamente com Poly I:C como adjuvante. A montagem das respostas celular e humoral foi analisada 3, 4, 5 e 6 dias após a imunização para avaliar a resposta inicial e 3, 4, 5 e 6 dias depois da segunda dose para estudar a influência do segundo contato com o antígeno na resposta imune induzida pelo direcionamento de antígenos para cada subtipo de DC. Os resultados obtidos após a administração da primeira dose mostraram que o direcionamento de antígenos para o subtipo de DCs $CD8\alpha^-$ induz uma robusta resposta humoral. Houve um aumento no número de células T auxiliares foliculares (T_{FH}) e células B do centro germinativo (CG), bem como de plasmócitos. Em contrapartida, o direcionamento para o subtipo de DCs $CD8\alpha^+$ induziu um maior número de células produtoras de IFN-γ e células T $CD4^+$ polifuncionais. Já em relação à resposta secundária, o direcionamento de antígenos para as DCs $CD8\alpha^-$ promoveu mudança de classe de IgG e a produção de citocinas com um perfil de resposta auxiliar Th2/Th17. Já quando o antígeno foi direcionado para as DCs $CD8\alpha^+$, houve um aumento progressivo de células T produtoras de IFN-γ, IL-2 e TNF-α, juntamente com células T produtoras somente de IL-10. Além disso, os títulos de anticorpos contra a proteína $MSP1_{19}$ aumentaram depois da segunda dose e ocorreu uma mudança de classe de IgGs. Também houve um aumento de duas populações de células T_{FH} ($CXCR5^{High}PD\text{-}1^{High}$ e $CXCR5^{Inter}PD\text{-}1^{Inter}$) quando o antígeno foi direcionado via DEC205, mas não houve aumento de células B do centro germinativo no período de tempo analisado. Pode-se concluir que o direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^-$ induz inicialmente uma forte resposta humoral, sugerindo que essas DCs são especializadas na instrução de células $T_{FH.}$ Porém, após a administração da segunda dose do mAb de fusão há a instrução de uma resposta Th2/Th17. Já o direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^+$ induz inicialmente uma forte resposta Th1, indicando que essas DCs são especializadas na instrução desse perfil de resposta auxiliar. Apesar disso, após a segunda imunização há a diferenciação de células T_{FH}.

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

ABSTRACT

SULCZEWSKI, F.B. **Mechanism of generation of humoral immune response induced by targeting of $MSP1_{19}$PADRE antigen to two different subsets of dendritic cells via DEC205 and DCIR2 receptors** [104 p. Master Thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2017.

Dendritic cells (DCs) are cells of innate immune system specialized in priming adaptive immune responses. However, there are several DCs subsets with different biology and specializations to prime T cells. In the murine spleen, conventional DCs can be classified into $CD8\alpha^+$ and $CD8\alpha^-$. $CD8\alpha^+$ DCs express the DEC205 endocytic receptor and are specialized in antigen cross-presentation. On the other hand, $CD8\alpha^-$ DCs express another endocytic receptor known as DCIR2 and are mainly associated with the presentation of antigens by the phagocytic pathway. Monoclonal antibodies (mAbs) αDEC205 and αDCIR2 conjugated to antigenic proteins are widely used to target antigens to $CD8\alpha^+$ and $CD8\alpha^-$ DCs. This study aims to analyze the cellular and humoral immune responses induced by the targeting of a model protein to these two DCs subsets via the DEC205 and DCIR2 receptors after the administration of one or two doses of the chimeric mAbs. The $MSP1_{19}$PADRE chimeric antigen was conjugated to mAbs αDEC205 and αDCIR2 and Poly I: C was used as an adjuvant. The humoral and cellular responses were analyzed 3, 4, 5 and 6 days after the immunization to evaluate the initial response and 3, 4, 5 and 6 days after the second dose to study the influence of the second contact with the antigen on the immune response induced by antigen targeting to each DC subtype. The results obtained after the administration of the first dose showed that antigen targeting to $CD8\alpha^-$ DCs induces a robust humoral response. In addition, there was an increase in the number of follicular helper T cells (T_{FH}) and germinal center (CG) B cells, as well as in plasma cells. In contrast, antigen targeting to $CD8\alpha^+$ DCs induced a greater number of IFN-γ-producing cells and polyfunctional $CD4^+$ T cells. When the secondary response was considered, antigen targeting to $CD8\alpha^-$ DCs promoted IgG class switch and the production of cytokines with a Th2/Th17 helper profile. When the antigen was targeted to $CD8\alpha^+$ DCs, there was a progressive increase of IFN-γ, IL-2 and TNF-α producing T cells together with T cells producing only IL-10. In addition, the antibody titres to the $MSP1_{19}$ protein increased after the second dose, and a IgG class switch also happened. There was also an increase in two T_{FH} cell populations ($CXCR5^{High}PD\text{-}1^{High}$ and $CXCR5^{Inter}PD\text{-}1^{Inter}$) when the antigen was targeted via DEC205, but there was no increase of germinal center B cells in the time period analyzed. We can conclude that antigen targeting to $CD8\alpha^-$ DCs initially induces a strong humoral response, suggesting that these cells are specialized in the instruction of T_{FH}. However, after the administration of the second dose of the fusion mAb, there is the instruction of a Th2 / Th17 response. On the other hand, antigen targeting to $CD8\alpha^+$ DCs initially induces a strong Th1 response, indicating that these cells are specialized in the instruction of this auxiliary response profile. Nevertheless, after the second immunization, differentiation of T_{FH} cells occurs.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ontogenia de diferentes subtipos de DC. 24

Figura 2 - Polarização da resposta de células T auxiliares 27

Figura 3 - Reação do centro germinativo..... 29

Figura 4 - mAbs quiméricos 35

Figura 5 - Produção de plasmídeos codificadores da cadeia pesadas dos anticorpos quiméricos fusionadas ao antígeno MSP119PADRE 48

Figura 6 - Produção dos mAbs 49

Figura 7 - Ensaio de ligação dos mAbs em células CHO expressando os receptores DEC205 e DCIR2 murinos. 50

Figura 8 - Ensaio de ligação dos mAbs a esplenócitos.. 51

Figura 9 - Estratégia de análise de DCs $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$ por citometria de fluxo..... 52

Figura 10 - Expressão de moléculas co-estimulatórias em DCs..... 53

Figura 11 - Expressão de citocinas inatas induzidas pelo direcionamento de antígenos para os diferentes subtipos de DCs. 54

Figura 12 - Estratégia de análise de células T_{FH} por citometria de fluxo.. 55

Figura 13 - Resposta celular induzida pelo direcionamento de antígenos via DEC205 e DCIR2.. 56

Figura 15 - Resposta humoral induzida pelo direcionamento de antígenos via DEC205 e DCIR2. 58

Figura 16 - Células secretoras de anticorpos específicos contra a $MSP1_{19}$. 59

Figura 18 - Estratégia de análise de células T_{FH} por citometria de fluxo.. 61

Figura 19 - Diferenciação de Células T_{FH}..... 63

Figura 20 - Expressão de Bcl-6 em células T_{FH} e não-T_{FH}:. 64

Figura 21 - Estratégia de análise de células B do centro germinativo. 65

Figura 22: Formação do centro germinativo.. 66

Figura 23 - Estratégia de análise de células B Plasmáticas. 67

Figura 24 - Diferenciação de células B plasmáticas. 68

Figura 25 - Células T $CD4^+$ participam da formação de centros germinativos, diferenciação de plasmócitos e da produção de anticorpos quando o antígeno é direcionado para DCs $CD8\alpha^-$. 70

Figura 26 - Citometria de fluxo de células T_{FH}, das células B do centro germinativo e dos plasmócitos. 71

Figura 27 - ELISpot de células produtoras de IFN-γ. 73

Figura 28 - Expressão de IFN-γ, IL-2 e TNF-α em células T $CD4^+$ induzidas pelo direcionamento de antígenos via DEC205 e DCIR2 74

Figura 29 - Células produtoras de uma, duas ou três citocinas no sexto dia após a segunda dose. 75

Figura 30 - Expressão de IL-10 em células T $CD4^+$ induzidas pelo direcionamento de antígenos via DEC205 e DCIR2. 76

Figura 31 - Resposta humoral induzida pelo direcionamento de antígenos via DEC205 e DCIR2. 77

Figura 32 - Subtipos de IgG. 79

Figura 33 - Citometria de fluxo de células T_{FH}. 81

Figura 34 - Citometria de fluxo de células B do centro germinativo: 83

Figura 35 - Citometria de fluxo de plasmócitos. 84

Figura 36 - Citocinas induzidas pelo direcionamento de antígenos para DCs. 86

Figura 37 - Citometria de fluxo de células T_{FH}, de células B do centro germinativo e de plasmócitos. 87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
APCs	Células apresentadoras de antígenos
Bcl-6	Do inglês “B-cell lymphoma 6 protein”
Blimp-1	Do inglês “B lymphocyte-induced maturation protein-1”
CD	Do inglês “cluster of differentiation”
cDC	Célula dendrítica convencional
cDC1	Célula dendrítica convencional tipo 1
cDC1	Célula dendrítica convencional tipo 2
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementar
CDP	Do inglês “Common DC precursor”
CG	Centro Germinativo
cMoP	Do inglês “Common Macrophage Precursor”
CMP	Do inglês “Common myeloid precursor”
CXCR5	Receptor de quimiocina CXC5
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DCs	Célula dendrítica
g	Gramas
IL	Interleucina
IFN	Interferon
M	Molaridade/molar
MDA-5	do inglês “melanoma differentiation-associated gene 5”
MDP	Do inglês “Macrophage and DC Precursor”
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
mM	Milimolar
$MSP1_{19}$	Fragmento de 19kDaA da proteína 1 de superfície de merozoito
ng	Nanogramas
PADRE	do inglês “Pan allelic DR epitope”
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Salina fosfatada tamponada
PD-1	Proteína de morte celular programada-1

pDC	Célula dendrítica plasmocitoide
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RPM	Rotações por minuto
STAT3	Do inglês “signal transducers and activators of transcription 3”
TCR	Receptor de células T
T_{FH}	Célula T auxiliar folicular
T_{FH}	Célula T auxiliar folicular
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF	Do inglês “tumor necrosis factor”
XCR1	Receptor de quimiocina tipo C

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

LISTA DE FÓRMULAS

$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amônia
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CO_2	Dióxido de carbono
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Bicarbonato de potássio
$KHCO_3$	Bicarbonato de potássio
Na_2HPO_4	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NH_4Cl	Cloreto de Amônio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

1.1 Células Dendríticas 21

1.1.1 Ontogenia e classificação de DCs 22

1.1.2 DCs CD8α^+ 25

1.1.3 DC CD8α^- 25

1.2 Resposta de celular induzida por DCs 26

1.3 Influência de DCs na Resposta Humoral 28

1.4 Direcionamento de Antígenos para DCs 30

2 OBJETIVOS 36

2.1 Objetivo Geral 36

2.2 Objetivos Específicos 36

3 MATERIAL E MÉTODOS 37

3.1 Camundongos 37

3.2 Clonagem dos mAbs quiméricos e produção das proteínas recombinantes $MSP1_{19}$ e $MSP1_{19}$PADRE 37

3.3 Produção de plasmídeos em larga escala 38

3.4 Produção dos mAbs αDEC205-$MSP1_{19}$PADRE, αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE e ISO-$MSP1_{19}$PADRE 39

3.5 Ensaio de Ligação em Células CHO 40

3.6 Ensaio de Ligação em DCs 40

3.7 Imunizações e obtenção da suspensão de células do baço 41

3.8 Determinação do número de células produtoras de IFN-γ 41

3.9 Marcação intracelular de citocinas 42

3.10 ELISA 43

3.11 Quantificação do número de células secretoras de anticorpos 44

3.12 Imunofenotipagem 44

3.12.1 Expressão de moléculas co-estimulatórias em DCs 44

3.12.2 Instrução de células T_{FH} 45

3.12.3 Marcação intracelular de Bcl-6 em células T_{FH} 45

3.12.4 Formação de centros germinativos e diferenciação de plasmócitos 45

3.12.5 Aquisição e análise dos dados 46

3.13 Produção de citocinas 46

3.14 Análise estatística 47

4 RESULTADOS 48

4.1 Produção dos mAbs quiméricos 48

4.2 Resposta inata no direcionamento de antígenos para DCs 51

4.3 Resposta celular inicial induzida pelo direcionamento de antígenos para DCs. 55

4.4 Resposta humoral inicial induzida pelo direcionamento de antígenos para DCs 57

4.5 Instrução de células T_{FH}, formação de CG e diferenciação de plasmócitos após a administração da primeira dose da imunização 61

4.6 Análise da influência de células T $CD4^+$ na formação de centro germinativo, diferenciação de plasmócitos e na produção de anticorpos 69

4.7 Análise de células T_{FH}, do centro germinativo e dos plasmócitos antes da segunda dose 70

4.8 Resposta imune celular após a segunda dose da imunização 71

4.9 Resposta imune humoral após a segunda dose da imunização 76

4.10 Análise da polarização de células T $CD4^+$ para T_{FH}, formação de centros germinativos e diferenciação de plasmócitos após a administração da segunda dose dos mAbs quiméricos 80

4.11 Determinação da produção de citocinas induzidas pelo direcionamento do antígeno para as DCs 85

5 DISCUSSÃO 88

6 CONCLUSÃO 93

REFERÊNCIAS* 95

1 **INTRODUÇÃO**

1.1 Células Dendríticas

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

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

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

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

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

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

1.1.1 Ontogenia e classificação de DCs

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

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

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

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

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

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

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

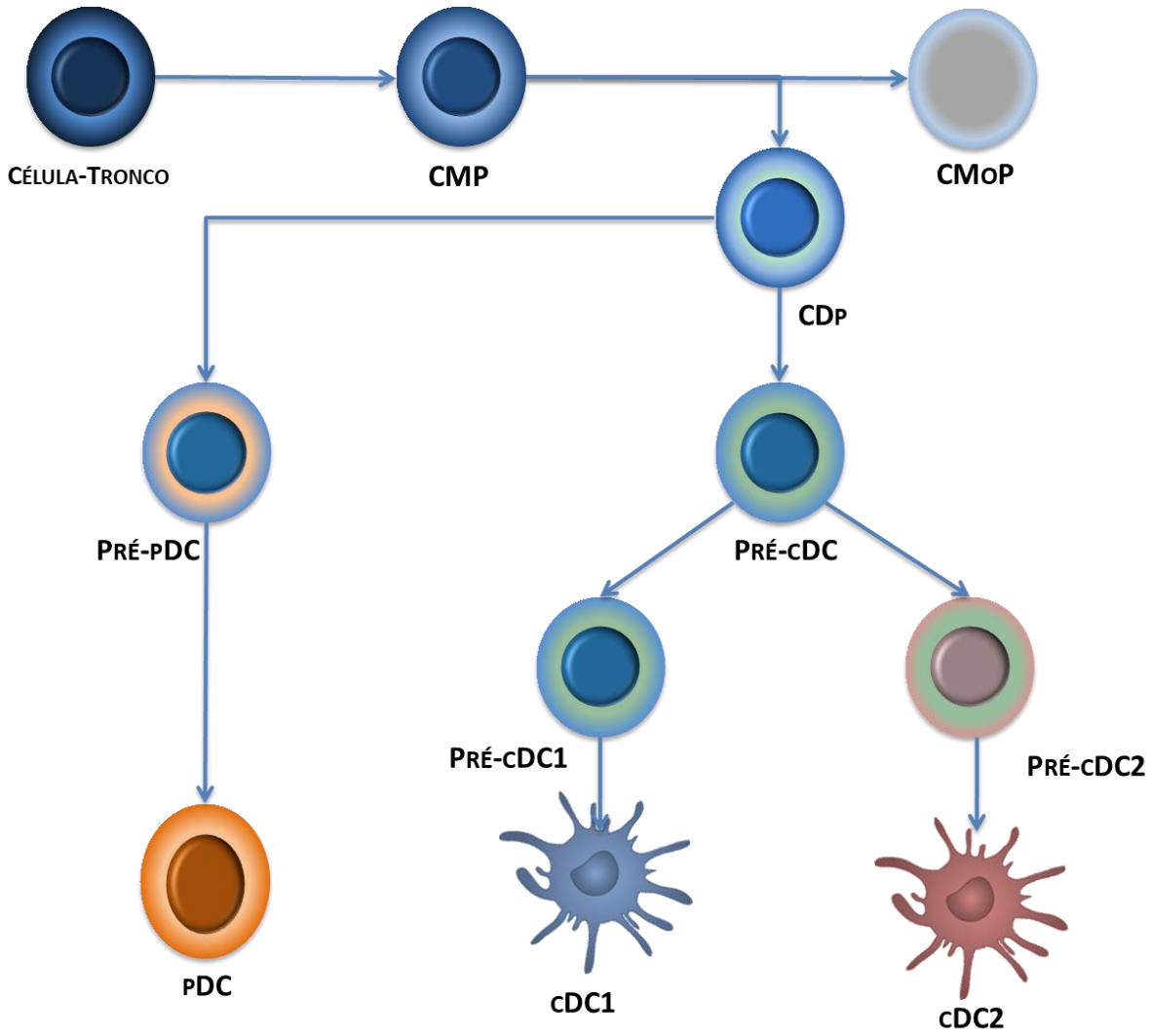


Figura 1 - Ontogenia de diferentes subtipos de DC. Esquema de classificação baseado na ontogenia das DCs. A célula-tronco hematopoiética diferencia-se em precursor mieloide comum (CMPs) que origina o precursor comum de monócitos (CMoP) e o precursor comum de DC (CDP). O CDP se diferencia em pré-DC que pode ser pré-pDC que posteriormente se diferencia em pDC ou pré-cDC. Essa pré-DC pode originar tanto pré-cDC1 que dará origem a cDC1quanto a pré-cDC2 que se diferencia em cDC2.

1.1.2 DCs CD8α$^+$

As DCs CD8α$^+$ são cDCs1 presentes nos órgãos linfoides como o baço e o linfonodo de camundongos, sendo histologicamente localizadas na zonas de células T (CROZAT et al., 2011; DUDZIAK et al., 2007). Essas células são especializadas na apresentação cruzada de antígenos para células T, sendo capazes de fagocitar células mortas e apresentar antígenos para células T CD4$^+$ e T CD8$^+$ simultaneamente, processo fundamental na indução de imunidade em infecções virais (ALLAN et al., 2003; IYODA et al., 2002). As DCs CD8α$^+$ possuem uma maquinaria especializada nesse processo de apresentação de antígenos, expressando inclusive Clec9a, um receptor para células necróticas (SANCHO et al., 2009). Além disso, esse subtipo de DC está envolvido com a manutenção da tolerância periférica, na ausência de inflamação e sinais de danos, as DCs CD8α$^+$ são especializadas na instrução de células T reguladoras (YAMAZAKI et al., 2008).

As DCs CD8α$^+$ também expressam em sua membrana o receptor endocítico DEC205, também chamado de CD205 (JIANG et al., 1995). Ele é membro da família de receptores de lectinas do tipo C, apresentando diversas funções, entre elas a captura e a internalização de antígenos que se ligam a ele (MAHNKE et al., 2000). Além disso, ele realiza a endocitose pela via de endossomos tardios, o que favorece ainda mais a apresentação cruzada de antígenos, estimulando tanto a via de MHC de classe I quanto a via de MHC de classe II, possibilitando a instrução tanto de células T CD8$^+$ quanto de T CD4$^+$, respectivamente (BONIFAZ et al., 2002).

1.1.3 DC CD8α$^-$

As DCs CD8α$^-$ também estão presentes no baço e nos linfonodos de camundongos mas, diferentemente das DCs CD8α$^+$, estão localizadas nas zonas marginais às células B na polpa vermelha do baço (SHIN et al., 2016). Estas células, além de serem negativas para a cadeia alfa da molécula CD8, expressam o marcador de superfície CD11b, sendo consideradas cDC2. As DCs CD8α$^-$ são especializadas em apresentação de antígenos via MHC de classe II, sendo principalmente associadas à instrução de respostas T auxiliares com um perfil Th2 (DUDZIAK et al., 2007).

Além desses marcadores, as DCs CD8α$^-$ também expressam outro receptor endocítico, o DCIR2, que é um receptor de superfície que também pertence à família das lectinas do tipo C (NUSSENZWEIG et al., 1982). Quando este receptor se liga a algum antígeno, ele também estimula a sua internalização. Assim, a ação do DCIR2 na captura do antígeno pela DC é importante para o início da resposta inata que culminará na ativação da resposta imune específica contra os antígenos endocitados (STEINMAN, 2007).

1.2 Resposta de celular induzida por DCs

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

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

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

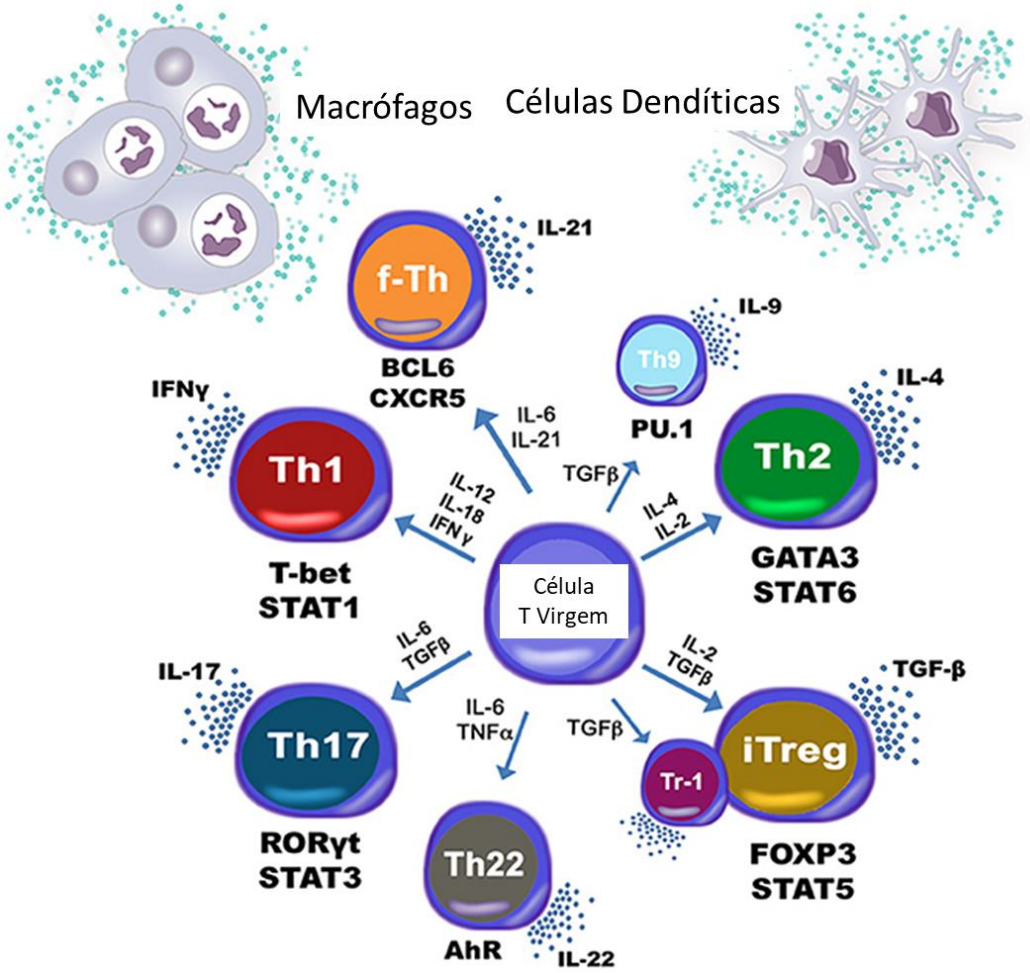


Figura 2 - Polarização da resposta de células T auxiliares. Diferentes polarizações da resposta de células T auxiliares. As células T virgens, durante, em um processo de apresentação de antígeno, recebem sinais da APC que instruem sua polarização para Th1 (IL-12, IL-18 IFN-γ), Th2 (IL-4, IL-2), Th17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

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

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

1.3 Influência de DCs na Resposta Humoral

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

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

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

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

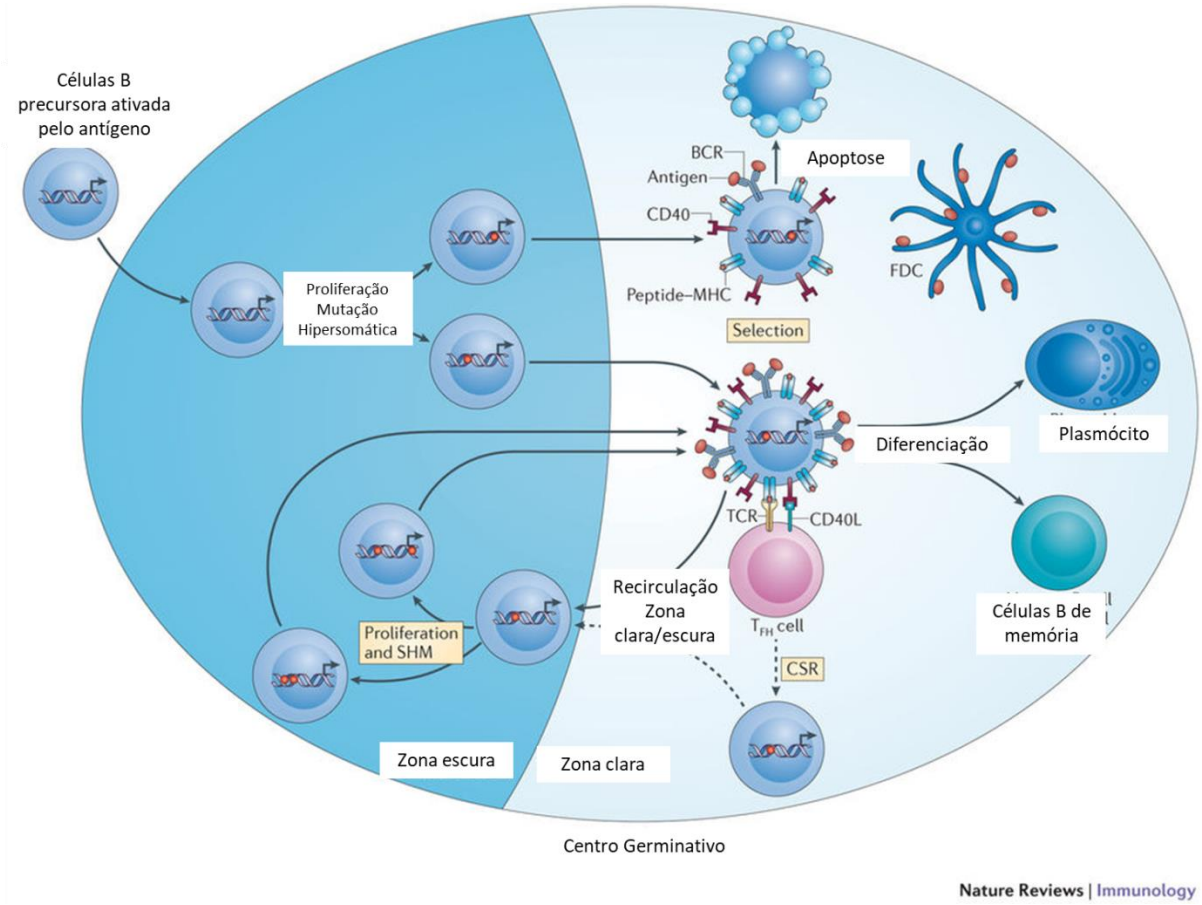


Figura 3 - Reação do centro germinativo. As células B ativadas formam o centro germinativo migrando pela zona escura, onde proliferam intensamente e sofrem hipermutação somática. As células migram então para a zona clara onde são selecionadas positivamente e se diferenciam em plasmócitos ou em células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

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

1.4 Direcionamento de Antígenos para DCs

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

Dessa forma, dependendo do receptor que a DC expressa, pode-se direcionar antígenos especificamente para um subtipo DC, como é o caso das DCs murinas linfoides $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$. Para o direcionamento de antígenos para as DCs $CD8\alpha^+$ pode-se utilizar um anticorpo para o receptor DEC205 e para as DCs $CD8\alpha^-$, um anticorpo para o receptor DCIR2 (LEHMANN et al., 2016). Essa estratégia foi desenvolvida a partir de 2000 com a produção dos anticorpos monoclonais αDEC205 e αDCIR2 e, desde então, vem demonstrando resultados bastante promissores na criação e otimização de vacinas contra agentes infecciosos e câncer (STEINMAN, 2012). O anticorpo NLDC-145 liga-se especificamente ao receptor DEC205 altamente expresso por DCs $CD8\alpha^+$, já o anticorpo monoclonal 33D1 liga-se ao receptor DCIR2 nas DC $CD8\alpha^-$ (JIANG et al., 1995; NUSSENZWEIG et al., 1982).

A administração *in vivo* dos anticorpos NLDC-145 (αDEC205) e 33D1 (αDCIR2) promove a ligação do αDEC205 nas DCs $CD8\alpha^+$ esplênicas, bem como em células B, NK e em outros granulócitos e do αDCIR2 somente às DCs $CD8\alpha^-$ (IDOYAGA et al., 2011). Imunizações com a utilização de ambos os anticorpos conjugados a antígenos têm mostrado resultados que indicam a indução de fortes respostas adaptativas aos antígenos e inclusive proteção a desafios com patógenos (AMORIM;RAMPAZO; et al., 2016; APOSTOLICO et al., 2017; BOSCARDIN et al., 2006; CHAPPELL et al., 2012; DO et al., 2010; DUDZIAK et al., 2007; HENRIQUES et al., 2013; RAMPAZO et al., 2015; SHIN et al., 2015).

Na realidade, o primeiro estudo de direcionamento de antígeno para a DC CD8α$^+$ foi realizado em 2001 por Hawiger e colaboradores. Nesse estudo, utilizaram a lisozima de ovo de galinha como antígeno modelo complexada ao αDEC205. Sua administração *in vivo* seletivamente estimulou as DCs CD8α$^+$ instruir uma resposta específica de células T (HAWIGER et al., 2001). Já Bonifaz e colaboradores em 2002 usaram a ovalbumina conjugada ao mesmo anticorpo, mostrando que as DCs CD8α$^+$ eficientemente podem processar e apresentar o antígeno via MHC de classe I à células T CD8$^+$ (BONIFAZ et al., 2002). Por outro lado, a imunização com o anticorpo 33D1 teve precedentes em 1996 quando Finkelman e colaboradores injetaram diretamente o anticorpo de ratos em camundongo e verificaram uma robusta resposta humoral, porém ainda sem saber qual era o alvo desse anticorpo (FINKELMAN et al., 1996).

Esses primeiros resultados indicaram que na ausência de estímulo inflamatório, quando a DC está imatura, o direcionamento de antígeno para a DC CD8α$^+$ induz uma resposta de tolerância ao antígeno, e esses resultados foram sistematicamente confirmados (BONIFAZ et al., 2002; ETTINGER et al., 2012; FINKELMAN et al., 1996; PETZOLD et al., 2012; SPIERING et al., 2015). Contudo, na presença de um adjuvante e inflamação, o direcionamento do mesmo antígeno para essa DC induz uma forte resposta de células T (BONIFAZ et al., 2002; BONIFAZ et al., 2004; HENRIQUES et al., 2013; RAMPAZO et al., 2015).

Os primeiros indícios referentes ao direcionamento de antígenos para DCs CD8α$^-$ via DCIR2 mostravam que na ausência de um estímulo inflamatório a imunização com αDCIR2 era capaz de induzir células efetoras (CHAPPELL et al., 2012; FINKELMAN et al., 1996).. Contudo, revelou-se que na ausência de adjuvante a resposta de células T era apenas de curta duração, sendo necessário um estímulo inflamatório para a maturação da DC e promoção de uma resposta duradoura (DUDZIAK et al., 2007).

O αCD40 é um dos adjuvantes mais frequentemente utilizados nos protocolos de imunização que envolvem o direcionamento de antígenos para as DCs CD8α$^+$ e CD8α$^-$. Ele se liga diretamente no CD40 promovendo o aumento da expressão das moléculas co-estimulatórias (BONIFAZ et al., 2004; BOSCARDIN et al., 2006; DUDZIAK et al., 2007; HEATH;WU ;HOWARD, 1994). Além disso, ligantes de TLR também são utilizados, sendo o mais frequente o Poly I:C que liga-se nos receptores TLR3 e MDA-5 (AMORIM;RAMPAZO; et al., 2016; HENRIQUES et al., 2013; RAMPAZO et al., 2015; SHIN et al., 2016; SHIN et al., 2015). Na realidade, a administração de Poly I:C no direcionamento de antígenos via DEC205 tem se mostrado como o melhor adjuvante a ser

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

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

Os primeiros estudos direcionando antígenos de relevância clínica foram realizados com as proteínas circumsporozoita (CS) de *Plasmodium yoelii,* com a proteína GAG do vírus HIV, com a proteína LACK de *Leishmania major* e com a proteína de virulência (LcrV) de *Yersinia pestis*. Nesses estudos, houve a indução de uma robusta resposta celular, tanto de células T $CD8^+$ quando de células T $CD4^+$ e uma forte resposta humoral com altos títulos de anticorpos específicos a proteína direcionada. No caso do direcionamento do LcrV de *Yersinia pestis,* foi o primeiro relato de uma resposta imune protetora quando camundongos foram imunizados com αDEC205 e αDCIR2 e desafiados com o patógeno (BOSCARDIN et al., 2006; DO et al., 2010; SOARES et al., 2007; TRUMPFHELLER et al., 2008).

Sabe-se que o direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^+$ induz tanto resposta de células T $CD8^+$ quanto de células T $CD4^+$ que proliferam e produzem as citocinas IL-2, TNF-α e IFN-γ, típicas de uma resposta Th1 (AMORIM;RAMPAZO; et al., 2016; APOSTOLICO et al., 2017; HENRIQUES et al., 2013; RAMPAZO et al., 2015). Entretanto, ainda existem controvérsias referentes ao direcionamento de antígenos para as DCs $CD8\alpha^-$. Há estudos que mostram que o direcionamento via DCIR2 pode induzir uma proliferação de células T $CD4^+$ dez vezes maior que o direcionamento via DEC205 (DUDZIAK et al., 2007). Entretanto, em sistemas abertos, a proliferação induzida pelo direcionamento via DEC205 é superior a imunização com αDCIR2 (BARBOSA, 2011; ANTONIALLE 2013) . Além disso, há resultados que mostram que a resposta humoral inicial induzida pelo direcionamento via DCIR2 é superior a resposta induzida pelo direcionamento via DEC205, mas o nível de

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

No caso de estímulos via anticorpo αDCIR2, há evidências que DCs da zona marginal ao CG e da zona de células T induzam a ativação de células B extrafoliculares e de células T $CD4^+$. As células B ativadas migram para a zona de células T e interagem com estas células resultando em intensa proliferação das células T_{FH} e B. Entretanto, este estudo foi realizado sem a utilização de qualquer adjuvante (CHAPPELL et al., 2012). Por outro lado, no direcionamento via DEC205, há evidências que as células B do CG também expressam o receptor DEC205 (VICTORA et al., 2010). Dessa forma, essas células também poderiam participar da indução da resposta humoral no direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^+$.

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

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

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

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

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

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

Para isso, foi utilizado um antígeno quimérico descrito com Rosa e colaboradores (2004) formado por uma proteína derivada de *Plasmodium vivax* conjugada ao epítopo PADRE (do ingês "*Pan allelic DR epitope*"). Essa proteína é formada pelo fragmento de 19 kDa da proteína 1 de superfície de merozoito ($MSP1_{19}$). Na verdade, ela é um fragmento que se origina da proteólise da proteína MSP1 no processo de invasão do parasito ao eritrócito que é alvo de uma forte resposta humoral e tem sido utilizado no desenho de vacinas que visam a indução de anticorpos contra o parasita (WILSON et al., 2011). Já o PADRE é um epítopo sintético criado para ligar-se fortemente às moléculas de MHC II humano mais frequentes na população, sendo também reconhecido pelo haplótipo I-A/I-E^b de camundongos C57BL/6, e assim induzir uma forte resposta de células T $CD4^+$ (DEL GUERCIO et al., 1997). Dessa forma, a $MSP1_{19}$ é utilizada como alvo da resposta humoral enquanto o PADRE como alvo da resposta celular (ROSA et al., 2004).

A sequência do cDNA da proteína $MSP1_{19}$ foi clonada previamente juntamente com do antígeno PADRE nos plasmídeos codificadores da cadeira pesada dos anticorpos αDEC205, αDCIR2 e no isotipo controle por Barbosa (2011). Os mAbs quiméricos obtidos foram denominados αDEC205-$MSP1_{19}$PADRE, αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE e ISO-$MSP1_{19}$PADRE. A figura 4 mostra a estrutura desses mAbs formados pela cadeia leve e pesada de cada anticorpo monoclonal. Como nota-se na figura, o antígeno $MSP1_{19}$PADRE foi clonado na porção C-terminal da cadeia pesada dos anticorpos. Importante ressaltar que esses anticorpos possuem uma mutação na porção Fc que impede que se liguem ao receptor Fc presente em outras APCs. As imunizações de camundongos com esses mAbs quiméricos induziram forte resposta de células T $CD4^+$ e altos títulos de anticorpos específicos para a $MSP1_{19}$.

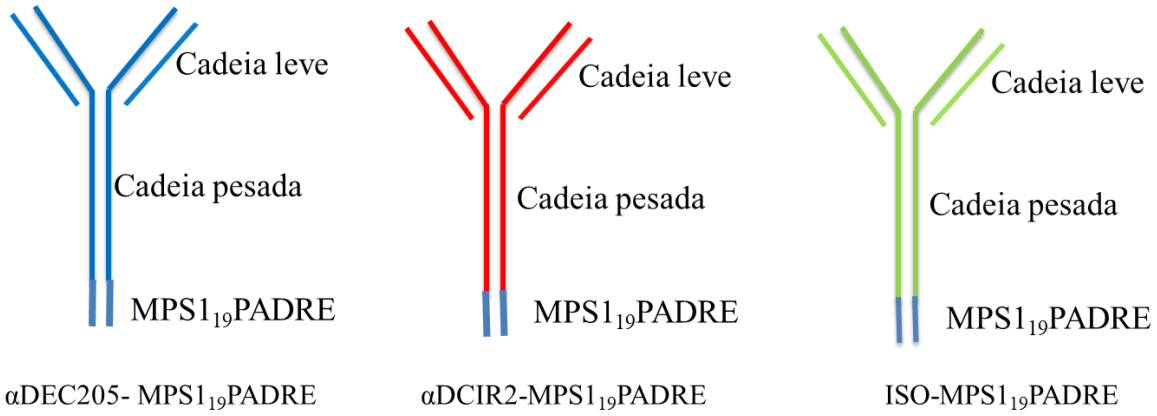


Figura 4 - mAbs quiméricos. Figura esquemática da estrutura dos mAbs quiméricos αDEC205-$MSP1_{19}$PADRE, αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE e ISO-$MSP1_{19}$PADRE. O antígeno MSP119PADRE está fusionado à cadeia pesada de cada anticorpo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a geração das respostas celular e humoral induzidas pelo direcionamento da proteína $MSP1_{19}$PADRE para dois subtipos de DCs via DEC205 e DCIR2 após a primeira imunização e após o segundo contato com o antígeno.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir e avaliar a integridade e a função dos anticorpos αDEC205-$MSP1_{19}$PADRE, αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE e ISO-$MSP1_{19}$PADRE;
- Avaliar a resposta celular quando o antígeno é direcionado para DCs $CD8\alpha^-$ ou DCs $CD8\alpha^+$ *in vivo* 3, 4, 5 e 6 dias após a administração da primeira e segunda doses da imunização;
- Avaliar a produção de anticorpos específicos anti-$MSP1_{19}$ quando o antígeno é direcionado para DCs $CD8\alpha^-$ ou DCs $CD8\alpha^+$ *in vivo* 3, 4, 5 e 6 dias após a administração da primeira e segunda doses da imunização;
- Analisar a diferenciação de células T_{FH} e a resposta de células T $CD4^+$ 3, 4, 5 e 6 dias após a administração da primeira e segunda doses da imunização;
- Avaliar a formação de Centros Germinativos e Células B plasmáticas 3, 4, 5 e 6 dias após a administração da primeira e segunda doses da imunização.
- Determinar a especialização dos subtipos de DCs $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$ na instrução da resposta adaptativa;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas com idade entre 4 e 8 semanas provenientes do Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia da USP. Além disso, utilizou-se também camundongos CD4 nocaute (CD4 KO) com fundo C57BL/6 com idade entre 4 a 8 semanas provenientes do Biotério de Matrizes do Instituto de Ciências Biomédicas. Os camundongos foram mantidos em condições livres de patógenos ao longo do tempo necessário para o estudo e com água e comida *ad libitum*. Os procedimentos adotados para a manipulação dos animais estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e foram aprovados por este comitê com o número 105/2015.

3.2 Clonagem dos mAbs quiméricos e produção das proteínas recombinantes $MSP1_{19}$ e $MSP1_{19}$PADRE

Os plasmídeos codificadores da cadeia pesada foram previamente clonados por Barbosa (2011). A sequência do cDNA da proteína $MSP1_{19}$ foi clonada juntamente com do antígeno PADRE nos plasmídeos codificadores das cadeias pesadas dos anticorpos αDEC205, αDCIR2 e ISO (gentilmente cedidos pelo Dr. Michel C. Nussenzweig, The Rockefeller University, Estados Unidos) formando assim os plasmídeos pDEC205-$MSP1_{19}$PADRE, pDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE e pISO-$MSP1_{19}$PADRE. Esses plasmídeos foram produzidos em larga escala para a produção dos mAbs quiméricos juntamente com os plasmídeos codificadores das cadeias leves de cada anticorpo (pDEC kappa, pDCIR2 kappa e pISO kappa).

As proteínas recombinantes $MSP1_{19}$ e $MSP1_{19}$PADRE também foram produzidas de acordo com a padronização de Barbosa (2011).

3.3 Produção de plasmídeos em larga escala

Os plasmídeos codificadores dos anticorpos αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e ISO-MSP1$_{19}$PADRE (isotipo controle) foram produzidos em bactérias DH5α. Cinquenta (50) ng de cada plasmídeo foram adicionados em 10 µL de suspensão de bactérias competentes DH5α completando o volume para 100 µL com 0,1 M de cloreto de cálcio ($CaCl_2$). Após a incubação de 30 minutos no gelo, foi realizado um choque térmico por 40 segundos a 42 °C no banho-maria seguido de outra incubação de 5 minutos no gelo. Após, 500 µL de meio Luria-Bertani (LB) (Sigma®) foram adicionados e as bactérias foram incubadas a 37 °C com agitação de 200 RPMs por 1 hora. Então, as bactérias foram centrifugadas a 2000 RPMs por 3 minutos e 400 µL do sobrenadante foi retirado. O pellet foi ressuspendido e semeado em meio ágar-LB com 100 µg/mL de ampicilina em uma placa de Petri. Depois de uma incubação *over night* a 37 °C foi realizado um pré-inóculo, utilizando uma única colônia em 5 mLs de meio LB com 100 µg/mL de ampicilina, que permaneceu *over night* a 37 °C com agitação de 200 RPMs. O inóculo foi preparado a partir do pré-inóculo em 500 mL de meio LB com 100 µg/mL e este novamente foi incubado *over night* a 37 °C com agitação de 200 RPMs.

O DNA plasmidial foi extraído com a utilização do kit "PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit" (Thermo Fisher Scientific®) de acordo com as indicações do fabricante. Após o crescimento das bactérias, a cultura foi transferida para tubos de centrífuga e centrifugadas a 8.000 g por 20 minutos a 4 °C. O pellet foi ressuspendido em 10 mL de tampão de ressuspensão. Após a ressuspensão completa das bactérias foram adicionados 10 mL de tampão de lise e o pellet foi homogeneizado. Depois de uma incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, 10 mL de tampão de precipitação foram adicionados sendo a mistura homogeneizada por inversão até a solução parecer homogênea. Após uma centrifugação por 10 minutos a temperatura ambiente a 12.000 xg, o sobrenadante foi então transferido para uma coluna previamente equilibrada com 10 mL de tampão de equilíbrio. Após passar pela coluna, foram utilizados 60 mL de solução de lavagem e o DNA foi eluído em 15 mL de tampão de eluição em um tubo cônico de 50 mL e foram acrescentados 10.5 mL de isopropanol seguido de centrifugação a 12.000 g por 30 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi cuidadosamente lavado com 5 mL de etanol 70% no fluxo laminar *over night* para sepsia da amostra, sendo posteriormente centrifugado 2.000 g por 30 minutos a 4 ºC e ressuspendido em 500 µL água ultra pura estéril. Os plasmídeos pDEC205-

MSP1$_{19}$PADRE, pDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e pISO-MSP1$_{19}$PADRE foram submetidos a uma eletroforese em gel de 1% de agarose e armazenados a -20 °C até o momento do uso.

3.4 Produção dos mAbs αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e ISO-MSP1$_{19}$PADRE

A produção dos mAbs quiméricos αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e ISO-MSP1$_{19}$PADRE foi realizada por transfecção transiente de células HEK293T (ATCC No CRL-11268) de acordo com Barbosa (2011). Brevemente, essas células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 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) e em placas de 150 mm (Corning). Quando as células atingiram confluência de aproximadamente 70%, o meio foi trocado por meio DMEM substituindo o soro fetal bovino por 1% de nutridoma (Roche). Em seguida, as células foram transfectadas com os plasmídeos codificadores das cadeias leve e pesada dos mAbs αDEC205, αDCIR2 e ISO em fusão com a proteína MSP1$_{19}$PADRE. Para isso, 10 µg de cada plasmídeo foram adicionados a uma solução salina de 150 mM de NaCl e misturados a 100 µL polietilenimina (0,45 mg/mL) por placa sendo agitado em vórtex por 10 segundos e incubado 10 minutos a temperatura ambiente. O volume final de 1,1 mL foi transferido para cada placa. As células transfectadas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% CO_2 por 7 dias.

Após 7 dias os mAbs foram precipitados e purificados. O sobrenadante das células foi coletado e centrifugado a 7.500 xg por 20 minutos sendo filtrado em filtros de 0,22 µm (Corning®). Os anticorpos presentes no sobrenadante foram precipitados com sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$ 60% em uma relação massa/volume permanecendo *over night* em agitação. Depois deste período, os sobrenadantes foram centrifugados e o pellet foi ressuspendido em PBS 1 X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4). Para remoção do sulfato de amônia foi realizada uma diálise em 2 L de PBS 1 X gelado por 16-20 horas. Após a diálise, os anticorpos foram purificados por cromatografia de afinidade a esferas de proteína G (Amersham) na proporção de 1 mL de esferas para 50 mL de anticorpo. Após a incubação *over night* a 4 °C em constante agitação, essa suspensão foi centrifugada a 800 g por 5 minutos, o pellet formado pelas esferas ligadas aos anticorpos de interesse foi transferido para uma coluna de cromatografia (BioRad) e as esferas foram lavadas com 5 mL de PBS 1X. A eluição foi realizada em tampão glicina 0,1 M, pH 3,0 e foram coletadas

alíquotas de 500 μL contendo 50 μL de tampão Tris-HCl 1 M pH 8,0 para neutralização. A solução de tris-glicina foi então substituída por PBS 1 X em uma diálise e a solução contendo os anticorpos quiméricos foi filtrada novamente em filtros de 0,22 μm e quantificada no Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific). A integridade foi determinada por SDS PAGE 12% em condições redutoras. Para isso 1 μg de cada anticorpo foi adicionado a tampão de amostra e aquecido a 95 °C na presença de Ditiotreitol (DTT) e posteriormente transferido para o gel de poliacrilamida 12% que foi corado com Coomassie Blue (Amresco) após a eletroforese.

3.5 Ensaio de Ligação em Células CHO

A ligação do mAbs quiméricos em seu receptor foi avaliada pela sua ligação em células CHO transgênicas que expressam os receptores DEC205 ou DCIR2. As células CHO-DEC205 e CHO-DCIR2 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Michel Nussenzweig (The Rockefeller University, Estados Unidos). Essas células foram incubadas com 5, 0,5, e 0,05 μg/mL dos anticorpos αDEC205-MSP1_{19}PADRE, αDCIR2-MSP1_{19}PADRE e ISO-MSP1_{19}PADRE ou somente com tampão de citometria (PBS 1 X mais 2% de soro fetal bovino) como controle negativo por 30 minutos no gelo. Após esse período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com tampão de citometria e incubadas com αIgG-Alexa Flour 488 (Thermo Scientific) por 30 minutos no gelo. Depois de duas lavagens, as células foram transferidas para tubos e a citometria de fluxo foi realizada. A aquisição foi realizada no FACS CALIBUR (BD Bioscience) e analisada no software FlowJo (versão 9.3, Tree Star, San Carlo, CA).

3.6 Ensaio de Ligação em DCs

Foram utilizado células de baço de camundongos C57BL/6 obtidas de acordo com a descrição na seção “3.7 Imunizações e obtenção da suspensão de células do baço” Cinco milhões ($5x10^6$) de esplenócitos foram primeiramente incubados com Fc block (BD Bioscience) para evitar ligações inespecíficas. Depois de 2 lavagens das células com tampão de citometria, 5, 0,5 e 0,05 μg/mL dos anticorpos αDEC205-MSP1_{19}PADRE, αDCIR2-MSP1_{19}PADRE e ISO-MSP1_{19}PADRE, ou somente tampão de citometria, foram adicionados e incubados com os esplecnócitos por 40 minutos no gelo. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes e incubadas com anticorpos anti-CD19 (clone: 1D3), anti-CD3 (clone: 145.2C11) e anti-CD49b (clone: DX5) conjugados à biotina por 40 minutos no gelo.

Depois de duas lavagens, ocorreu uma incubação com os anticorpos anti-MHCII- Alexa Fluor 700 (clone: MS/11415 IAIE), anti-CD11c-BV421 (clone: N418), anti-CD8α-PE.Cy7 (clone: 53-67), anti-IgG1a-PE (clone: A 85-1), estreptavidina conjugada a PerCP e "Live and Dead-Aqua" (Thermo Fisher Scientific) por 40 min no gelo. Após duas lavagens, as células foram transferidas para um tubo e a citometria realizada em um citômetro de fluxo BD LSR Fortessa (BD biosciences) e analisada com o software FlowJo (versão 9.3, Tree Star, San Carlo, CA).

3.7 Imunizações e obtenção da suspensão de células do baço

Os camundongos foram imunizados com os mAbs quiméricos pela via intraperitoneal. Na primeira dose foi administrado 5 µg dos mAbs αDEC205-MSP1_{19}PADRE, αDCIR2-MSP1_{19}PADRE e ISO-MSP1_{19}PADRE utilizando como adjuvante 50 µg de Poly I:C ou somente Poly I:C como controle negativo. Na segunda dose somente os mAbs quiméricos foram administrados e o grupo Poly IC recebeu apenas salina. Dependendo do experimento, a eutanásia foi realizada 3, 4, 5, 6 ou 14 dias após administração da primeira ou segunda doses, sendo retirado o sangue para obtenção do soro e o baço dos camundongos.

O baço retirado foi processado para a obtenção de uma suspenção celular. Para isso, o baço foi macerado com o embolo de uma seringa em meio RMPI (Gibco) suplementado com 2% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de HEPES e antibióticos e filtrado utilizando Cell Strainer (Corning) de 100 µm. As células foram centrifugadas a 1800 RPM por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi desprezado. As hemácias foram lisadas adicionando-se 1 mL de tampão ACK (155 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$ 0,1mM EDTA) por um minuto seguido de 3 lavagens com meio RMPI. As células foram ressuspendidas em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM L-glutamina (GIBCO), 10 mM Hepes (GIBCO), 1 mM de piruvato de sódio (GIBCO), 1% de aminoácidos não-essenciais (GIBCO), 1% de vitaminas (GIBCO) e 0,01% de β-Mercaptoetanol (GIBCO) e 20 µg/mL do antibiótico ciprobacter (Isofarma, Brasil).

3.8 Determinação do número de células produtoras de IFN-γ

O número de células totais produtoras de IFN-γ foi determinado por ELISpot utilizando o kit "*Ready-SET-Go*!" (eBioscience) para detecção de IFN-γ, de acordo com as normas do fabricante. Resumidamente, $3x10^5$ células foram ou não pulsadas com 1 µg/mL da proteína recombinante MSP1_{19}PADRE em placas de nitrocelulose de 96 poços (Millipore)

previamente sensibilizadas com um anticorpo de captura anti-IFN-γ *over night* a 4 °C e bloqueadas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Essas células foram mantidas em meio RPMI completo contendo 30 U/mL de IL-2 humana recombinante por 20-24 horas em estufa a 37 °C com saturação de 5% de CO_2. Depois da incubação, as células foram desprezadas e as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-Tween20 0,05%. Para detecção, foi adicionado o anticorpo anti-IFN-γ conjugado com biotina e incubado por 2 horas em temperatura ambiente. O excesso de anticorpo foi retirado por 3 lavagens em PBS-Tween20 0,05% e a cada placa foi adicionada avidina conjugada a HRP (*Horse radish peroxidase*) e incubada por mais 45 minutos. A revelação foi realizada após 3 lavagens com PBS-Tween20 0,05% e 2 lavagens somente com PBS 1 X utilizando o substrato AEC (BD bioscience) de 15 a 45 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida lavando-se a placa com água corrente que foi seca em temperatura ambiente. A contagem dos spots foi realizada no contador automático de ELISpot (AID GmbH). O número de spots das amostras estimuladas com $MSP1_{19}$PADRE foi normalizado subtraindo-se a quantidade de spots presente no controle negativo (sem estímulo) e multiplicando-se o número de spots obtidos por 3,33 para calcular o número de células produtoras de IFN-γ por milhão de células do baço.

3.9 Marcação intracelular de citocinas

A porcentagem de células T $CD4^+$ produtoras de citocinas foi determinada por marcação intracelular para IL-2, TNF-α e IFN-γ e, em alguns casos, também IL-10 e IL-17. Um milhão e meio ($1,5x10^6$) de células foram ou não pulsados com 5 µg/mL da proteína recombinante $MSP1_{19}$PADRE em placas de 96 poços com fundo em U (Costar). As células fora incubadas em meio RPMI completo contendo 2 µg/mL do anticorpo agonista anti-CD28 por 1 hora a 37 °C e 5% de CO_2. Após esse período, adicionou-se 0,5 µL de Golgi Plug Brefeldina A (BD Bioscience) e as células foram incubadas por mais 12-16 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2.

Para a marcação com anticorpos conjugados a fluorocromos para a citometria de fluxo, as células foram centrifugadas a 1800 RPMs por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Três amostras foram combinadas em uma, restando uma triplicata por grupo que foram transferidas para placas em fundo “V” e centrifugadas novamente a 1800 RPMs por 5 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, as células foram incubadas com anti-CD4-PerCP (clone: RM 4-5) e Live and Dead – Aqua (Thermo Fisher Scientific) em tampão de

citometria por 40 minutos no gelo. Após esta incubação, foram realizadas 4 lavagens para retirar completamente o excesso do marcador de viabilidade. As células foram então fixadas e permeabilizadas com *CytoFix/CytoPerm* (BD Bioscience) por 15 minutos no gelo e centrifugadas a1800 RPMs por 5 minutos a 4 °C, sendo lavadas duas vezes em *PermWash* 1 X (BD Bioscience). A marcação intracelular foi realizada com anti-CD3-APC.Cy7 (clone: 145.2C11), anti-IL-2-PE (clone:JES6-5H4), anti-TNF-α-PE.Cy7 (clone: MPG -XT22), anti-IFN-γ-APC (clone:XMG1.2) e em alguns experimentos anti-IL-10-BV421 (clone: JES5-16E3) e anti-IL-17-BV605 (Clone: TC11-18H10) que foram diluídos em *PermWash* 1X e incubados por 40 minutos no gelo. Então as células foram lavadas 2 vezes com tampão de citometria e transferidas para tubos. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo BD LSR Fortessa (BD biosciences) e analisada com o software FlowJo (versão 9.3, Tree Star). A porcentagem de células viáveis $CD3^{+}CD4^{+}$ produtoras de citocinas das amostras estimuladas com $MSP1_{19}$PADRE foram normalizadas subtraindo-se pela porcentagem de células produtoras de citocinas presentes nas amostras não pulsadas.

3.10 ELISA

A produção de anticorpos específicos contra a proteína $MSP1_{19}$ foi quantificada pelo enzima imunoensaio (ELISA) exatamente como descrito em Henriques *et al.* (2013). O sangue dos camundongos imunizados foi centrifugado a 10.000 RPM por 5 minutos a temperatura ambiente e os soros foram coletados e armazenados a -20 °C até o momento do uso. A produção de anticorpos séricos anti-$MSP1_{19}$ foi determinada titulando-se individualmente os soros obtidos com fator de diluição 1:2 ou 1:3 em solução PBS- Tween 20 0,02% leite 5% BSA 0,25%.

Placas de ELISA “High binding” (Costar) foram sensibilizadas com 2 µg/mL da proteína recombinante $MSP1_{19}$ diluída em PBS 1 X e incubadas *over night* a temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas em solução de PBS-Tween 20 0,02% e bloqueadas com PBS-Tween 20 0,02% leite 5% BSA 1% por 1 hora em temperatura ambiente. Depois de 3 lavagens com PBS-Tween 20 0,02%, as amostras de soro previamente diluídas e tituladas foram adicionadas, sendo incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse período novamente as placas foram lavadas e o anticorpo secundário conjugado a HRP foi adicionado na titulação recomendada diluído na solução PBS-T0,02 leite 5% BSA 0,25%. Após 2 horas, a revelação foi realizada após 3 lavagens utilizando 1 mg/mL de orto-fenilenediamina dihidrocloride (OPD) (Sigma) diluído em tampão fosfato-ácido cítrico, pH

4,7, contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio (v/v). A reação foi parada depois de 15 minutos com 50 µL de uma solução de H_2SO_4 4 N. As placas foram lidas em leitor BioTek ELx800 (Biotek) em comprimento de onda de 490 nm. Os títulos foram calculados como o logaritmo (log10) considerando-se a diluição em que a DO_{490} estivesse maior que 0,1.

3.11 Quantificação do número de células secretoras de anticorpos

O número de células totais secretoras de anticorpos anti-$MSP1_{19}$ foi determinado por ELISpot. Foram utilizadas placas de nitrocelulose de 96 poços (Millipore) previamente sensibilizadas com 2 µg/mL da proteína recombinante $MSP1_{19}$ diluída em PBS 1X e bloqueadas com meio RPMI 5% de soro fetal bovino. Um milhão (10^6) esplenócitos foram adicionados por poço e incubados por 6 horas em meio RPMI 10% de soro fetal bovino a 37 °C e 5% de CO_2. Após esse período, as células foram desprezadas, a placa foi lavada com PBS-Tween20 0,05% 3 vezes e o anticorpo anti-IgG-HRP foi adicionado usando uma titulação 1:2000, sendo incubado por 2 horas em temperatura ambiente. A revelação foi realizada após 3 lavagens com PBS-Tween20 0,05% e 2 lavagens somente com PBS 1X utilizado o substrato AEC (BD bioscience) de 15 a 45 minutos. Após esse período, a reação foi interrompida lavando-se as placas com água corrente e secando-se a temperatura ambiente. A contagem dos spots foi realizada em contador automático de ELISpot (AID GmbH).

3.12 Imunofenotipagem

3.12.1 Expressão de moléculas co-estimulatórias em DCs

Foi analisada a expressão das moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86 e CD40) nas DCs $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$ nos camundongos imunizados com os mAbs αDEC205-$MSP1_{19}$PADRE, αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE e ISO-$MSP1_{19}$PADRE usando o Poly I:C como adjuvante 1 dia após a imunização. Para isso, $5x10^6$ esplenócitos foram incubados com Fc block (BD Bioscience) por 15 minutos no gelo e as células foram lavadas com tampão de citometria. Os esplenócitos primeiramente foram incubados com os anticorpos anti-CD19 (clone: 1D3), anti-CD3 (clone: 145.2C11) e anti-CD49b (clone: DX5) conjugados à biotina por 40 minutos no gelo na ausência de luz. Após a lavagem, as células foram incubadas com anti-MHCII-Alexa fluor 700 (clone: MS/11415 IAIE), anti-CD11c-BV421 (clone: N418), anti-CD8α-BV786 (clone: 53-67), anti-CD11b-PE.Cy7 (clone: M1/70), anti-CD80-FITC (clone: 16-10A1), anti-

CD86-APC (clone: GL1), anti-CD40-PE (clone: 1C10) e estreptavidina APC.Cy7, bem como Live and Dead–Aqua (Thermo Fisher Scientific) diluídos em tampão de citometria por 40 minutos no gelo no escuro. Após este período, as células foram lavadas 2 vezes com tampão de citometria e transferidas para tubos.

3.12.2 Instrução de células T_{FH}

Para identificação de células T_{FH} por citometria de fluxo, 5.10^6 esplenócitos foram incubados com anti-CXCR5-biotina (clone: 2G8) diluído em tampão de citometria por 40-50 minutos a 37 °C no escuro. Após a lavagem, foram adicionados os anticorpos anti-CD19-PE.Cy7 (clone: 1D3), anti-CD3-APC.Cy7 (clone: 145.2C11), anti-CD4-PerCP (clone: RM 4-5) , anti-PD-1-APC (clone: J43), estreptavidina PE e Live and Dead–Aqua (Thermo Fisher Scientific) e as placas foram incubadas por 40 minutos no gelo e no escuro. Após este período, as células foram lavadas 2 vezes com tampão de citometria e transferidas para tubos.

3.12.3 Marcação intracelular de Bcl-6 em células T_{FH}

A expressão de Bcl-6 intracelular em células T_{FH} e não-T_{FH} foi realizada por citometria de fluxo. Cinco milhões ($5x10^6$) de esplenócitos foram incubados com anti-CXCR5-biotina (clone: 2G8) diluído em tampão de citometria por 40-50 minutos a 37 °C no escuro. Após a lavagem, foram adicionados os anticorpos anti-CD3-APC.Cy7 (clone: 145.2C11), anti-CD4-PerCP (clone: RM 4-5), anti-PD-1-APC (clone: J43), estreptavidina PE.Cy7 e Live and Dead–Aqua e a placa foi incubada por 40 minutos no gelo e no escuro. Após este período, foram realizadas quatro lavagens. As células foram então permeabilizadas com a solução de permeabilização do kit de marcação de FOXP3 (eBioscience) e o anti-Bcl6-PE foi adicionado e incubado por 1 hora no gelo e no escuro. Após este período, as células foram lavadas 2 vezes com tampão de citometria e transferidas para tubos.

3.12.4 Formação de centros germinativos e diferenciação de plasmócitos

A análise da formação de centros germinativos (GC) e da diferenciação de plasmócitos também foi realizada por citometria de fluxo. Cinco milhões ($5x10^6$) esplenócitos foram incubados com anti-CD3-APC.Cy7 (clone: 145.2C11), anti-B220-PerCP (clone: RA3-6B2),

anti-GL-7-FITC (clone: GL7), anti-CD95-PE (clone: Jo2), anti-CD138 (clone: 281-2), bem como com Live and Dead–Aqua por 40 minutos no gelo e no escuro. Após este período, as células foram lavadas 2 vezes com tampão de citometria e transferidas para tubos.

3.12.5 Aquisição e análise dos dados

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo BD LSR Fortessa (BD biosciences) e os dados foram analisados com a utilização do software FlowJo (versão 9.3, Tree Star).

3.13 Produção de citocinas

A produção de citocinas foi quantificada diretamente no soro de animais imunizados com αDEC205-MSP1_{19}PADRE, αDCIR2-MSP1_{19}PADRE e ISO-MSP1_{19}PADRE usando Poly I:C como adjuvante ou no sobrenadante de células provenientes de camundongos imunizados que foram pulsadas *in vitro* com a proteína recombinante MSP1_{19}PADRE. As citocinas TNF-α e IL-6 foram dosadas no soro de camundongos 24 horas após a imunização para avaliar a resposta inata promovida pelo direcionamento de antígenos para DCs. As citocinas IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17 foram dosadas no sobrenadante das culturas de esplenócitos provenientes de camundongos que receberam duas doses de imunização, sendo a primeira utilizando Poly I:C como adjuvante e a segunda somente solução salina e mAbs quiméricos. Quatorze dias depois da segunda dose, os esplenócitos foram estimulados *in vitro* com 5 µg/mL da proteína recombinante MSP1_{19}PADRE em placas de 96 poços com fundo em U (Costar). Depois de 48 e 96 horas, os sobrenadantes foram coletados e as citocinas produzidas quantificadas.

A dosagem das citocinas foi realizada por C*ytometric Beads Array* (CBA) usando o sistema flex. Desta forma, as citocinas foram dosadas utilizando kits “Mouse Flex Set” para TNFα, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-17 adquiridos da BD Bioscience e realizados de acordo com as instruções do fabricante.

A aquisição das amostras foi feita no citômetro de fluxo BD LSR Fortessa (BD biosciences) e os dados foram analisados no software FCAP array (v.3 BD Bioscience). A produção de citocinas das amostras estimuladas com a MSP1_{19}PADRE foi normalizada subtraindo-se a produção de citocinas das amostras não estimuladas.

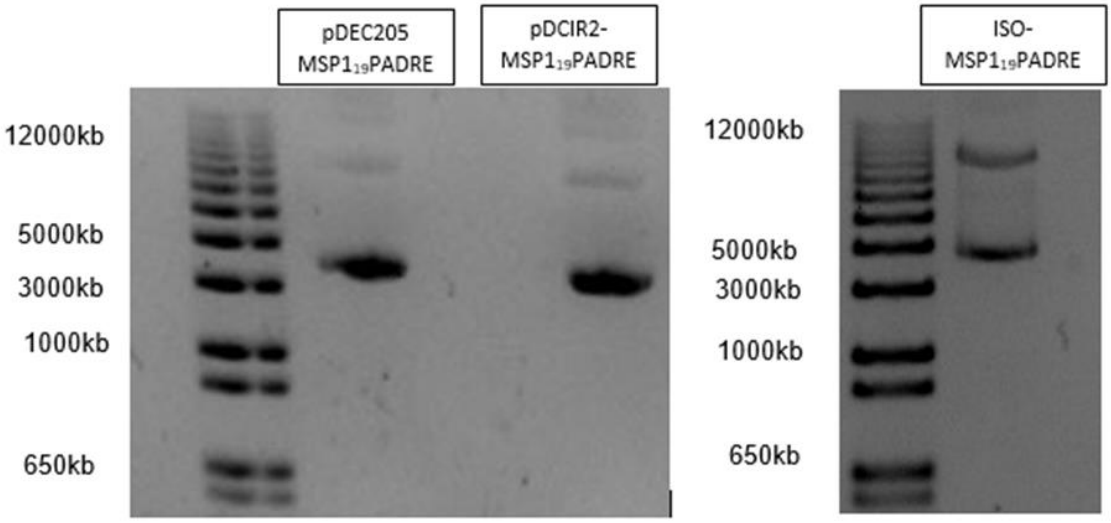
3.14 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o teste ANOVA de uma via seguido do pós teste de Tukey ou ANOVA de duas vias seguido do pós teste de Bonferroni comparando todos com todos ou ainda teste t-Student para comparação de apenas de 2 grupos. As análises foram realizadas no programa Prism 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla). Foram consideradas significativas diferenças com $p \leq 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Produção dos mAbs quiméricos

Para produzir os mAbs quiméricos que foram utilizados nesse estudo utilizou-se os plasmídeos pDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, pDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e pISO-MSP1$_{19}$PADRE que foram previamente clonados de acordo com a descrição na seção de material e métodos. Esses plasmídeos foram produzidos em larga escala para gerar a quantidade suficiente de DNA para as transfecções. Para isso, bactérias DH5α foram transformadas com os plasmídeos codificadores da cadeia pesada dos mAbs αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e ISO-MSP1$_{19}$PADRE. Após crescimento *over night* em placa de ágar contento ampicilina, uma colônia foi selecionada e um pré-inóculo foi semeado em caldo LB com 100 µg/mL de ampicilina. Incubou-se a 37 °C com agitação constante *over nigh*t. O inóculo foi então preparado nas mesmas condições em um volume de 500 mL. Os plasmídeos foram extraídos e uma eletroforese em gel 1% de agarose foi realizada. A figura 5 mostra a eletroforese dos plasmídeos extraídos.



. Figura 5 - Produção de plasmídeos codificadores das cadeias pesadas dos anticorpos quiméricos fusionadas ao antígeno MSP119PADRE Eletroforese em gel de agarose 1% dos plasmídeos pDEC205MSP1$_{19}$PADRE, pDCIR2MSP1$_{19}$PADRE e pISOMSP1$_{19}$PADRE.

Utilizando esses plasmídeos, os mAbs de fusão αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e ISO-MSP1$_{19}$PADRE foram produzidos por meio da transfecção transiente de células HEK293T. As células foram transfectadas com os plasmídeos codificadores das

cadeias leve e pesada de cada um dos mAbs. O sobrenadante das células foi coletado depois de sete dias e os mAbs foram precipitados com sulfato de amônio e purificados por cromatografia de afinidade em esferas de proteína G. Após a purificação, a integridade dos mAbs foi analisada por SDS-PAGE em condições redutoras. A figura 6 mostra as cadeias leves (~25 kDa) e pesadas (~70kDa) dos mAbs quiméricos αDEC205 sem nenhum antígeno conjugado (1), αDCIR2 também sem antígeno fusionado (2), αDEC205- MSP1_{19}PADRE (3), αDCIR2-MSP1_{19}PADRE (4) e ISO-MSP1_{19}PADRE (5). Quando o antígeno é fusionado a cadeia pesada há um aumento do peso molecular aparente que passa de aproximadamente 50 kDa para 70 kDa. Assim, os mAbs quiméricos foram produzidos eficientemente mantendo sua integridade após a purificação (Figura 6).

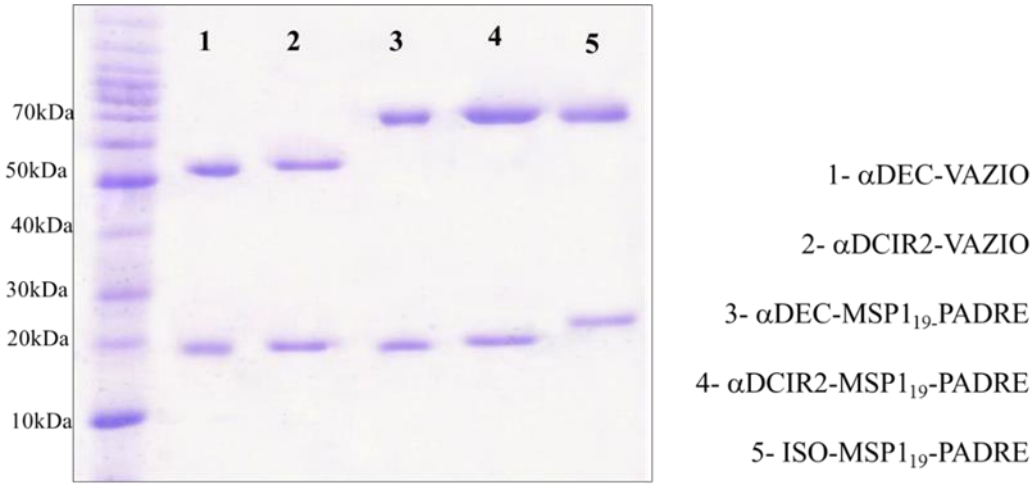


Figura 6 - Produção dos mAbs. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições redutoras dos mAbs quiméricos αDEC205, αDCIR2, αDEC205-MSP1_{19}PADRE, αDCIR2-MSP1_{19}PADRE e ISO-MSP1_{19}PADRE. Aproximadamente 1µg de cada mAb foi transferido para o gel e submetido a eletroforese e depois coloração com coomassie blue.

Para confirmar se os mAbs quiméricos mantiveram sua capacidade de ligação aos receptores DEC205 e DCIR2, foi realizado um ensaio de ligação em células transgênicas que expressam constitutivamente os receptores DEC205 ou DCIR2 (CHO-DEC e CHO-DCIR2). Os resultados de citometria de fluxo mostraram que o αDEC205-MSP1_{19}PADRE se ligou especificamente, e de forma dose dependente, nas células CHO-DEC205. Por outro lado, o αDCIR2-MSP1_{19}PADRE foi capaz de se ligar somente nas células que expressam o receptor DCIR2 (CHO-DCIR2). E, como esperado, o ISO-MSP1_{19}PADRE não se ligou em nenhuma das células analisadas (Figura 7).

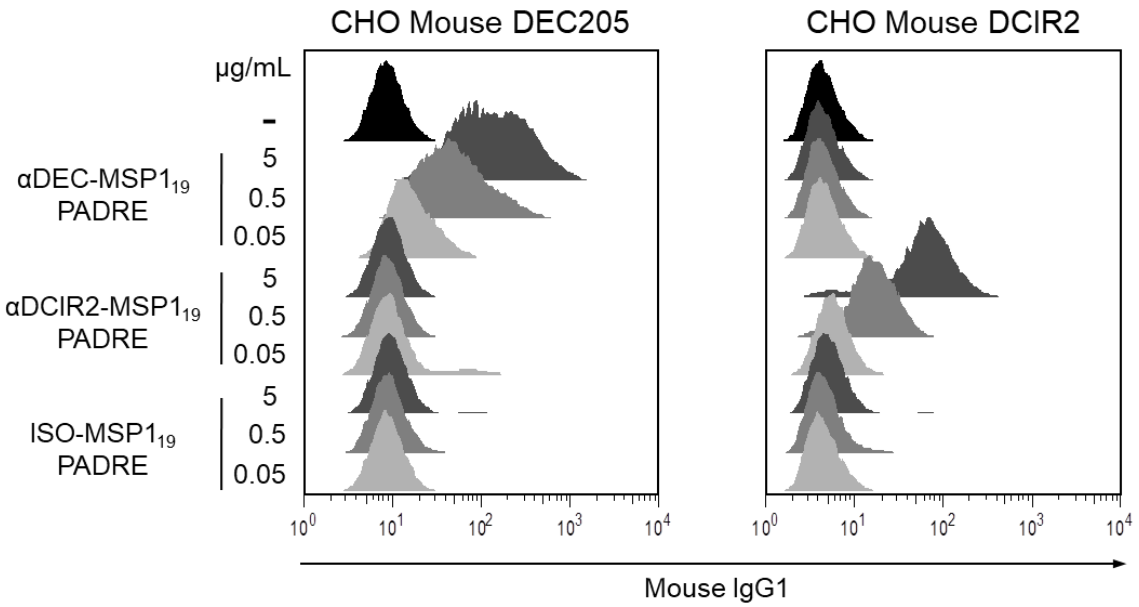


Figura 7 - Ensaio de ligação dos mAbs em células CHO expressando os receptores DEC205 e DCIR2 murinos. Ligação dos mAbs αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e ISO-MSP1$_{19}$PADRE nos receptores DEC205 e DCIR2 em células CHO transgênicas. 10^5 células foram incubadas com 5, 0,5 ou 0,05 µg/mL dos mAbs no gelo. Sua ligação ao receptor foi detectada por citometria de fluxo com a utilização de um anticorpo anti-IgG1 de camundongo conjugado ao alexa fluor 488.

Para confirmar a ligação dos mAbs quiméricos nas DCs CD8α$^+$ e CD8α$^-$ também foi realizado um ensaio de ligação em esplenócitos. Os anticorpos αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e ISO-MSP1$_{19}$PADRE foram incubados com esplenócitos de camundongos C57BL/6 em diferentes concentrações. Na análise, foram excluídas as células não-viáveis, células B (CD19$^+$), T (CD3$^+$) e NK (CD49b$^+$) sendo selecionadas as células CD11c$^+$MHC II$^+$ que foram divididas em DCs CD8α$^+$ e CD8α$^-$. O αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE se ligou somente nas DCs CD8α$^+$, as principais células que expressam o receptor DEC205 e o αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ligou-se somente nas DCs CD8α$^-$, únicas células que expressam DCIR2. O ISO-MSP1$_{19}$PADRE não se ligou em nenhum dos subtipos de DCs analisados (Figura 8). Dessa forma, pode-se concluir que todos os mAbs quiméricos foram produzidos eficientemente e que eles mantiveram sua capacidade de ligação específica a seus respectivos receptores.

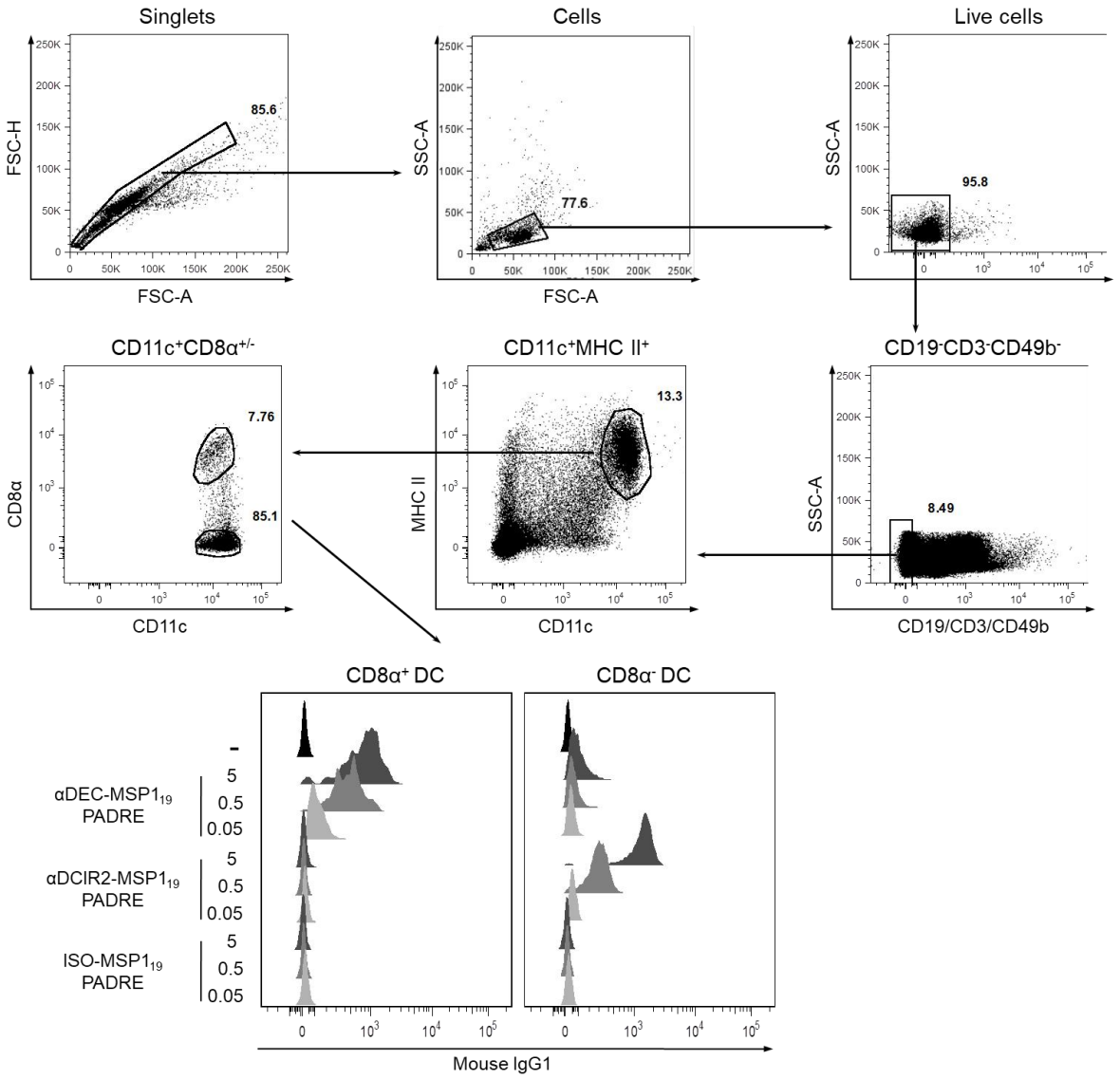
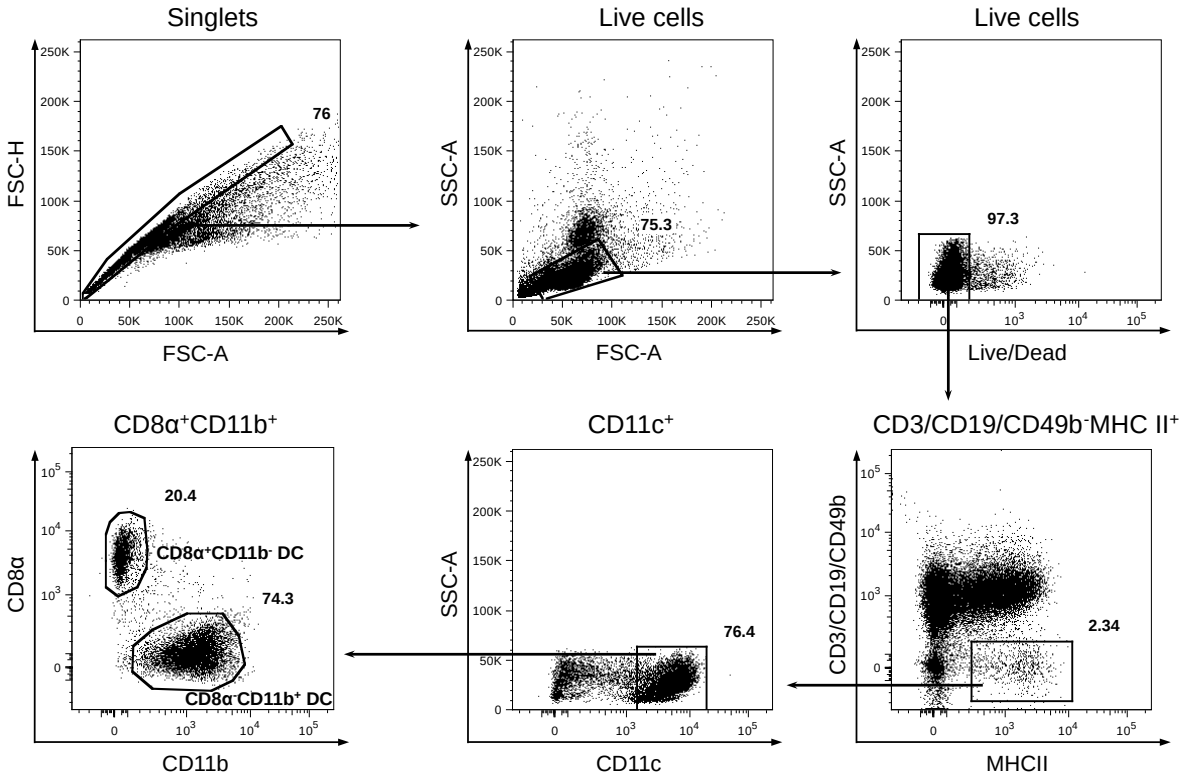


Figura 8 - Ensaio de ligação dos mAbs a esplenócitos. Ligação dos mAbs αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e ISO-MSP1$_{19}$PADRE nos receptores DEC205 e DCIR2 em DCs. 5x10^6 células foram incubadas com 5, 0,5 ou 0,05 µg/mL dos mAbs no gelo. Sua ligação ao receptor foi detectada utilizando um anticorpo anti-IgG1 de camundongo conjugado a PE. A estratégia de análise consiste na seleção de células únicas seguido de *gate* em FSC x SSC. Em seguida, as células mortas foram excluídas seguido de *gate* nas células CD19$^-$CD3$^-$CD49b$^-$. As células CD11c$^+$MHCII$^+$ foram consideradas DCs que foram divididas nos subtipos CD8α$^+$ e CD8α$^-$. A ligação foi analisada nas populações de DCs CD8α$^+$ e CD8α$^-$.

4.2 Resposta inata no direcionamento de antígenos para DCs

Como os mAbs quiméricos foram produzidos eficientemente e mantiveram sua capacidade de ligação, incialmente foi analisada a resposta inata induzida pela imunização de camundongos com esses anticorpos. Os camundongos foram imunizados com 5 µg dos mAbs αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e ISO-MSP1$_{19}$PADRE utilizando como

adjuvante Poly I:C ou somente Poly I:C como controle positivo e salina como controle negativo. Após 24 horas da imunização foi analisada a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40 nas DCs CD8α$^+$ e CD8α$^-$ por citometria de fluxo. A estratégia para a análise da maturação de cada subtipo de DCs está representada na figura 9. Considerou-se DCs CD8α$^+$ as células CD11c$^+$MHCII$^+$CD8α$^+$CD11b$^-$ e as DCs CD8α$^-$ as células CD11c$^+$MHCII$^+$CD8α$^-$CD11b$^+$.



. Figura 9 - Estratégia de análise de DCs CD8α$^+$ e CD8α$^-$ por citometria de fluxo. As células foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos. A estratégia de análise consiste em *gate* nas células únicas seguido por tamanho x complexidade e células viáveis, células CD3$^-$CD19$^-$CD49b$^-$MHCII$^+$, CD11c$^+$ e então CD8α$^-$CD11b$^+$ (células que expressam DCIR2) ou CD8α$^+$CD11b$^-$ (células que expressam DEC205).

Os resultados mostram que não houve diferença na expressão de CD80, CD86 e CD40 quando o antígeno é direcionado para DCs CD8α$^+$ ou CD8α$^-$. Os níveis de expressão dessas moléculas co-estimulatórias foram semelhantes quando comparamos os grupos de camundongos que receberam diferentes mAbs e Poly IC ou somente o adjuvante. Na verdade, é a presença do adjuvante que induz a maturação da DC, sugerindo que o direcionamento do antígeno via DEC205 ou DCIR2 não influencia a ativação das DCs CD8α$^+$ ou CD8α$^-$. No entanto, as DCs CD8α$^+$ expressam maiores níveis de CD80 e CD40 em relação às DCs CD8α$^-$ em todas as imunizações que usam o Poly IC como adjuvante 24 horas após sua

administração (Figura 10). Contudo, ambos os subtipos de DCs aumentaram a expressão de CD80, CD86 e CD40 em relação ao controle negativo (salina) mostrando que ambas estão maduras.

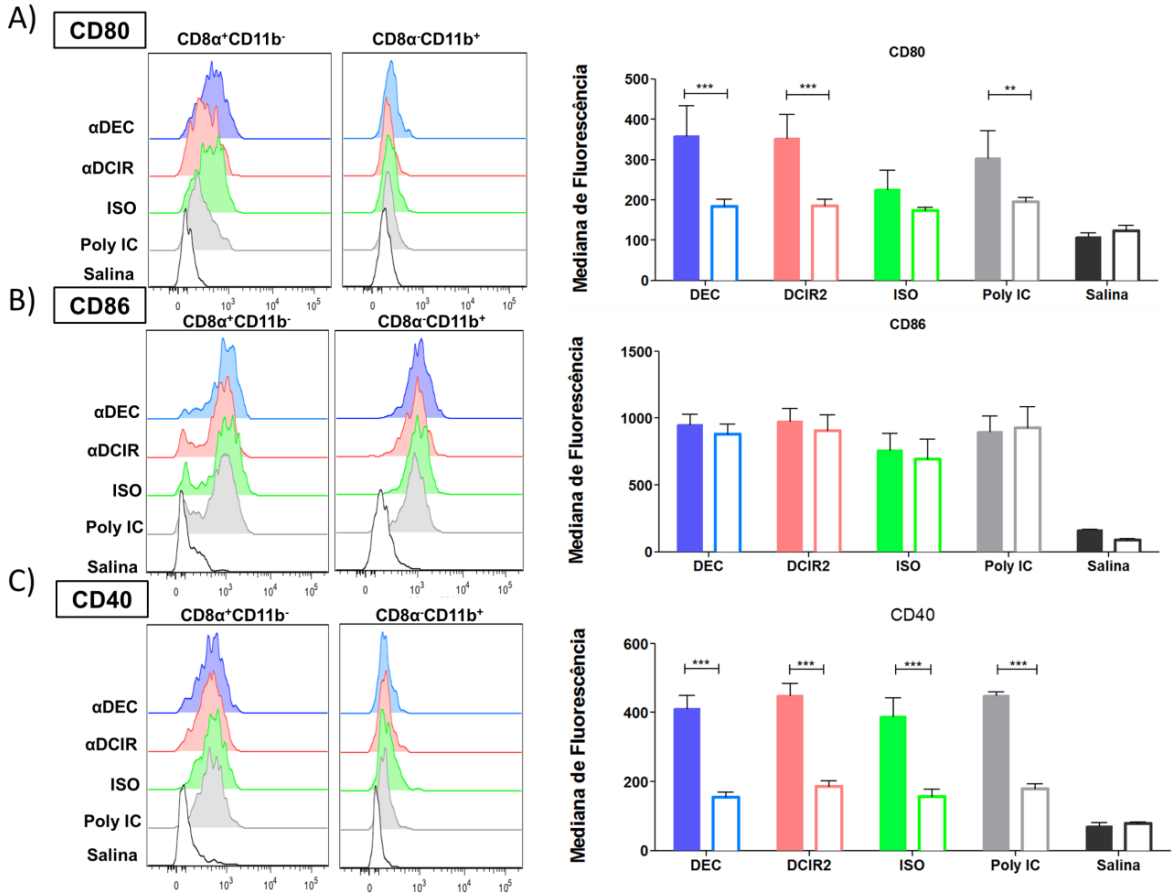


Figura 10 - Expressão de moléculas co-estimulatórias em DCs. Camundongos foram imunizados com mAbs quiméricos usando Poly IC como adjuvante ou somente salina como controle negativo. 24 horas após a imunização, a ativação das DCs foi analisada pela expressão de CD80 (A), CD86 (B) e CD40 (C) por citometria de fluxo. As barras sólidas representam as DCs CD8α$^+$ e as barras sem preenchimento, as DCs CD8α$^-$. Os *gates* foram realizados nas DCs CD8α$^+$ e CD8α$^-$ de acordo com a estratégia mostrada na figura 9. Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) em que *** p<0,001 e ** p<0,01. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

Além disso, para avaliar a resposta inata sistêmica induzida pelo direcionamento do antígeno MSP1$_{19}$PADRE para as DCs CD8α$^+$ e CD8α$^-$, as citocinas TNF-α e IL-6 foram quantificadas no soro desses camundongos imunizados com os mAbs αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE usando Poly I:C como adjuvante e salina. Após 24 horas da imunização, o sangue foi coletado e as quantidades de TNF-α e IL-6 nos soros foram dosadas por *Cytometric Bead Array* (CBA) de sensibilidade

aumentada. Os camundongos que foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE usando Poly I:C como adjuvante ou somente poly IC apresentaram um aumento da concentração sérica de TNF-α, indicando que o adjuvante induziu a produção de TNF-α e que o direcionamento de antígenos também não influencia a concentração sérica desta citocina. Não houve diferença estatística quando comparamos o grupo Poly IC com nenhum dos outros grupos, havendo, no entanto, uma tendência de aumento quando o Poly IC foi comparado com salina. Igualmente, os níveis séricos da IL-6 foram superiores em todos os grupos de camundongos que receberam Poly IC quando comparados aos controles que receberam somente salina. Surpreendentemente, o direcionamento do antígeno para o subtipo de DCs CD8α$^-$ induziu um maior aumento de IL-6 comparado ao direcionamento para o subtipo CD8α$^+$ ou à ausência de direcionamento (animais imunizados com o mAb ISO-MSP1$_{19}$PADRE), sugerindo um aumento sistêmico de IL-6 (Figura 11).

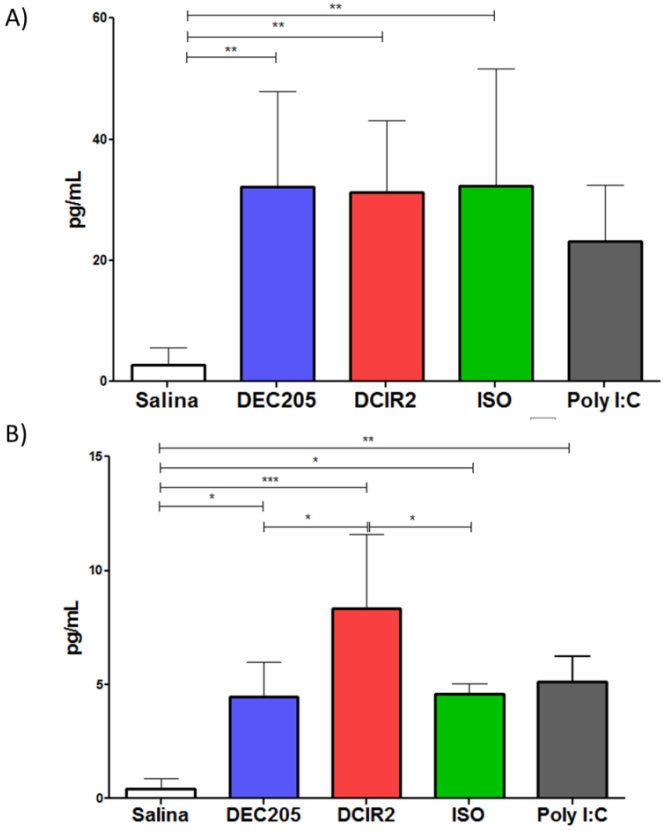


Figura 11 - Expressão de citocinas inatas induzidas pelo direcionamento de antígenos para os diferentes subtipos de DCs. Camundongos foram imunizados com mAbs quiméricos usando Poly IC como adjuvante ou somente salina como controle negativo. Vinte e quatro horas após a imunização, o sangue foi coletado e as citocinas TNF-α (A) e IL-6 (B) foram quantificadas no soro utilizando CBA. Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de uma via (one-way ANOVA) em que *** $p<0,001$, ** $p<0,01$ e * $p<0,05$. Resultados agrupados de dois experimentos independentes.

4.3 Resposta celular inicial induzida pelo direcionamento de antígenos para DCs

Para avaliar a montagem da resposta imune induzida pelo direcionamento de antígenos para DCs, camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1_{19}PADRE, αDCIR2-MSP1_{19}PADRE ou ISO-MSP1_{19}PADRE usando Poly I:C como adjuvante. Após 3, 4, 5 e 6 dias da imunização, a resposta celular foi determinada pela marcação intracelular das citocinas inflamatórias IFN-γ, IL-2 e TNF-α de acordo com a estratégia de análise da figura 12. Os resultados indicam que o direcionamento do antígeno MSP1_{19}PADRE via DEC205 estimula o aumento do número de células T CD4^{+} que expressam IFN-γ e IL-2. Os resultados de células T CD4^{+} produtoras de IFN-γ e IL-2 são superiores ($p < 0,05$) no grupo que foi imunizado com αDEC205-MSP1_{19}PADRE quando comparado com os grupos que receberam αDCIR2-MSP1_{19}PADRE ou ISO-MSP1_{19}PADRE usando Poly I:C ou somente Poly IC no sexto dia após a imunização. Quanto à produção de TNF-α, não foi verificada diferença estatística entre os grupos (Figura 13).

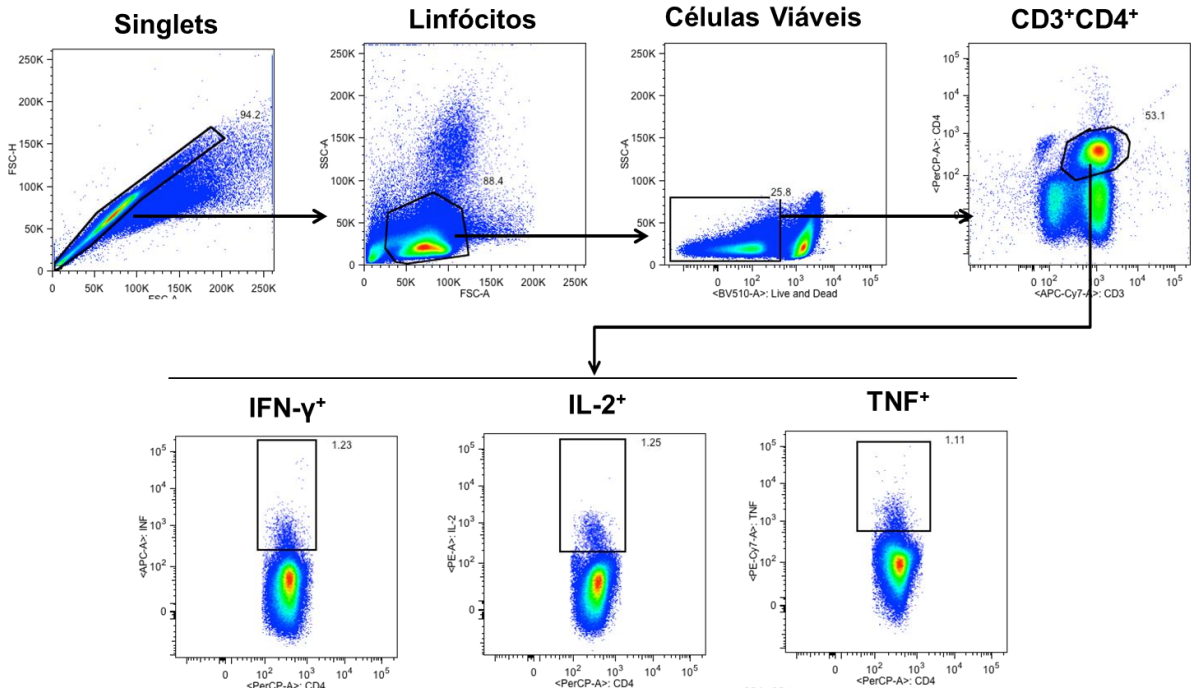


Figura 12: Estratégia Análise da Expressão de Citocinas em Células T CD4^{+}. Primeiramente foi realizado um *gate* na região de singlets e na região de linfócitos. Posteriormente, selecionou-se as células viáveis e CD3^{+}CD4^{+} que são células T auxiliares. Nessas células avaliou-se a expressão das citocinas IFN-γ, IL-2 e TNF-α.

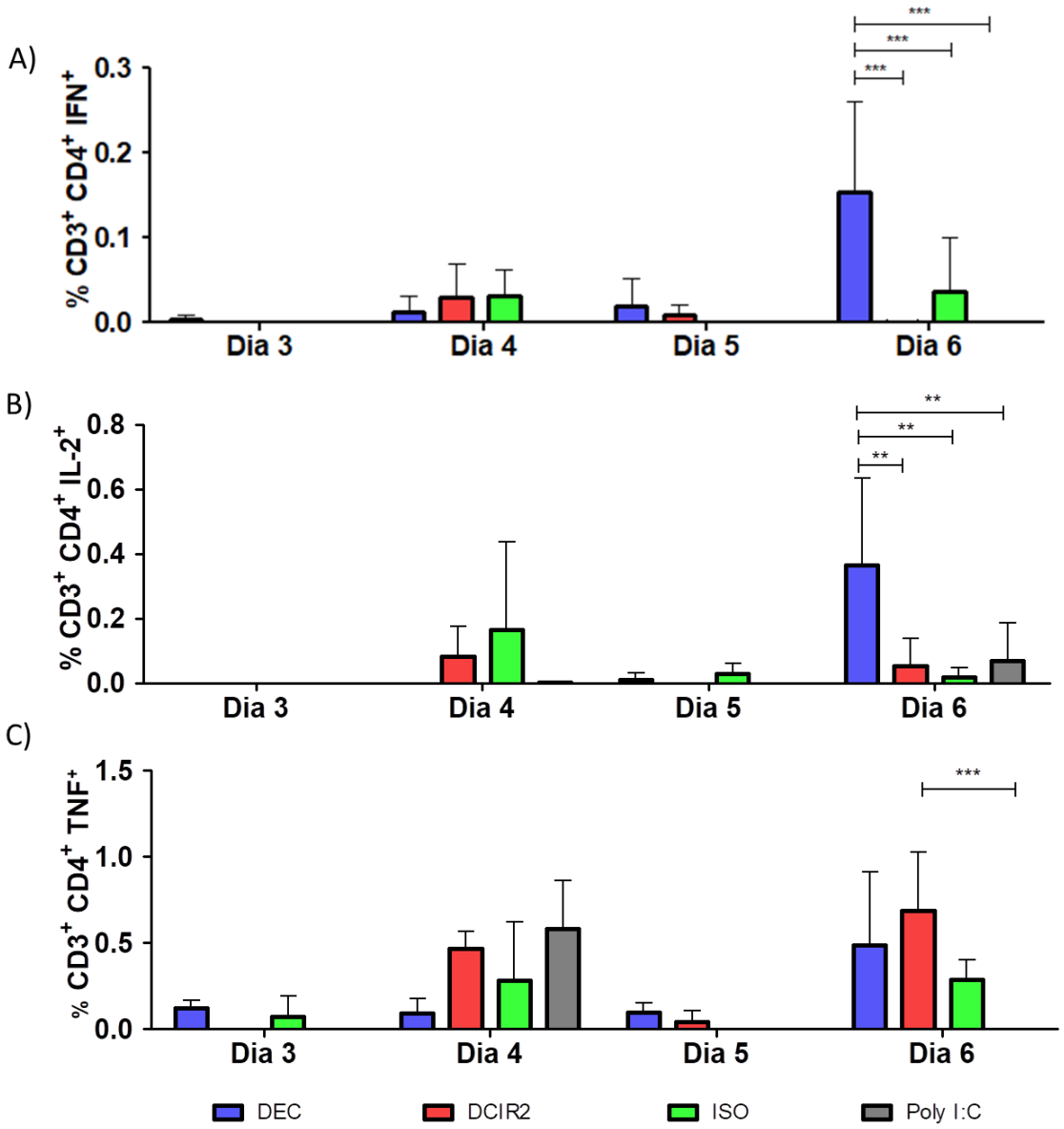


Figura 13 - Resposta celular induzida pelo direcionamento de antígenos via DEC205 e DCIR2. Camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE na presença de Poly I:C. 3, 4, 5 e 6 dias após a imunização o baço foi retirado e as células estimuladas com 5 µg/mL da proteína MSP1$_{19}$PADRE. Análise da citometria de fluxo, *gate* nas células CD3^{+}CD4^{+}. (A) células produtoras de IFN-γ, (B) de IL-2 e (C) de TNF-α. Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) em que *** p<0,001 e ** p<0,01. Resultados de três experimentos independentes agrupados.

Além disso, a análise de células polifuncionais pelos *boolean gates* no 6º dia indica que somente o grupo que foi imunizado com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE induziu células triplo funcionais (células produtoras das 3 citocinas simultaneamente) e células duplo funcionais (células produtoras de duas citocinas) bem como as células produtoras somente de uma citocina (Figura 14). Assim, os resultados iniciais indicam que o direcionamento de antígenos

via DEC205 é capaz de induzir uma resposta inicial de células T CD4$^+$, instruindo um perfil de resposta Th1. Assim, esse resultado nos sugere que as DCs CD8α$^+$ são especializadas em instruir a polarização de células T CD4$^+$ para um perfil Th1.

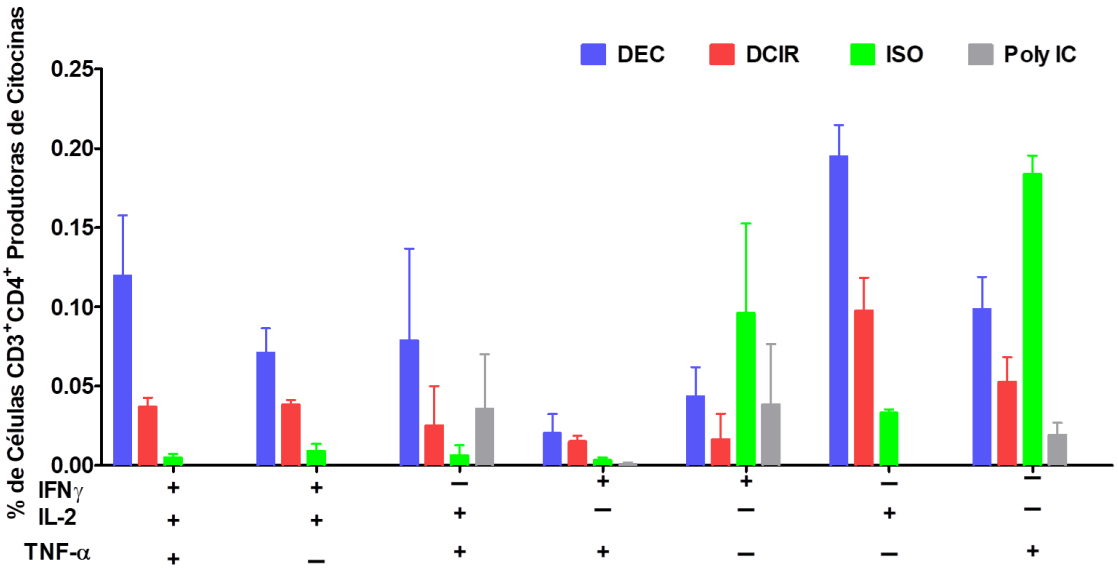


Figura 14 - Células produtoras de uma, duas ou três citocinas no sexto dia após a administração da primeira dose. *Boolean gates* foram aplicados nos resultados de marcação intracelular de citocinas no 6º dia após a primeira imunização. A porcentagem de células produtoras de uma, duas ou três citocinas foi determinada descontando-se as amostras sem estímulo. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

4.4 Resposta humoral inicial induzida pelo direcionamento de antígenos para DCs

A análise da resposta humoral foi primeiramente realizada pela determinação dos títulos séricos de anticorpos anti-MSP1$_{19}$ tanto IgM como IgG. Para isso, o soro dos camundongos imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE na presença de Poly IC foram utilizados para a realização de ELISA. Referente à resposta de IgM, os resultados mostram uma tendência de que a imunização utilizando αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE induz maiores títulos de IgM no 5° e no 6° dias após a imunização (Figura 15 A). Entretanto, as imunizações com αDEC205 e ISO também induziram a produção dessa imunoglobulina. Contudo, com relação a produção de anticorpos IgG, surpreendentemente o direcionamento do antígeno MSP1$_{19}$PADRE para as DCs CD8α$^-$ induziu elevados títulos desses anticorpos no 5° e no 6° dias após a imunização (Figura 15 B). A imunização com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE induziu a produção de baixos títulos de

anticorpos, a resposta humoral foi inferior às imunizações com αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e ISO-MSP1$_{19}$PADRE no 5° e no 6° dias após a primeira dose.

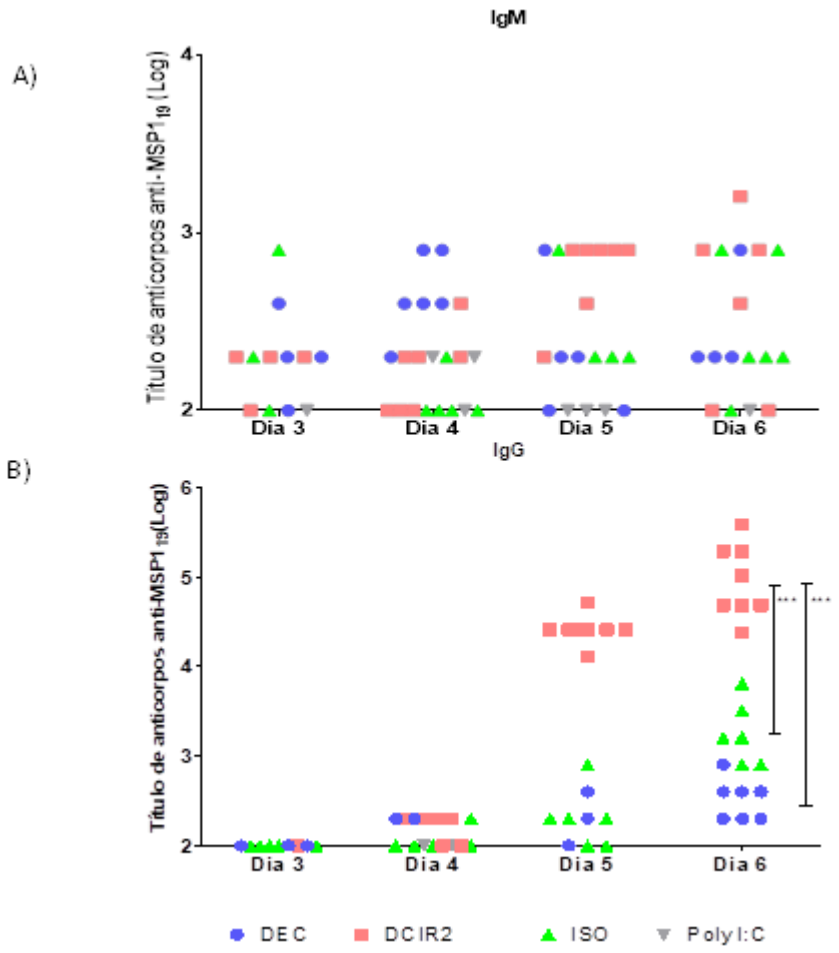


Figura 15 - Resposta humoral induzida pelo direcionamento de antígenos via DEC205 e DCIR2: Camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE, ISO-MSP1$_{19}$PADRE e Poly I:C. 3, 4, 5 e 6 dias após a imunização foi realizada punção cardíaca para obtenção dos soros. Títulos séricos de anti-MSP1$_{19}$ foram determinados por ELISA. (A) Títulos de IgM anti-MSP1$_{19}$ e (B) Títulos de IgG anti-MSP1$_{19}$. Cada símbolo representa um animal individual e os títulos estão apresentados em escala log$_{10}$. Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) em que *** p<0,001. Resultados de três experimentos agrupados.

Além disso, o número de células produtoras de IgM e IgG no baço dos camundongos imunizados foi analisado por ELISpot para confirmar os resultados do ELISA. Não foi verificada diferença significativa no número de células produtoras de anticorpos IgM entre os grupos analisados (Figura 16 A). Já em relação às células produtoras de anticorpos IgG específicos ao antígeno direcionado, o direcionamento da MSP1$_{19}$PADRE para a população de DCs CD8α^{-} induziu o aumento significativo dessas células, confirmando os resultados obtidos com os títulos anticorpos séricos (Figura 16 B). Assim, em conjunto, esses resultados

indicam que a reposta humoral induzida pelo direcionamento de antígenos via o receptor DCIR2 é maior que a resposta humoral induzida pelo direcionamento via DEC205.

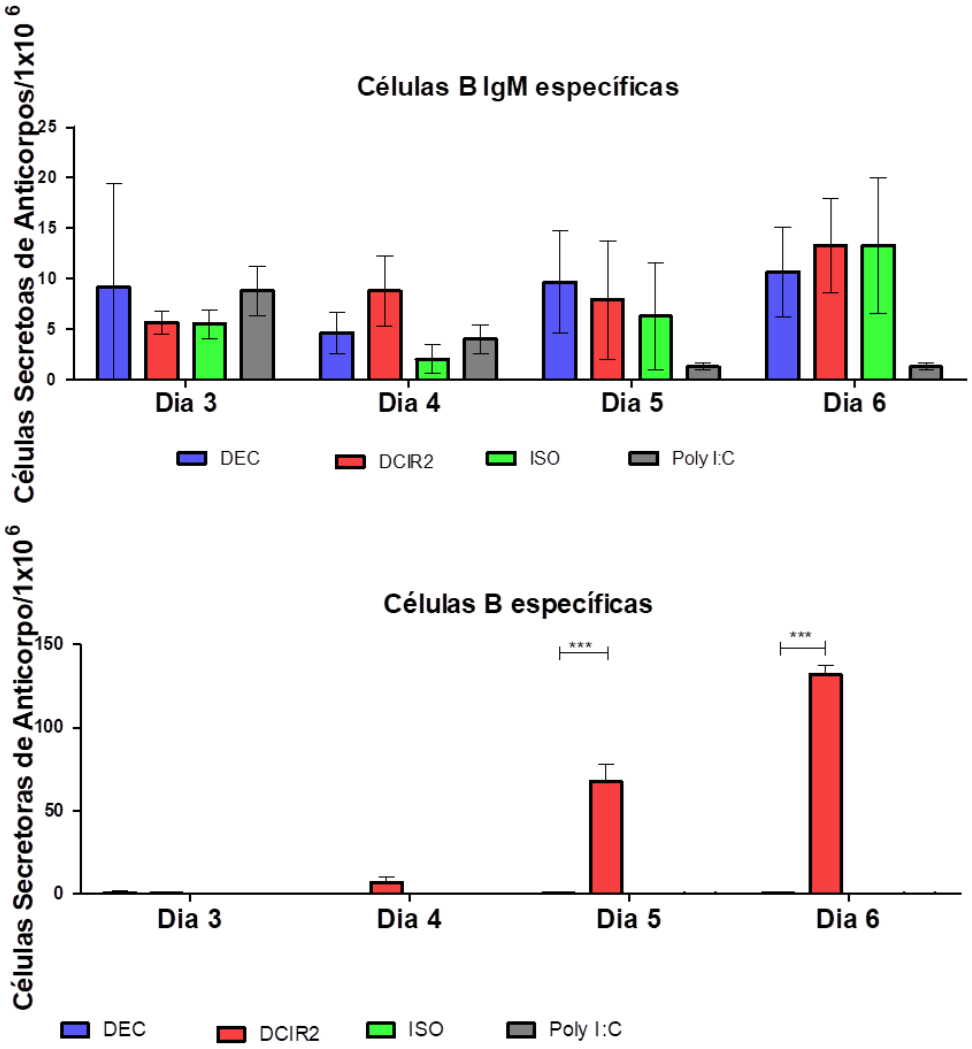


Figura 16 - Células secretoras de anticorpos específicos contra a MSP1$_{19}$. Camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE, ISO-MSP1$_{19}$PADRE e Poly I:C. 3, 4, 5 e 6 dias após a imunização o baço foi retirado. Número de células secretoras IgM (A) e IgG (B) no baço dos animais imunizados por ELISpot. Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) em que *** $p<0,001$. Resultados representativos de três experimentos independentes.

Para estudar essa resposta humoral com maiores detalhes, foi realizado um ELISA de subtipos de anticorpos IgG (IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3). O resultado mostrou que somente nos camundongos imunizados com αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE houve produção de todos os subtipos de anticorpos IgG. A presença de IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 no soro desses camundongos sugere que houve mudança de classe (Figura 17). Nos camundongos

imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE somente foi detectado IgG1 e naqueles que receberam o isotipo controle houve a presença de anticorpos IgG1, IgG2c e IgG2b, mas estes últimos com títulos mais baixos.

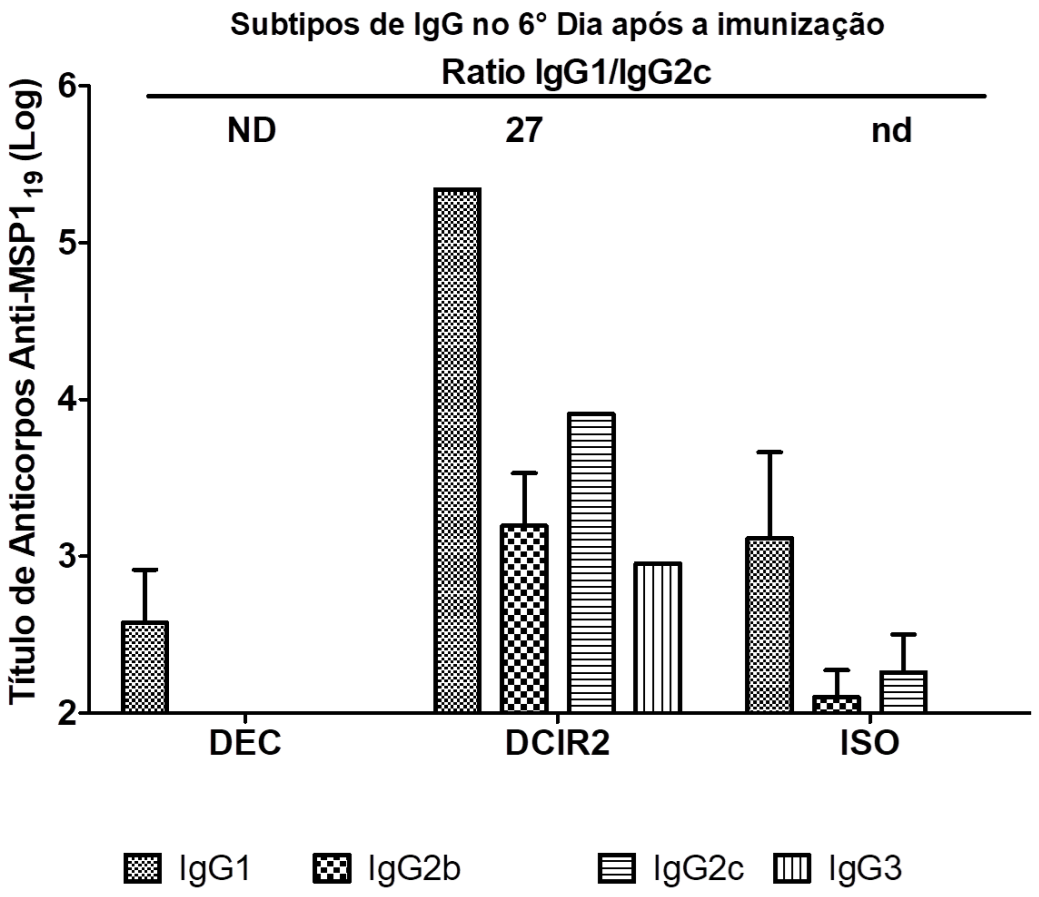


Figura 17 - Subtipos de IgG. Camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE e Poly I:C. Seis dias após a imunização foi realizada a punção cardíaca. E os soros foram usados em um ELISA de subtipos de IgG específicos contra a MSP1$_{19.}$ As barras representam a média ± desvio padrão de amostras individuais. Resultados representativos de três experimentos independentes.

Com isso, pode-se inferir que a montagem da resposta imune induzida pelo direcionamento de antígenos via DCIR2 inicia-se com a promoção de uma forte resposta humoral. Diferentemente, da reposta induzida via DEC205 que induz baixos títulos de anticorpos séricos e células B antígeno específicas, mas induz células T CD4^{+} polifuncionais. Logo, esses resultados sugerem que a montagem da resposta imune pelo direcionamento de

antígenos para o subtipo de DCs CD8α$^+$ ocorre primeiramente pela instrução de uma resposta celular.

4.5 Instrução de células T_{FH}, formação de CG e diferenciação de plasmócitos após a administração da primeira dose da imunização

A diferença na resposta humoral induzida pelo direcionamento de antígenos via DEC205 e DCIR2 sugere que os mecanismos de indução de reposta entre esses dois protocolos de imunização devem ser diferentes entre si. Assim, analisamos a diferenciação de células T_{FH} instruídas pelo direcionamento de antígenos para DCs CD8α$^+$ e CD8α$^-$, bem como utilizamos um controle sem direcionar. A Figura 18 mostra a estratégia de análise da diferenciação de células T_{FH} por citometria de fluxo. Primeiramente foi realizado um *gate* nas células únicas seguido por tamanho x complexidade e células viáveis. As células CD19$^+$ foram excluídas da análise e foram selecionadas as células CD3$^+$CD4$^+$ sendo consideradas células T_{FH} a população de células CXCR5^{High}PD-1^{High}.

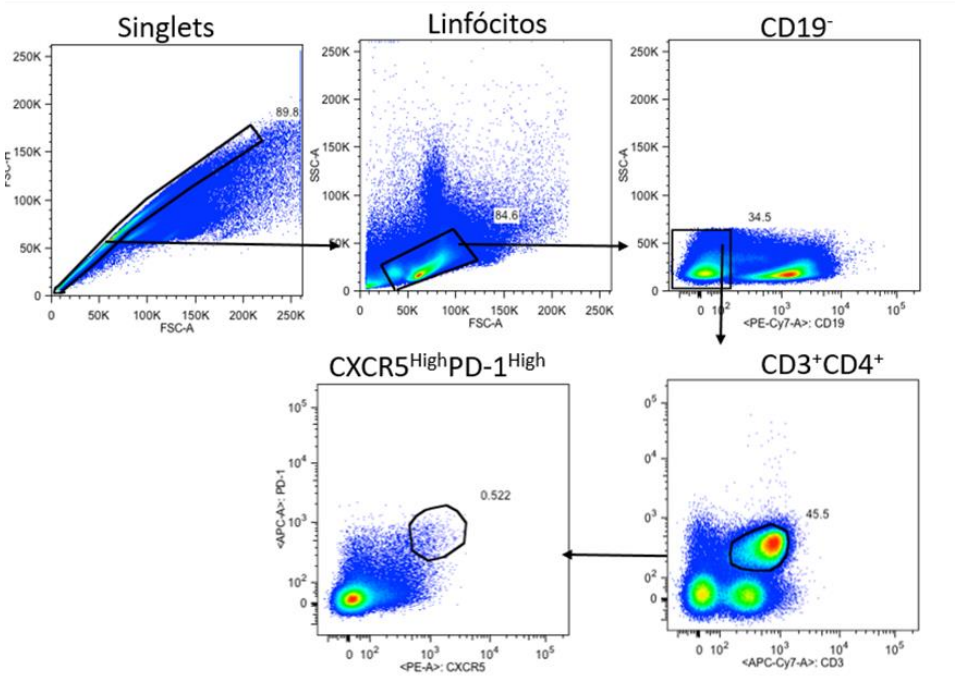


Figura 18: Estratégia de análise de células T_{FH} por citometria de fluxo. Primeiramente foi realizado um *gate* na região de singlets e na região de linfócitos. Posteriormente, selecionou-se as células viáveis e CD19$^-$ CD3$^+$CD4$^+$. Considerou-se T_{FH} as células CXCR5^{High}PD-1^{High}.

Os resultados indicam que os camundongos que foram imunizados com αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE apresentam um maior número de células T_{FH} em relação aos grupos que receberam αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, o isotipo controle ou somente Poly I:C no 5° dia após a imunização. Nenhum dos outros grupos imunizados apresentou aumento de células T_{FH} (Figura 19). Para confirmar que essas células são de fato células $T_{FH,}$ foi avaliada a expressão de Bcl-6, o fator de transcrição responsável por essa polarização de resposta auxiliar. Para isso imunizamos camundongos com αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e Poly I:C e, após 5 dias da imunização, os esplenócitos foram imunofenotipados. Os resultados indicam que as células T CD4^{+}CXCR5^{High}PD-1^{High} são positivas para Bcl-6 e que a mediana de fluorescência para Bcl-6 é superior nessas células quando comparada com as células não-T_{FH} (CD4^{+}CXCR5^{-}PD-1^{-}). Isso confirma que as células T CD4^{+}CXCR5^{High}PD-1^{High} são células T_{FH}. Com esses resultados pode-se afirmar então que o direcionamento do antígeno MSP1$_{19}$PADRE para as DCs CD8α^{-} via DCIR2 induz a polarização de células T CD4^{+} virgens para um perfil de células auxiliares foliculares (Figura 20).

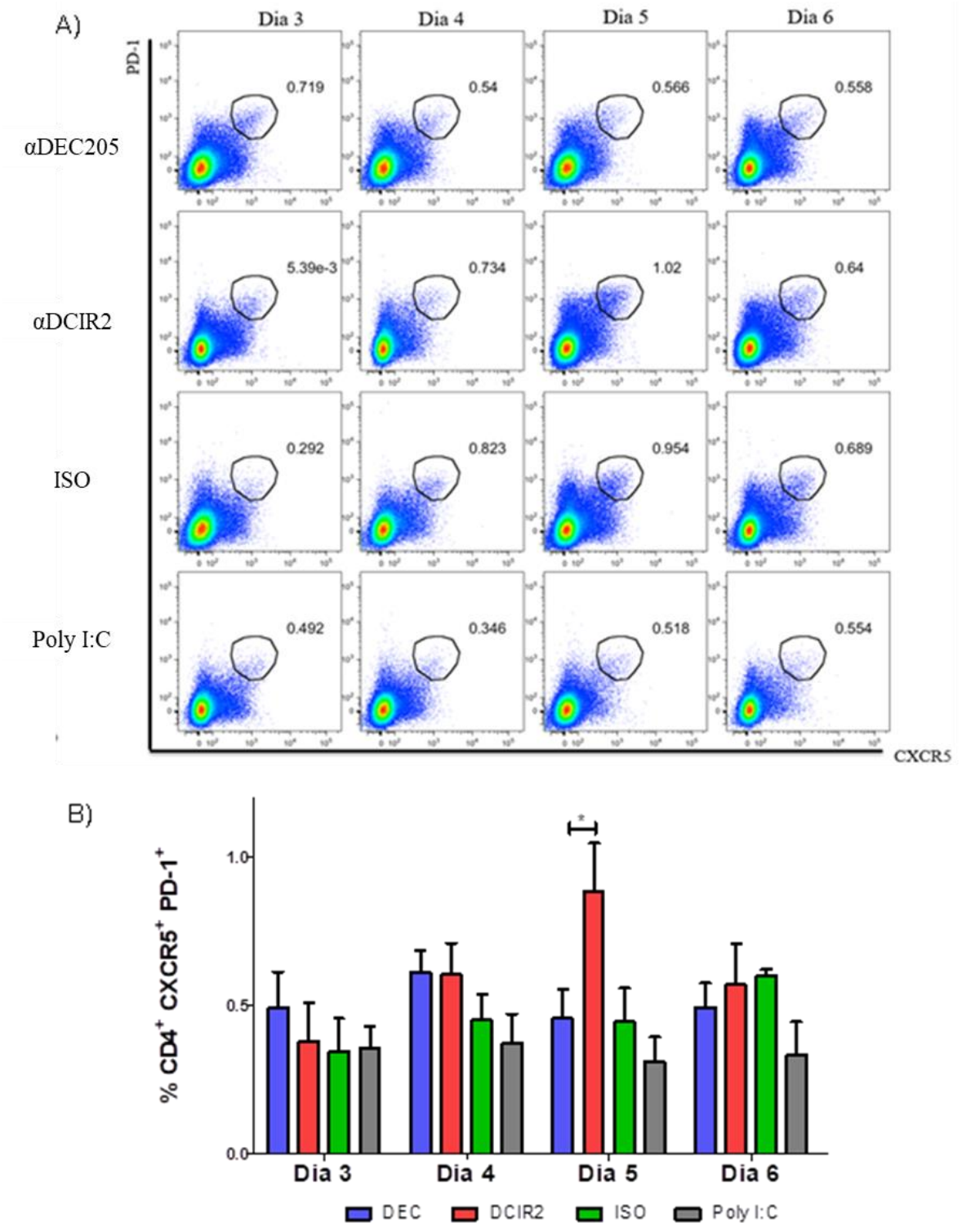


Figura 19 - Diferenciação de Células T_{FH}. Camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE, ISO-MSP1$_{19}$PADRE e Poly I:C. O baço foi retirado 3, 4, 5 e 6 dias após a imunização e as células foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos. (A) *Dot plots* de citometria de fluxo das células do baço com *gate* nas células T_{FH}. Dados representativos de três experimentos independentes. (B) Porcentagem de células T_{FH} dos camundongos imunizados. Resultados de três experimentos independentes. Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) em que * $p<0,05$. As barras representam a média ± erro padrão das médias obtidas em cada experimento.

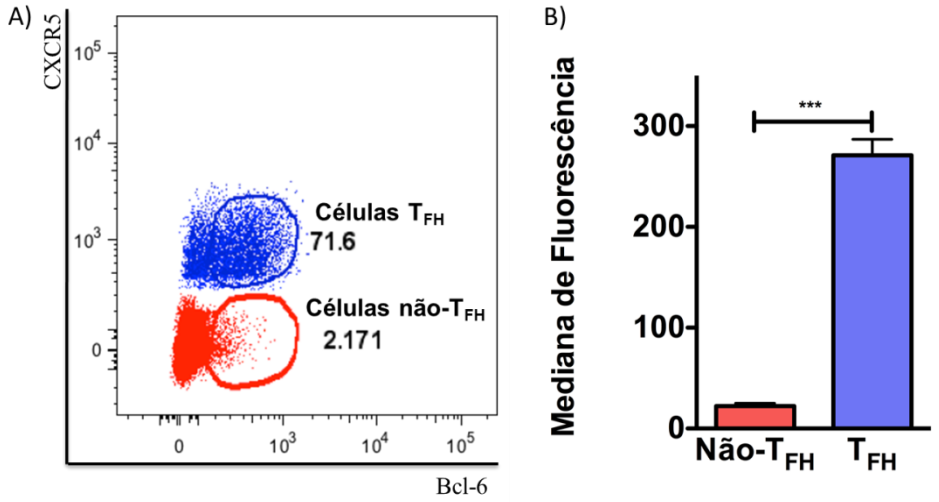


Figura 20 - Expressão de Bcl-6 em células T_{FH} e não-T_{FH}: Camundongos foram imunizados com αDCIR2-MSP1_{19}PADRE e Poly I:C. Cinco dias após a imunização, o baço foi retirado e marcado com anticorpos conjugados a fluorocromos. (A) Dot plot da citometria de fluxo das células do baço com *gate* nas células T_{FH} ($CD4^+CXCR5^{+High}PD\text{-}1^{High}$) em azul e não-$T_{FH}$ ($CD4^+CXCR5^-PD\text{-}1^-$) em vermelho. Foi realizado um *gate* em células únicas, células viáveis, $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD\text{-}1^+$. (B) Mediana de fluorescência de Bcl-6 nas células T_{FH} e não-$T_{FH.}$ Na análise estatística foi aplicado o teste T em que *** p<0,001.

Devido ao aumento de células T_{FH} em nossos experimentos, também foi analisada a formação de CG, pois as células T_{FH} estão funcionalmente associadas por promoverem a formação de CG. Por citometria de fluxo, consideramos células do CG as células que expressam os marcadores $B220^+GL\text{-}7^+CD95^+$. A análise foi realizada de acordo com a figura 21. Primeiramente foi realizado um *gate* na região de células únicas e na região de linfócitos de acordo com o tamanho x complexidade das células. As células não viáveis e $CD3^+$ foram excluídas da análise, sendo consideradas células B do CG as células $B220^+GL\text{-}7^+CD95^+$.

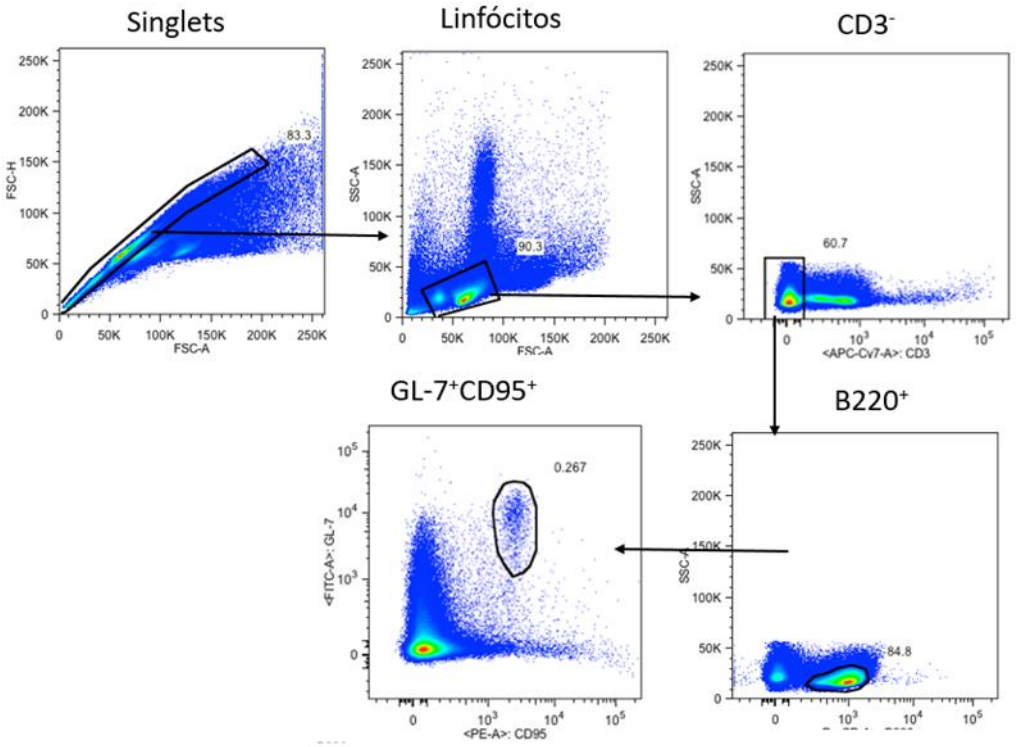


Figura 21 - Estratégia de análise de células B do centro germinativo. Primeiramente foi realizado um *gate* na região de singlets e na região de linfócitos. Posteriormente, selecionou-se as células $CD3^{-}B220^{+}$. Considerou-se T_{FH} as células $GL\text{-}7^{+}CD95^{+}$.

Dessa forma, os esplenócitos de camundongos imunizados com αDEC205-$MSP1_{19}$PADRE, αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE ou ISO-$MSP1_{19}$PADRE e de Poly IC foram analisados. Os resultados de citometria de sugerem que houve um aumento de células B do CG no 5º dia após a imunização nos camundongos que foram imunizados com αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE. Os camundongos imunizados com αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE apresentaram um maior número de células $B220^{+}GL\text{-}7^{+}CD95^{+}$ em relação ao grupo que recebeu o αDEC205-$MSP1_{19}$PADRE (Figura 22). Nenhum dos outros grupos apresentou aumento de células B do CG. Com isso, o direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^{-}$ também promoveu a formação de CG.

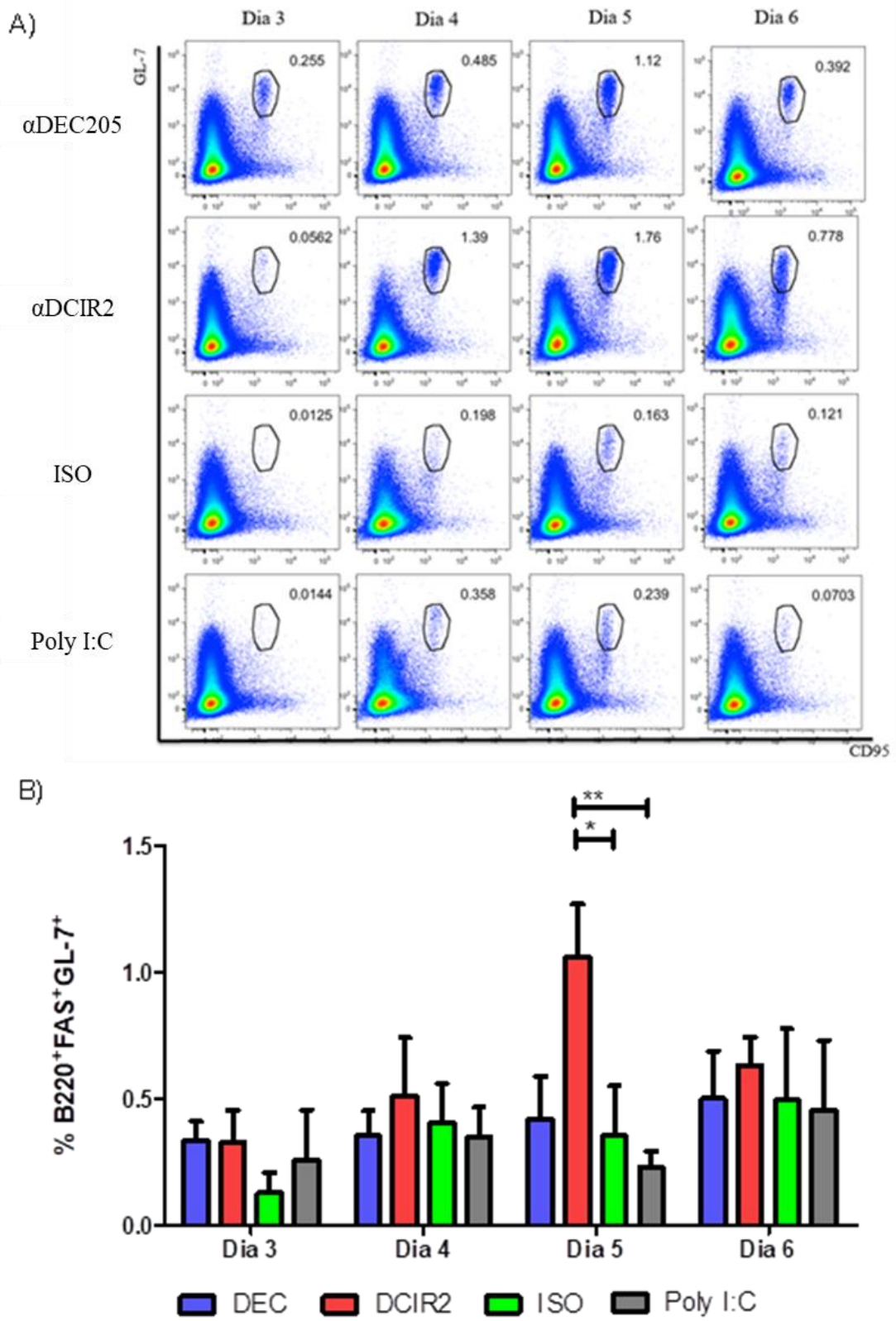


Figura 22 - Formação do centro germinativo: Camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE e Poly I:C. O baço foi retirado 3, 4, 5 e 6 dias após a imunização e os esplenócitos foram marcados com anticorpos conjugados a fluorocromos. (A) *Dot plots* de citometria de fluxo das células do baço com *gate* nas células B do CG. (B) Porcentagem de células do CG dos camundongos imunizados (média± DP). Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) em que ** $p<0,01$ e * $p<0,05$. As barras representam a média ± erro padrão das médias obtidas em cada experimento. Dados representativos de 3 experimentos independentes.

Além disso, foi analisada por citometria de fluxo a diferenciação de células plasmáticas secretoras de anticorpos ($B220^{Low}CD138^{High}$) também chamadas de plasmócitos. A estratégia de análise está indicada na Figura 22. Os resultados indicaram que somente os camundongos imunizados com αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE apresentaram um aumento significativo das células $B220^{Low}CD138^{High}$ no 5º e no 6º dias após a imunização (Figura 23). As imunizações com αDEC205-$MSP1_{19}$PADRE e com o isotipo controle não foram capazes de instruir a diferenciação dessas células. Dessa forma, com esses resultados pode-se concluir que o direcionamento de antígenos à população de DCs $CD8\alpha^-$ induz uma robusta resposta humoral na fase de montagem da resposta imune.

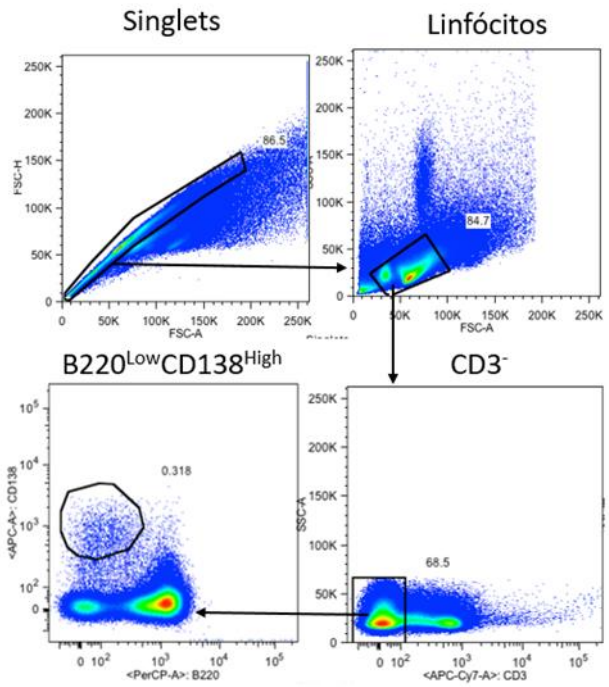


Figura 23 - Estratégia de análise de células B Plasmáticas. Primeiramente foi realizado um *gate* na região de *singlets* e na região de linfócitos. Posteriormente, selecionou-se as células $CD3^-$. Considerou-se células B plasmáticas as células $B220^{Low}CD138^{High}$.

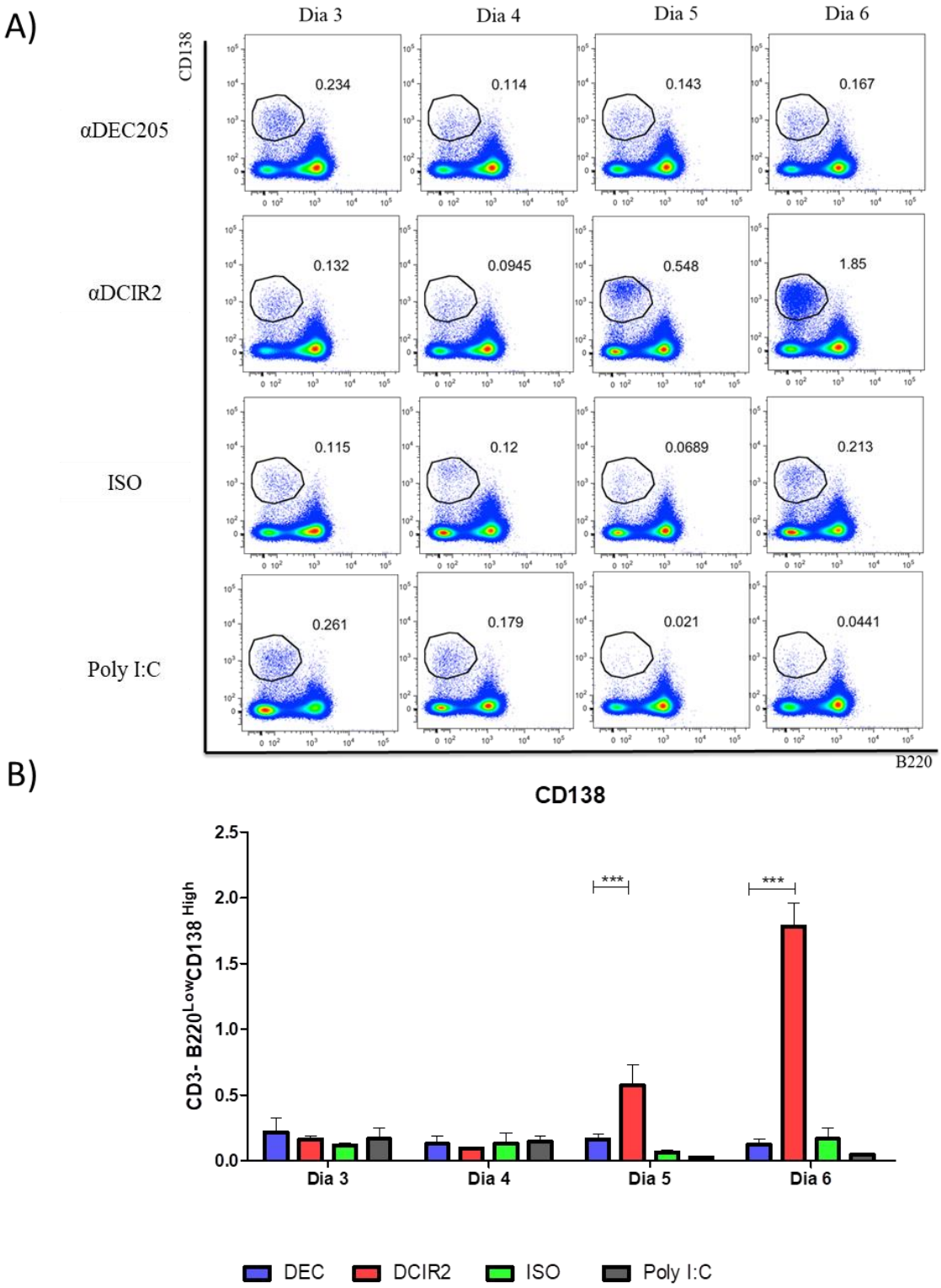


Figura 24 - Diferenciação de células B plasmáticas. Esplenócitos dos camundongos imunizados foram marcados com anticorpos conjugados a fluorocromos. (A) Os gráficos mostram a população de células plasmáticas dentro da população de células $CD3^{-}$. (B) Média ± DP da porcentagem de células $B220^{Low}CD138^{High}$. Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) em que *** $p<0,001$. Resultados representativos de 3 experimentos independentes.

4.6 Análise da influência de células T $CD4^+$ na formação de centro germinativo, diferenciação de plasmócitos e na produção de anticorpos

Até o momento, os resultados indicam que o direcionamento de antígenos para as DCs $CD8\alpha^-$ induz a diferenciação de plasmócitos, a formação de centros germinativos e altos títulos de anticorpos 6 dias após a primeira imunização. Para descartar a hipótese que essa resposta poderia ser instruída somente pela ativação de células B devido ao acúmulo de antígenos na região marginal da zona de células B, foram imunizados camundongos selvagens *"wild type*" (WT) e camundongos nocaute para CD4 (CD4 KO) (CHAPPELL et al., 2012). Seis dias após a primeira imunização, detectamos um aumento do número de plasmócitos, de células B do centro germinativo e altos títulos de anticorpos específicos ao antígeno direcionado nos camundongos WT. Já nos animais CD4 KO não houve a promoção dessa resposta pois detectamos uma diminuição significativa de plasmócitos, células B do centro germinativo e, inclusive, dos títulos séricos de anticorpos (Figura 25). Assim, pode-se concluir que a resposta humoral promovida pelo direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^-$ é dependente de células T $CD4^+$. Desta forma, os plasmócitos, bem como o centro germinativo e os anticorpos anti-$MSP1_{19}$ não são induzidos somente pela ativação de células B por células T $CD4^+$.

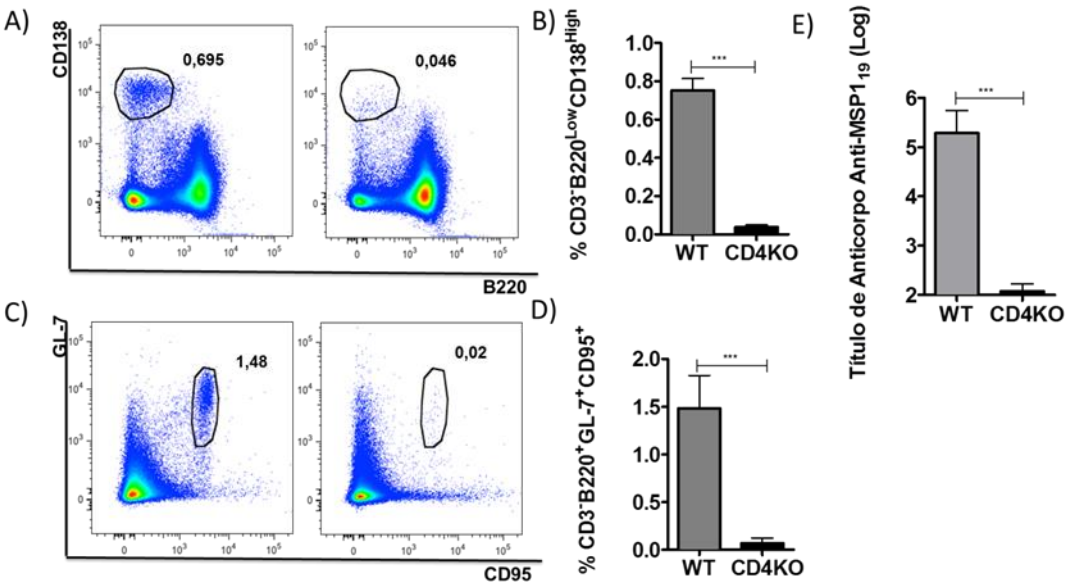


Figura 25 - Células T CD4$^+$ participam da formação de centros germinativos, diferenciação de plasmócitos e da produção de anticorpos quando o antígeno é direcionado para DCs CD8α$^-$. Camundongos *wild type* (WT) e CD4 KO foram imunizados com αDCIR2-MSP1_{19}PADRE e Poly I:C. Cinco dias após a imunização, o baço foi retirado e os esplenócitos foram marcados com anticorpos conjugados a fluorocromos. *Dot plots* de citometria de fluxo dos esplenócitos indicando os plasmócitos (B220^{low}CD138$^+$) com *gate* em células CD3$^-$ (A) e as células B do centro germinativo (GL-7$^+$CD95$^+$) com *gate* em células CD3$^-$B220$^+$ (C). (B) Porcentagem relativa de plasmócitos e de (D) células B do centro germinativo. (E) Títulos de anticorpos específicos para a proteína MSP1_{19} por ELISA. Na análise estatística foi aplicado o teste t-Student em que *** p<0,001 em (B), (D) e (E).

4.7 Análise de células T_{FH}, do centro germinativo e dos plasmócitos antes da segunda dose

Para entender melhor a resposta montada após a segunda dose dos mAbs quiméricos, analisamos primeiramente a diferenciação de células T_{FH}, do centro germinativo e de plasmócitos 14 dias após a administração da primeira dose, no mesmo dia em que a segunda seria administrada. Os resultados de citometria de fluxo mostram que a porcentagem de células T_{FH}, células B do centro germinativo e plasmócitos são semelhantes entre os grupos imunizados (Figura 26). Isso indica que nesse período não há diferença no número dessas células no baço dos camundongos imunizados com αDEC205-MSP1_{19}PADRE, αDCIR2-MSP1_{19}PADRE ou ISO-MSP1_{19}PADRE usando Poly I:C como adjuvante. Dessa forma, os resultados das análises dessas repostas depois da segunda dose não sofrem influência da celularidade basal no momento da administração da segunda dose. Assim, as possíveis diferenças entre os grupos de camundongos imunizados resultarão da expansão de células

instruídas na primeira dose ou de uma nova reposta montada a partir da segunda administração dos mAbs quiméricos.

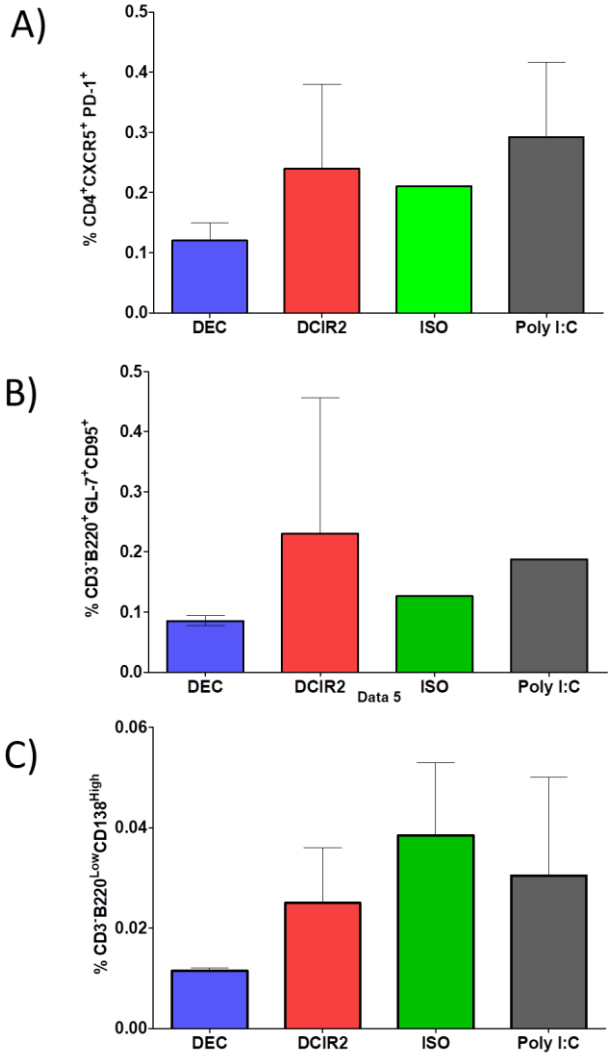


Figura 65 - Citometria de fluxo de células T_{FH}, das células B do centro germinativo e dos plasmócitos. Camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE na presença Poly I:C. Quatorze dias após a imunização, o baço foi retirado e os esplenócitos foram marcados com anticorpos conjugados a fluorocromos para marcação de células T_{FH} (A), células B do centro germinativo (B) e plasmócitos (C).

4.8 Resposta imune celular após a segunda dose da imunização

Para avaliar a influência da segunda dose dos mAbs quiméricos na reposta imune induzida pelo direcionamento de antígenos para as DCs CD8α$^+$ e CD8α$^-$ via DEC205 e DCIR2, respectivamente, imunizamos animais com duas doses dos mAbs quiméricos. A

primeira dose foi administrada na presença de Poly IC como adjuvante, enquanto que a segunda dose foi administrada 14 dias após a primeira na ausência de Poly IC para evitar instrução de novas células. Os camundongos foram imunizados pela via intraperitoneal com 5µg dos mAbs αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE utilizando ou não 50 µg de Poly I:C ou somente Poly I:C ou salina. Três, 4, 5 e 6 dias após administração da segunda dose, os camundongos foram eutanasiados e as respostas imunes celular e humoral foram avaliadas. Assim, pode-se avaliar a montagem da resposta imune logo após a segunda dose, bem como as respostas secundárias instruídas por cada subtipo de DCs.

A resposta celular induzida pelo direcionamento de antígenos para os dois subtipos de DCs foi determinada por ELISpot e marcação intracelular de citocinas (ICS). Os resultados revelam que os animais imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE apresentaram um maior número de células produtoras de IFN-γ em relação aos camundongos que receberam αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e ISO-MSP1$_{19}$PADRE nos dias 4, 5 e 6 após a segunda administração dos mAbs. Quando o antígeno foi direcionado para as DCs CD8α^{-} com a utilização do mAb αDCIR2, houve um aumento de células produtoras de IFN-γ em relação ao controle ISO-MSP1$_{19}$PADRE somente no 6° dia após a administração da segunda dose e que foi significativamente inferior ao direcionamento do antígeno MSP1$_{19}$PADRE via DEC205 (Figura 27). Assim, o direcionamento de antígenos para as DCs CD8α^{+} induz um maior número de células produtoras de IFN-γ após a administração da segunda dose.

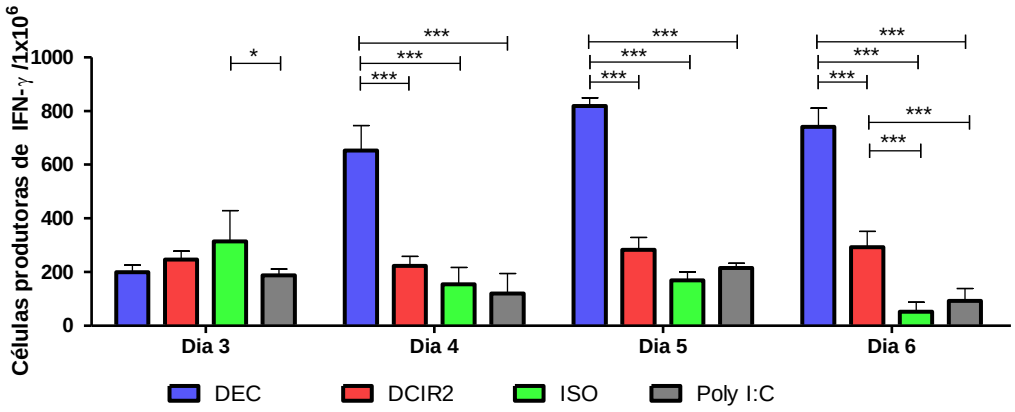


Figura 27 - ELISpot de células produtoras de IFN-γ. ELISpot para células produtoras de IFN-γ induzidas pelo direcionamento de antígenos para DCs dos dias 3 a 6 após a administração da segunda dose dos mAbs αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE na presença de Poly I:C. Esplenócitos foram reestimulados com 1µg/mL da proteína MSP1$_{19}$PADRE por 24 horas a 37° e 5% de CO_2. Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) em que *** $p<0,001$ e * $p<0,05$. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

Para melhor caracterização da resposta celular induzida pelo direcionamento de antígenos para esses dois subtipos de DCs, foi realizada uma marcação intracelular de citocinas (IFN-γ, IL-2, TNF-α) analisando-se a produção dessas citocinas por células T CD4$^+$. Quando camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, houve um aumento significativo do número de células T CD4$^+$ produtoras de IFN-γ, IL-2 e TNF-α em relação aos demais grupos 3, 4, 5 e 6 dias após a administração da segunda dose, exceto na produção de IL-2 no terceiro dia, quando comparado ao grupo imunizado com αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE. Por outro lado, a imunização com αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e ISO-MSP1$_{19}$PADRE não induziu aumento do número de células que expressam IFN-γ, IL-2 e TNF-α no mesmo período de tempo. Houve apenas diferença significativa quanto a produção de TNF-α no grupo imunizado com αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE e Poly IC no 4° dia após a administração da segunda dose (Figura 28).

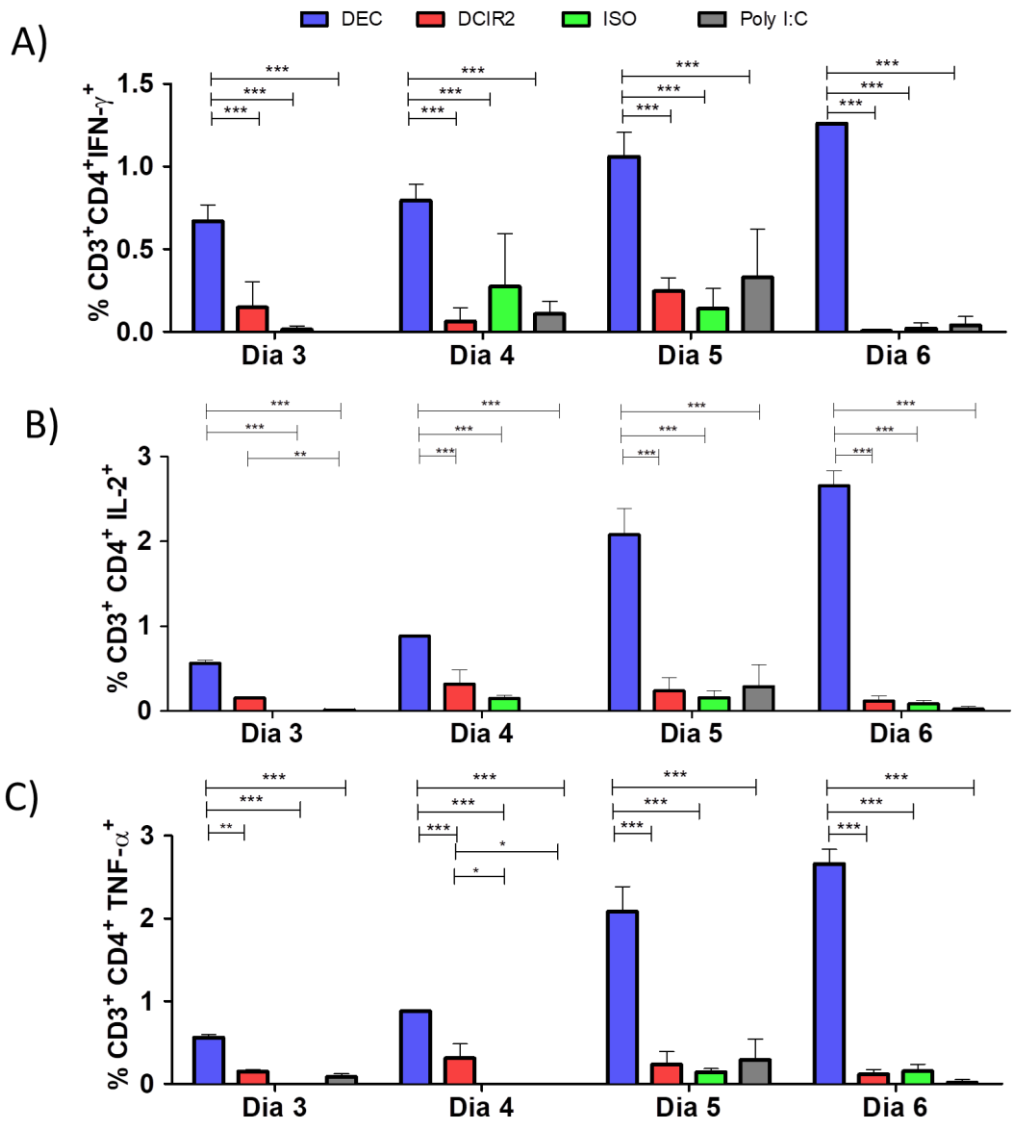


Figura 28 - Expressão de IFN-γ, IL-2 e TNF-α em células T CD4$^+$ induzidas pelo direcionamento de antígenos via DEC205 e DCIR2. Camundongos foram imunizados com duas doses de αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE na presença de Poly I:C. Três, 4, 5 e 6 dias após a segunda imunização, o baço foi retirado e as células estimuladas com 5 µg/mL da proteína MSP1$_{19}$PADRE *ex vivo*. A secreção de citocinas foi bloqueada com brefeldina A por 12 horas. Após este período, as células foram marcadas para receptores extracelulares, fixadas, permeabilizadas e as citocinas IFN-γ, IL-2 e TNF-α foram marcadas. Foi realizado um *gate* em células viáveis, células CD3$^+$CD4$^+$ e a porcentagem de células produtoras de IFN-γ (A), IL-2 (B) e TNF-α (C) foi determinada descontando das amostras estimuladas a produção das citocinas das células sem estímulo. Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) em que *** $p<0,001$ e * $p<0,05$. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

Além disso, as análises de células polifuncionais por ICS mostraram que somente quando o antígeno é direcionado para DCs via DEC205 há indução de células produtoras de mais de uma citocina. Os camundongos imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE tiveram

um aumento das células T CD4$^+$ triplo funcionais produtoras de IFN-γ, IL-2 e TNF-α simultaneamente. Também, houve um aumento das células duplo funcionais produtoras de IL-2/TNF-α, de IFN-γ/TNF-α e de IL-2/IFN-γ, além das células produtoras somente de uma citocina. A imunização com αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE não promoveu essa resposta (Figura 29).

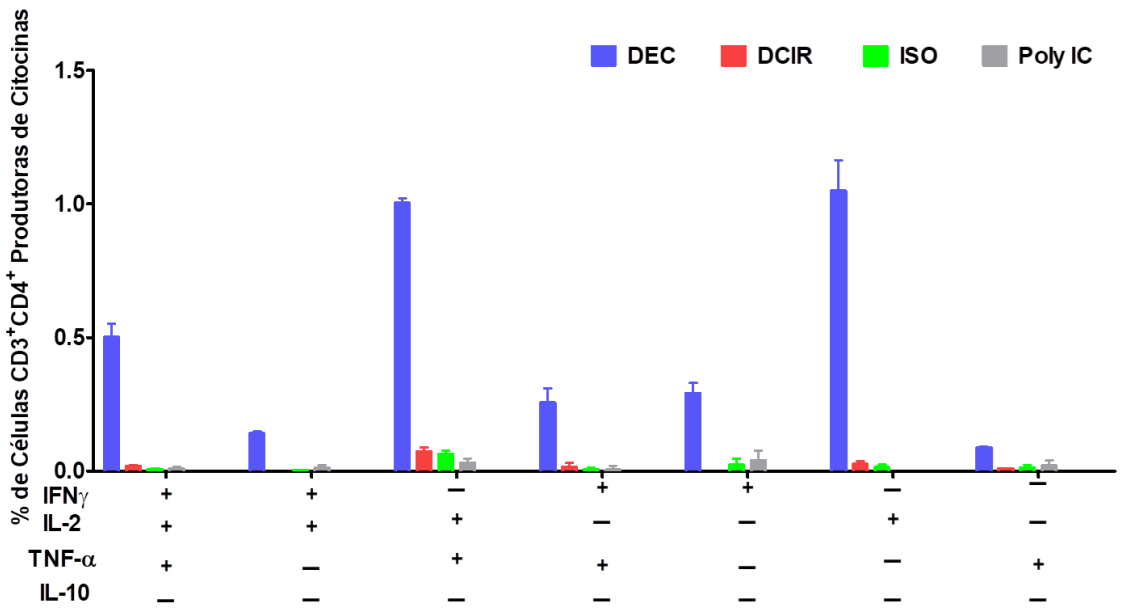


Figura 29 - Células produtoras de uma, duas ou três citocinas no sexto dia após a segunda dose. *Boolean gates* foram aplicados nos resultados de marcação intracelular de citocinas. A porcentagem de células produtoras de uma, duas ou três citocinas foi determinada descontando-se as amostras sem estímulo. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

Como não detectamos células T CD4$^+$ produtoras de IFN-γ, IL-2 e TNF-α quando o antígeno foi direcionado para as DCs CD8α$^-$ via DCIR2, realizamos também uma marcação intracelular para IL-17a e IL-10. Não detectamos células produtoras de IL-17a em nenhum dos grupos imunizados (resultados não mostrados). Em relação à expressão de IL-10 por células T auxiliares, surpreendentemente houve um aumento do número dessas células produzindo IL-10 3, 4, 5 e 6 dias após a administração da segunda dose do mAb αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE. Uma análise através de *boolean gates* mostrou que estas células produziam exclusivamente IL-10, sendo incapazes de produzir IFN-γ, IL-2 ou TNF-α (Figura 30).

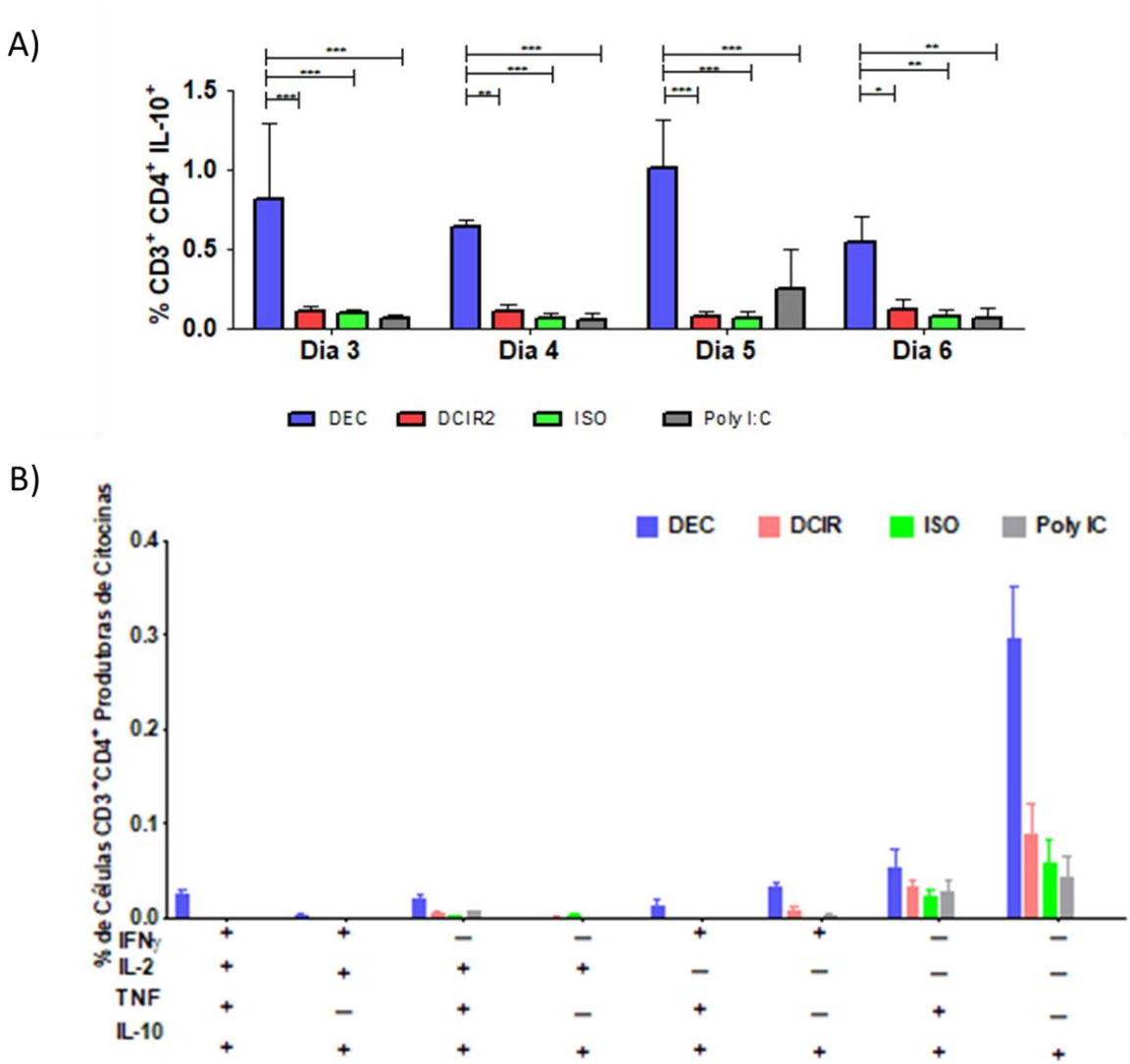


Figura 30 - Expressão de IL-10 em células T CD4$^+$ induzidas pelo direcionamento de antígenos via DEC205 e DCIR2. Camundongos foram imunizados com duas doses dos mAbs αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE na presença de Poly I:C. Três, 4, 5 e 6 dias após a segunda imunização, o baço foi retirado e as células foram estimuladas com 5 µg/mL da proteína MSP1$_{19}$PADRE *ex vivo*. (A) Foi realizado um *gate* em células viáveis, células CD3$^+$CD4$^+$ e a porcentagem de células produtoras de IL-10 foi determinada. (B) *Boolean gates* foram aplicados nos resultados de marcação intracelular de citocinas. A porcentagem de células produtoras polifuncionais foi determinada. Os resultados foram normalizados descontando-se as amostras não estimuladas. Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) em que *** p<0,001 e * p<0,05. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

4.9 Resposta imune humoral após a segunda dose da imunização

A resposta humoral foi determinada pela avaliação dos níveis séricos de anticorpos IgG específicos para a proteína MSP1$_{19}$ nos animais imunizados. Observamos elevados títulos de anticorpos anti-MSP1$_{19}$ nos animais imunizados com o mAb αDCIR2-

MSP1$_{19}$PADRE entre os dias 3 e 6 após a administração da segunda dose. Em contrapartida, os animais que receberam αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE ainda apresentaram baixos títulos de anticorpos que foram aumentando entre os dias 3 e 6 depois da segunda dose, não chegando, no entanto, aos níveis observados nos animais imunizados com o αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE. Em relação ao controle não direcionado (animais que foram imunizados com ISO-MSP1$_{19}$PADRE), também houve a produção anticorpos específicos contra a proteína MSP1$_{19}$ (Figura 31).

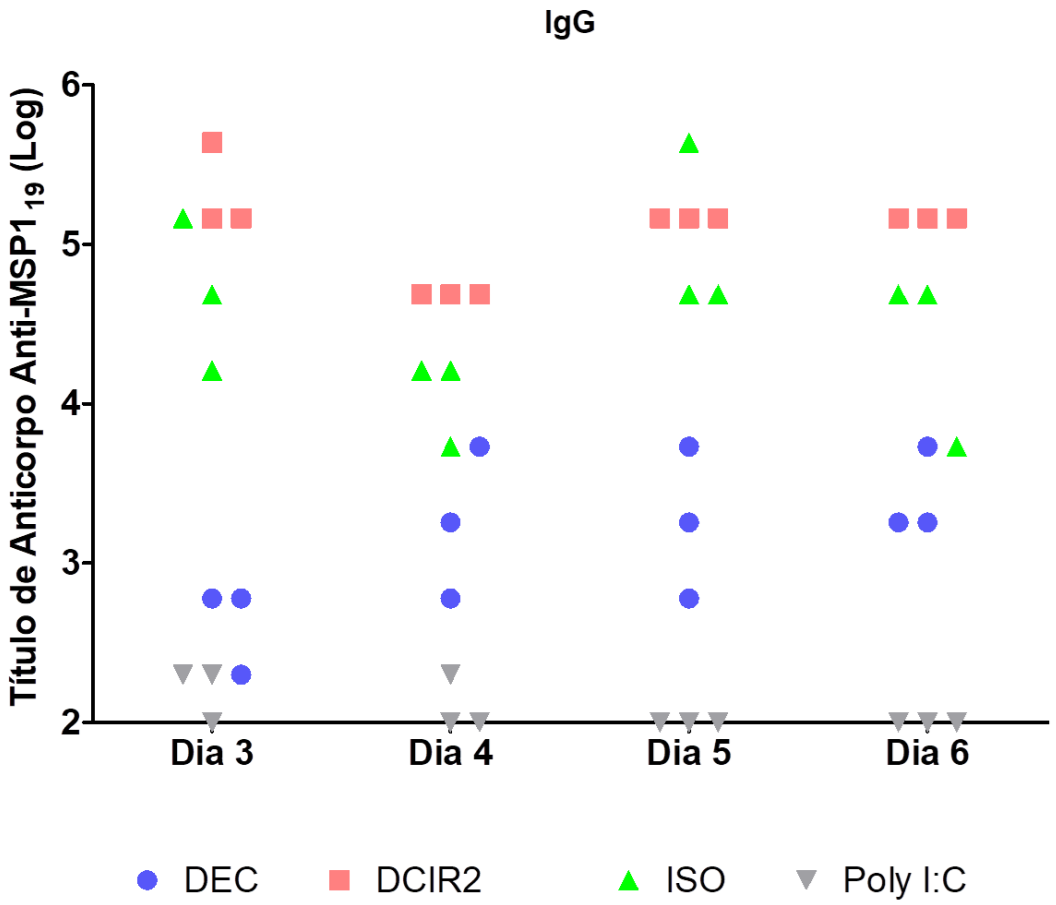


Figura 31- Resposta humoral induzida pelo direcionamento de antígenos via DEC205 e DCIR2: Camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE na presença de Poly I:C. Três, 4, 5 e 6 dias após a segunda imunização foi realizada punção cardíaca para obtenção dos soros. Títulos séricos de anti-MSP1$_{19}$ foram determinados por ELISA. Títulos de IgG anti-MSP1$_{19}$, utilizando anticorpo secundário anti-IgG-HRP (1:2000) e 1 µg/mL da proteína recombinante MSP1$_{19}$ adsorvida na placa. Cada símbolo representa um animal individual e os títulos estão apresentados em escala log$_{10}$. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

Para analisar a resposta humoral com mais detalhes, avaliamos também os títulos para as subclasses de IgG. Os resultados anteriores indicaram que o direcionamento de antígeno

para a população de DCs CD8α$^-$ induziu mudança de classe 6 dias após a primeira dose da imunização. Depois da segunda administração, esse grupo manteve o mesmo padrão de resposta, com níveis superiores de IgG1. Porém, observamos que a razão IgG1/IgG2c caiu com o passar do tempo. Na imunização com o mAb αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, a mudança de classe começou a acontecer depois do segundo contato com o antígeno, quando detectamos IgG1 e IgG2b no terceiro e quarto dias após a imunização, respectivamente. Além disso, salientamos que a razão IgG1/IgG2c quando ocorre o direcionamento de antígenos para a população DCs CD8α$^+$ é consideravelmente inferior quando comparada a imunização com αDCIR-MSP1$_{19}$PADRE (Figura 32).

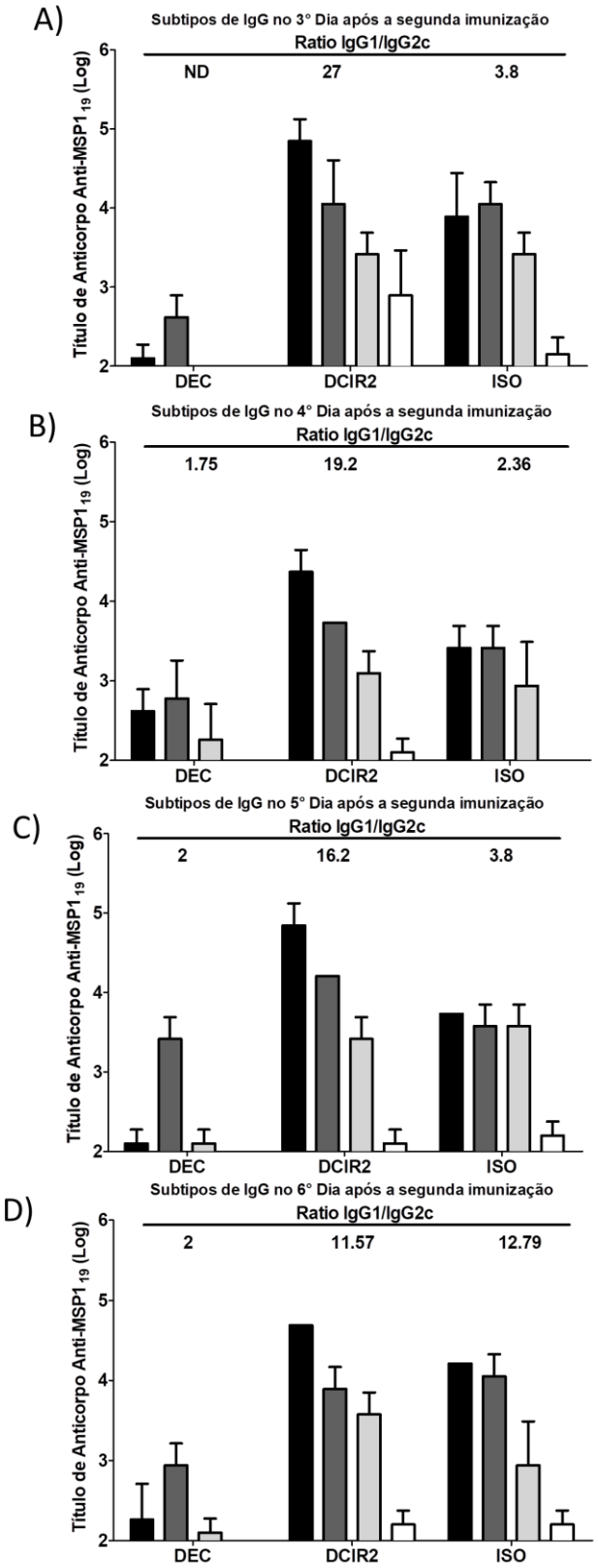


Figura 32 - Subtipos de IgG. Camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE na presença de Poly I:C. Entre os dias 3 e 6 após a segunda imunização foi realizada a punção cardíaca e os soros foram usados em um ELISA de subtipos de IgG específicos contra a MSP1$_{19.}$ As barras pretas indicam o título de anticorpos IgG1, as barras cinza escuro IgG2b, cinza claro IgG2c e branca IgG3. Subtipos de IgG detectados após 3 (A), 4 (B), 5 (C) e 6 (D) dias da imunização.

4.10 Análise da polarização de células T $CD4^+$ para T_{FH}, formação de centros germinativos e diferenciação de plasmócitos após a administração da segunda dose dos mAbs quiméricos

Depois da primeira dose da imunização, somente os camundongos que foram imunizados com αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE aumentaram o número de células T_{FH} 5 dias após a imunização. Para complementar esta observação, realizamos um experimento analisando essas células depois da administração da 2ª dose dos mAbs. Para nossa surpresa, quando o antígeno foi direcionado para as DCs $CD8\alpha^+$, houve um aumento significativo de células T_{FH}. Além disso, observaram-se duas populações dessas células: uma com um perfil $CXCR5^{High}PD\text{-}1^{High}$, que se mantém elevada do 3° ao 4° dia depois da segunda dose, e outra com perfil $CXCR5^{Inter}PD\text{-}1^{Inter}$, que permanece em número superior em todos os dias analisados. Não houve aumento dessas células nos camundongos imunizados com αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE ou ISO-$MSP1_{19}$PADRE. Assim, o direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^+$ estimula a diferenciação de células T_{FH} após a segunda imunização (Figura 33).

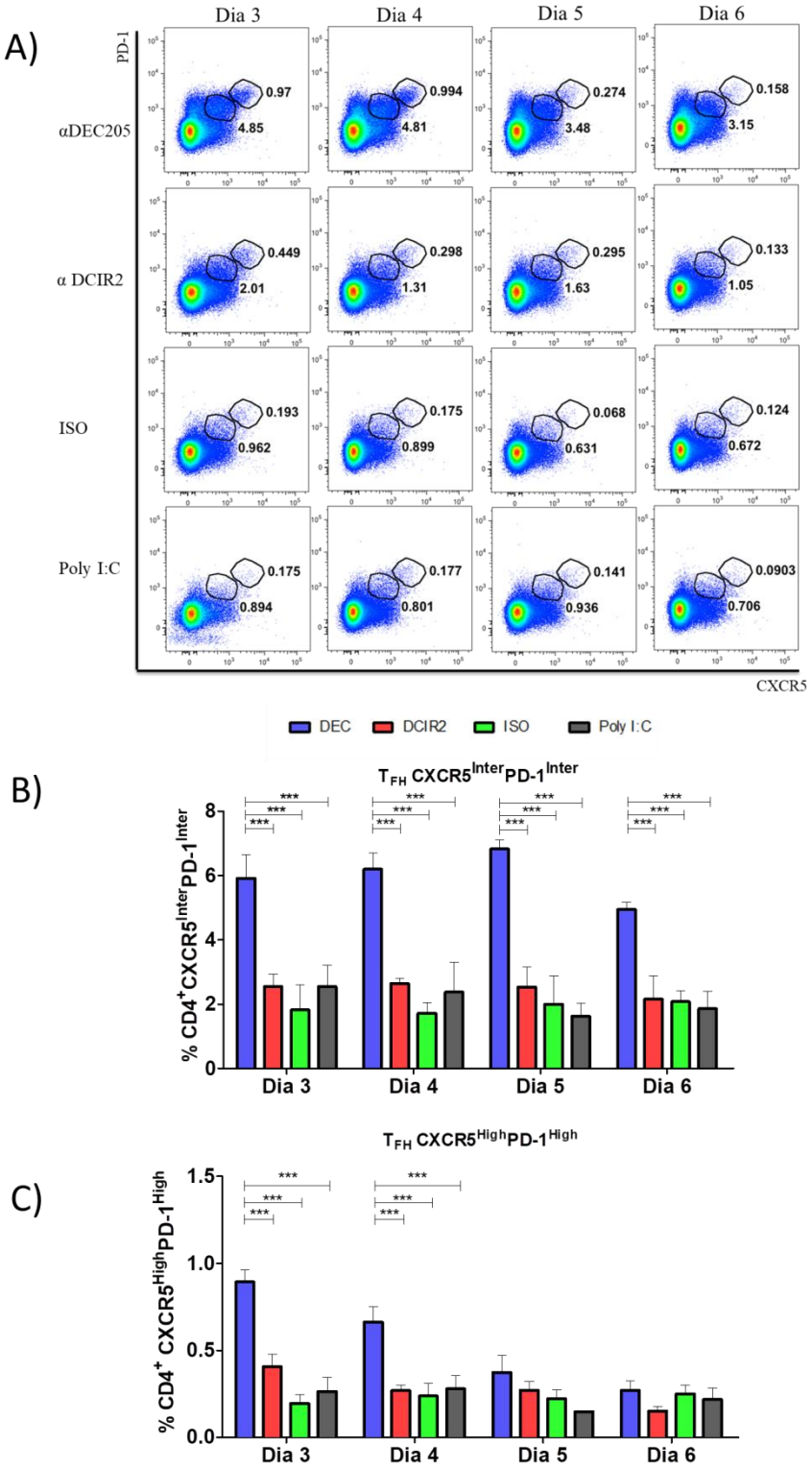


Figura 33 - Citometria de fluxo de células T_{FH}: Camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE na presença de Poly I:C. Quatorze dias após a primeira imunização, foi administrada uma segunda dose sem adjuvante. O baço foi retirado 3, 4, 5 e 6 dias depois e os esplenócitos foram marcados com anticorpos conjugados a fluorocromos para marcação de células $T_{FH.}$ (A) *Dot Plots* representativos de células T_{FH} com *gate* em $CD19^{-}CD3^{+}CD4^{+}$. Porcentagem de $CXCR5^{Inter}PD\text{-}1^{Inter}$ (B) e $CXCR5^{High}PD\text{-}1^{High}$ (C). Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) em que *** $p<0,001$ e * $p<0,05$. Resultado de dois experimentos independentes agrupados.

Analisamos também a formação de centros germinativos, considerando as células $CD3^-$ $B220^+GL\text{-}7^+CD95^+$ como linfócitos B do centro germinativo. Os resultados de citometria de fluxo indicam que não houve diferença significativa quanto à formação de centros germinativos em nenhuma das imunizações em nenhum dos tempos analisados (Figura 34). Entretanto, houve um aumento de plasmócitos ($CD3^-B220^{Low}CD138^{High}$) no direcionamento de antígenos tanto para a população de DCs $CD8\alpha^+$ quanto para a $CD8\alpha^-$ 4 e 5 dias após a administração da segunda dose (Figura 35). Assim, esses resultados agrupados indicam que no segundo contato com o antígeno houve um aumento de duas populações de células T_{FH} ($CXCR5^{High}PD\text{-}1^{High}$ e $CXCR5^{Inter}PD\text{-}1^{Inter}$) quando o antígeno foi direcionado via DEC205, mas não houve aumento de células B do centro germinativo no período de tempo analisado.

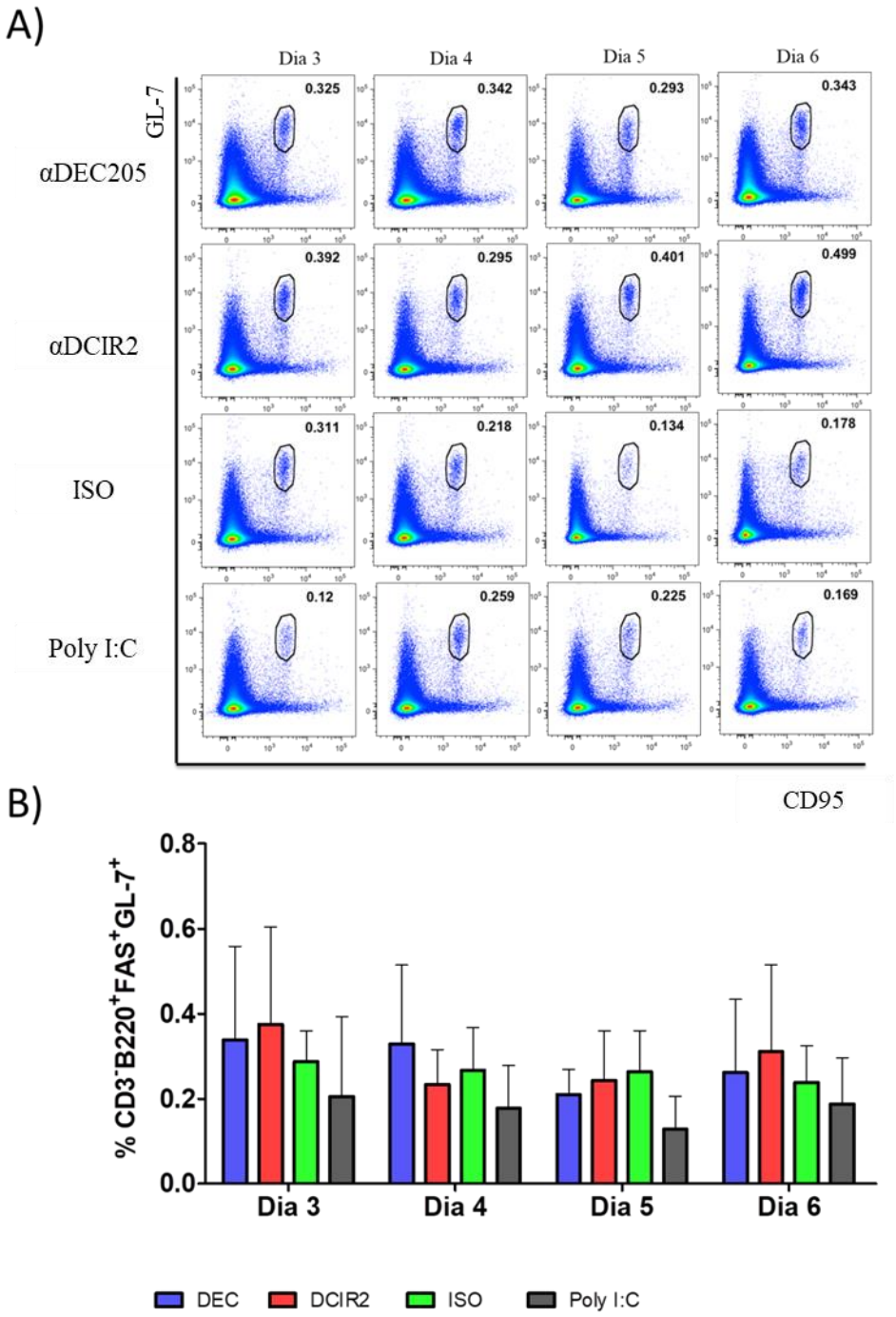


Figura 34 - Citometria de fluxo de células B do centro germinativo: Camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE em presença de Poly I:C. Quatorze dias após a primeira imunização, foi administrada uma segunda dose sem adjuvante. O baço foi retirado 3, 4, 5 e 6 dias depois e os esplenócitos foram marcados com anticorpos conjugados a fluorocromos para marcação de células do centro germinativo. (A) *Dot Plots* representativos de células do centro germinativo com *gate* em CD3$^-$B220$^+$. (B) Porcentagem de células B220$^+$GL-7$^+$CD95$^+$. Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) em que *** $p<0,001$ e * $p<0,05$. Resultado de dois experimentos independentes agrupados.

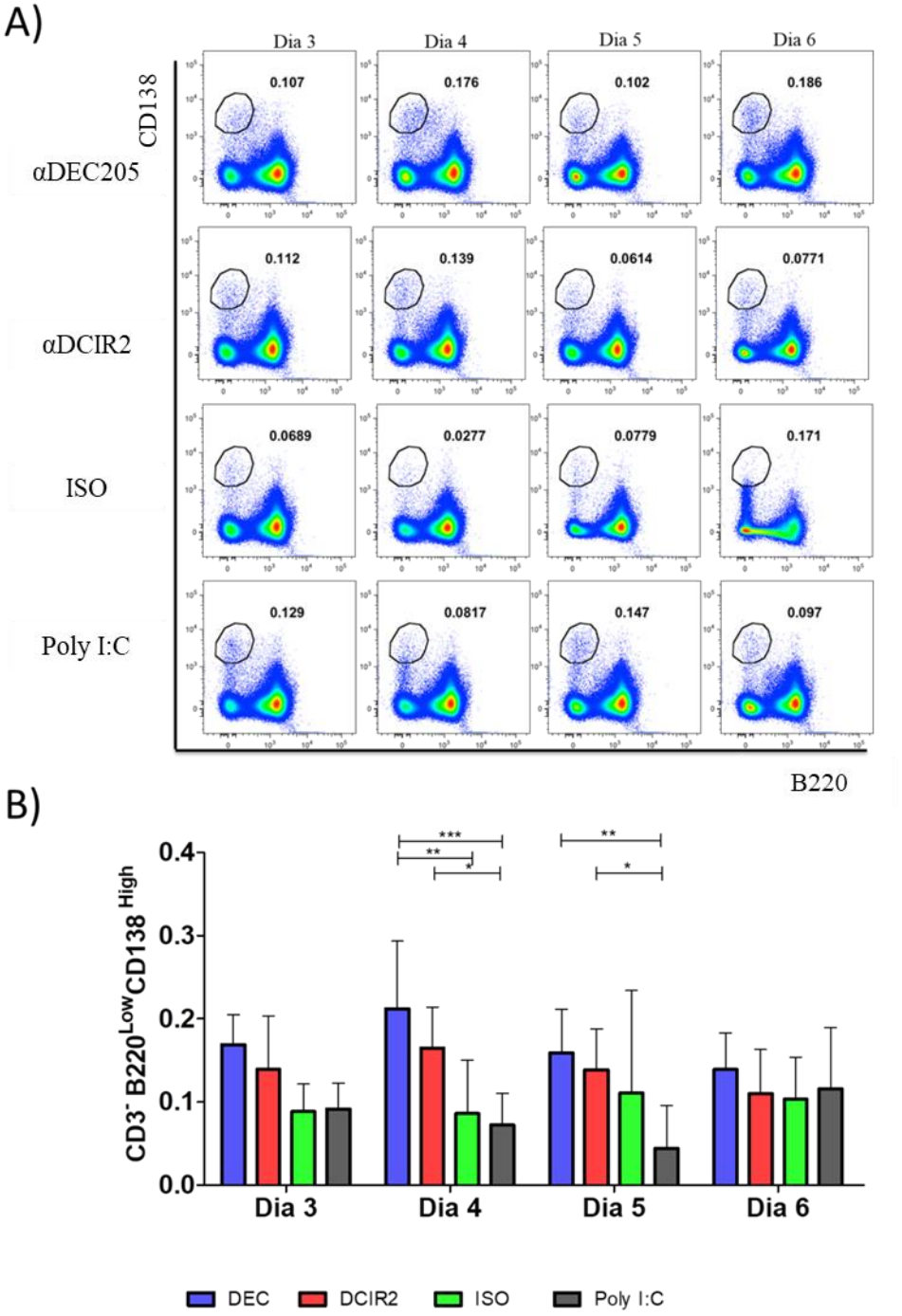


Figura 35 - Citometria de fluxo de plasmócitos: Camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE em presença de Poly I:C. Quatorze dias após a primeira imunização, foi administrada uma segunda dose sem adjuvante. O baço foi retirado 3, 4, 5 e 6 dias depois e os esplenócitos foram marcados com anticorpos conjugados a fluorocromos para marcação de plasmócitos. (A) *Dot Plots* representativos de plasmócitos com *gate* em CD3^{-}. (B) Porcentagem CD3^{-} B220^{+Low}CD138^{High}. Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) em que *** p<0,001 e * p<0,05. Resultado de dois experimentos independentes agrupados.

4.11 Determinação da produção de citocinas induzidas pelo direcionamento do antígeno para as DCs

Como não detectamos células produtores de citocinas pró-inflamatórias nem de IL-10 na resposta promovida pelo direcionamento do antígeno $MSP1_{19}$PADRE para DCs $CD8\alpha^-$, avaliamos a produção das citocinas IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17 no sobrenadante das culturas. Para isso, camundongos foram imunizados com uma doses de αDEC205-$MSP1_{19}$PADRE, αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE ou ISO-$MSP1_{19}$PADRE usando Poly I:C como adjuvante ou somente Poly IC e depois de14 dias mais uma dose dos mAbs quiméricos foi administradas, mas sem adjuvante. Depois de 14 dias da última imunização, os esplenócitos foram pulsados *in vitro* com a proteína recombinante $MSP1_{19}$PADRE e 48 ou 96 horas depois o sobrenadante foi coletado para quantificação das citocinas. Confirmando os resultados de marcação intracelular, o direcionamento do antígeno para a população de DCs $CD8\alpha^+$ via DE205 induziu o aumento das citocinas IFN-γ e IL-10 após 48 e 96 horas. O direcionamento de antígeno para as DCs $CD8\alpha^-$ e a imunização com o ISO-$MSP1_{19}$PADRE induziu aumento das citocinas IL-5 e IL-13, típicas de uma resposta Th2, mas não detectamos IL-4. Interessantemente, somente nos camundongos imunizados com αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE detectamos aumento de IL-17 (Figura 36). Assim, conclui-se que 14 dias após a administração da segunda dose dos mAbs quiméricos, o direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^+$ induz uma resposta Th1 e o direcionamento para DCs $CD8\alpha^-$ induz uma resposta mista Th2/Th17.

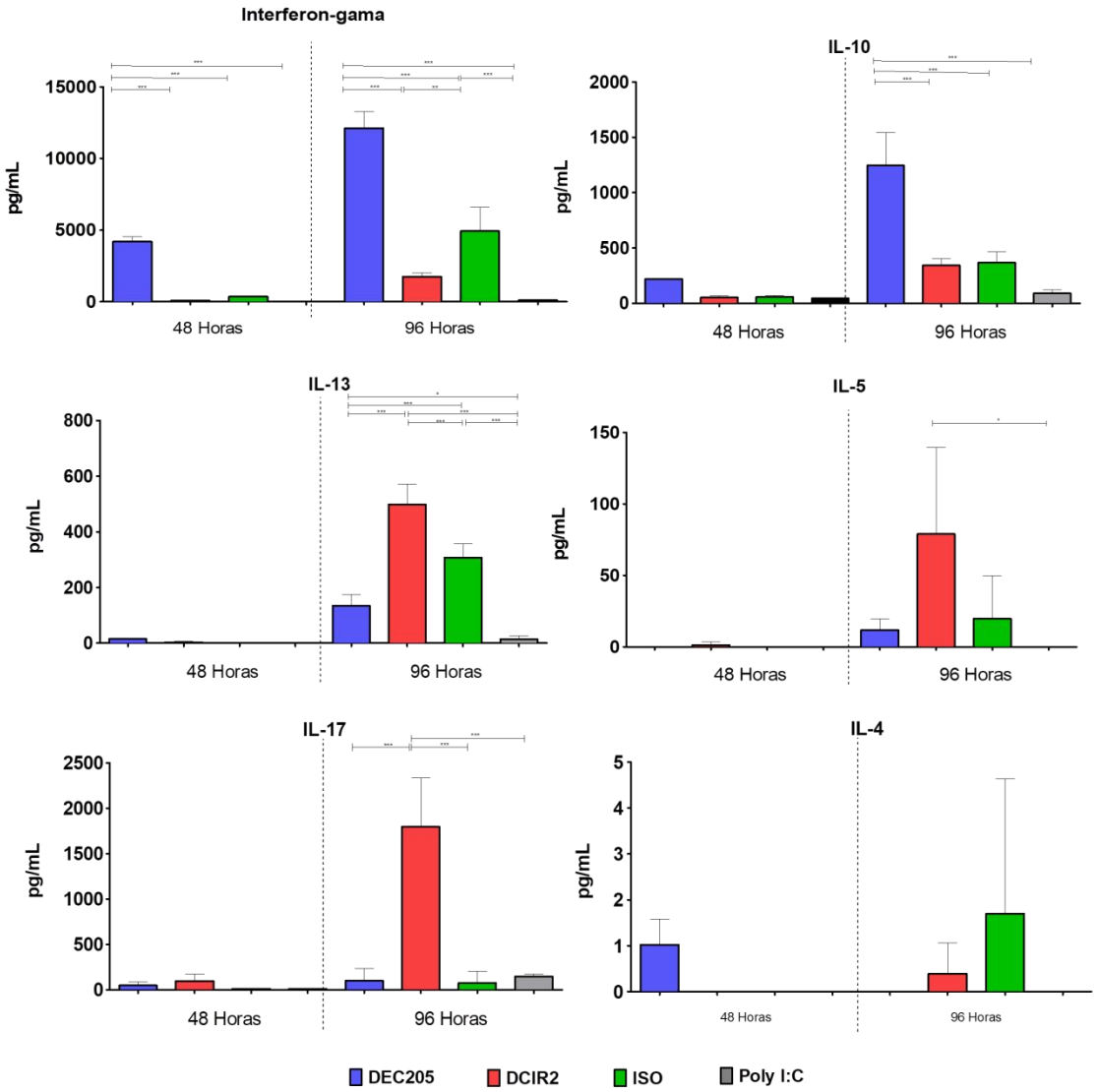


Figura 36 - Citocinas induzidas pelo direcionamento de antígenos para DCs: Camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE em presença de Poly I:C. Quatorze dias após a primeira imunização foi administrada uma segunda dose sem adjuvante. O baço foi retirado 14 dias depois e os esplenócitos foram pulsados *in vitro* com a proteína MSP1$_{19}$PADRE. Depois de 48 e 96 horas, o sobrenadante foi coletado e as citocinas quantificadas por CBA. Na análise estatística foi aplicado o teste de análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) em que *** $p<0,001$ e * $p<0,05$.

Além disso, nesse período de tempo também foi avaliada por citometria de fluxo a polarização de células T_{FH}, a formação do centro germinativo e a diferenciação de plasmócitos. Não houve aumento de células T_{FH}, células B do centro germinativo nem plasmócitos em nenhum dos grupos imunizados 14 dias após a administração da segunda dose (Figura 37). Entretanto, houve uma forte proliferação de células T CD4$^+$, bem como células T CD4$^+$ produtoras de IFN-γ, IL-2 e TNF-α nos animais imunizados com o mAb αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE (resultados não mostrados).

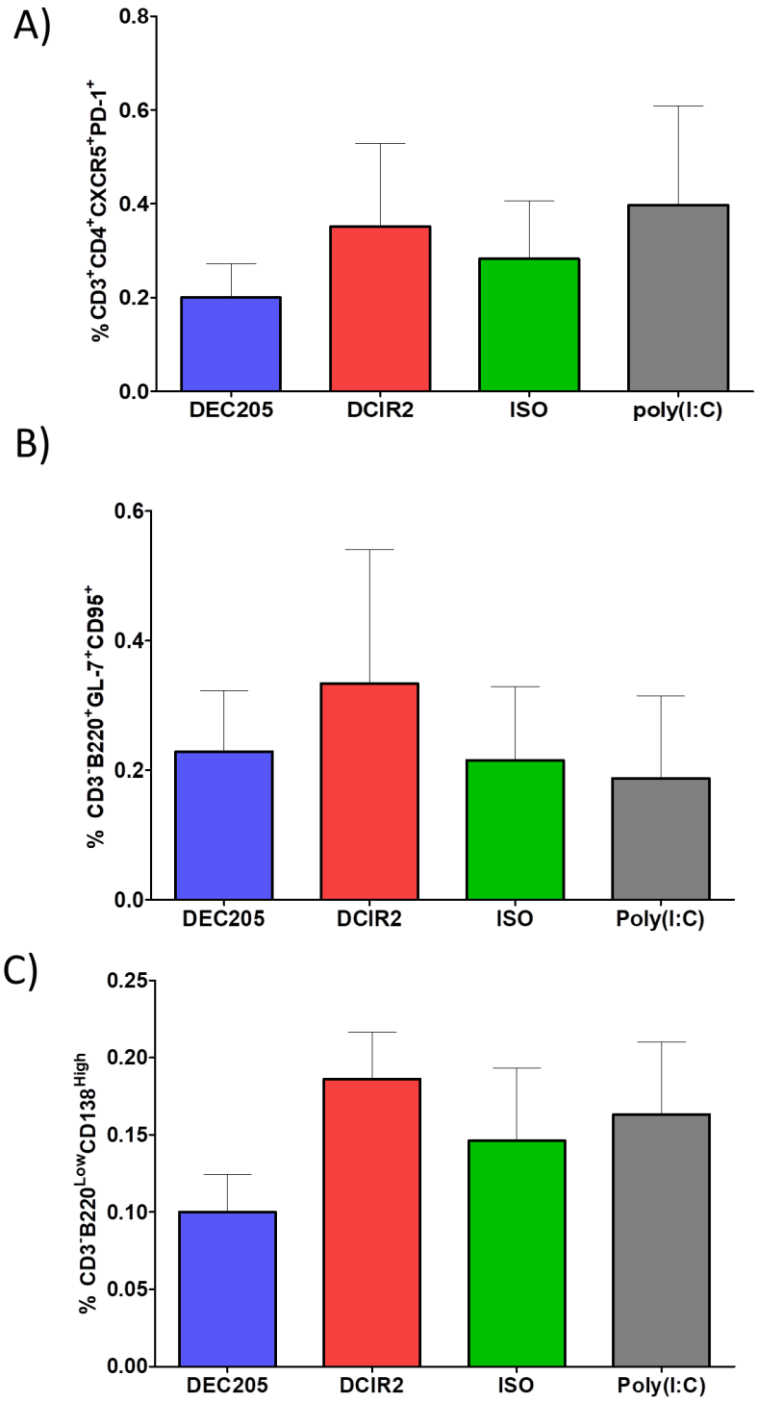


Figura 37 - Citometria de fluxo de células T_{FH}, de células B do centro germinativo e de plasmócitos: Camundongos foram imunizados com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE ou ISO-MSP1$_{19}$PADRE em presença de Poly I:C. Quatorze dias após a primeira imunização foi administrada uma segunda dose sem adjuvante. O baço foi retirado 14 dias depois e os esplenócitos marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos. (A) porcentagem de células T_{FH}, (B) de células B do centro germinativo e (C) de plasmócitos.

5 DISCUSSÃO

O direcionamento de antígenos para DCs é uma eficiente estratégia para a indução de uma resposta adaptativa baseada na biologia da própria DC (STEINMAN, 2008). Neste estudo, o antígeno $MSP1_{19}$PADRE foi direcionado para as DCs $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$ via os receptores endocíticos DEC205 e DCIR2 usando os mAbs quiméricos αDEC205 e αDCIR2. Essa estratégia foi abordada para compreender a montagem das respostas imunes induzidas pelo direcionamento de antígenos para as DCs $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$ com ênfase na capacidade que cada uma dessas células possui em induzir respostas de células T auxiliares e produção de anticorpos ao antígeno direcionado. Dessa forma, camundongos foram imunizados com αDEC205-$MSP1_{19}$PADRE, αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE ou ISO-$MSP1_{19}$PADRE em presença do Poly I:C como adjuvante e a montagem da resposta imune foi analisada 3, 4, 5 e 6 dias após a primeira e a segunda doses de imunização.

Primeiramente, os mAbs quiméricos com o antígeno $MSP1_{19}$PADRE fusionados na cadeia pesada foram produzidos eficientemente e mantiveram a capacidade de ligação especificamente em seu receptor. O antígeno quimérico $MSP1_{19}$PADRE foi desenvolvido para aumentar a antigenicidade da fração $MSP1_{19}$. Os resultados mostraram novamente que a $MSP1_{19}$ é um forte alvo da resposta humoral e o epítopo PADRE é capaz de induzir uma robusta resposta celular, corroborando experimentos prévios do nosso laboratório (resultados não publicados) e Rosa e colaboradores (2004). É possível afirmar que o direcionamento do antígeno $MSP1_{19}$PADRE para DCs $CD8\alpha^+$ induz uma robusta resposta celular Th1 específica ao PADRE logo após a primeira dose da imunização. Por outro lado, o direcionamento para DCs $CD8\alpha^-$ promove uma forte resposta humoral com anticorpos anti-$MSP1_{19}$ e a instrução de células T_{FH} também após a administração da primeira dose dos mAbs.

Em nosso protocolo de imunização foi utilizado o Poly I:C como adjuvante por já ser descrito como um dos adjuvantes mais eficientes no direcionamento de antígenos para DCs (TRUMPFHELLER et al., 2008). O aumento da expressão das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40 nas DCs $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$, bem como o aumento sérico das citocinas TNF-α e IL-6 nos camundongos imunizados foram induzidos pela presença do Poly I:C como adjuvante. A imunização com os mAbs quiméricos αDEC205-$MSP1_{19}$PADRE, αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE ou ISO-$MSP1_{19}$PADRE não influencia a maturação das DCs. Entretanto, os camundongos que receberam αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE tiveram um aumento da concentração sérica de IL-6.

Os resultados da resposta imune inicial induzida pelo direcionamento de antígenos para DC revelam que a imunização com αDEC205-MSP1_{19}PADRE e αDCIR2-MSP1_{19}PADRE promove a montagem de respostas imunes distintas. O direcionamento de antígenos para DCs CD8α^+ via DEC205 induziu uma forte resposta celular com células T CD4$^+$ produtoras de IL-2, TNF-α e IFN-γ, uma resposta inflamatória Th1. Por outro lado, o direcionamento de antígenos para DCs CD8α^- via DCIR2 promoveu uma forte resposta humoral, com altos títulos de anticorpos anti-MSP1_{19}, bem como a instrução de células T_{FH}, formação de centro germinativo e diferenciação de plasmócitos. Dessa forma, pode-se concluir que as DCs CD8α^+ são especializadas na instrução de resposta Th1 enquanto as DCs CD8α^- são especializadas na polarização de células T CD4$^+$ para um perfil de T_{FH}.

Contudo, nossos resultados mostraram que as DCs CD8α^+ expressam maiores quantidades de CD80 e CD40 quando camundongos são imunizados na presença de Poly I:C. Sabe-se que essas células privilegiam a via de sinalização canônica de NF-κB via fosforilação de proteínas MAPKinases como a JNK que estão principalmente associadas com o aumento de CD80 e CD40 (SHIN et al., 2015). Além disso, as DCs CD8α^+ são consideradas DCs especializadas na instrução da polarização de células T CD4$^+$ para um perfil Th1 por mecanismos dependentes de CD70 que é expresso somente nessas DCs e é considerado um "marcador de polarização Th1" por DCs CD8α^+ (SOARES et al., 2007). Ainda, as DCs CD8α^+ localizam-se estrategicamente na zona de células T onde podem interagir com pDCs que produzem IFN do tipo I amplificando sua ativação e aumentando ainda mais a expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 (BREWITZ et al., 2017; DUDZIAK et al., 2007).

Em relação às DCs CD8α^-, o direcionamento do antígeno MSP1_{19}PADRE induziu o aumento de células T_{FH} CXCR5^{High}PD-1^{High} que são exatamente as células que estão localizadas no interior dos CGs (SHULMAN et al., 2013). As DCs CD8α^- têm sido consideradas especializadas na instrução de células $T_{FH.}$ Acredita-se que a biologia dessas DC possua particularidades e especializações que resultem na instrução da resposta de células T CD4$^+$ para a polarização de células T_{FH}. Essas células estão localizadas anatomicamente próximas na zona marginal às células B, onde há a migração de células T CD4$^+$ ativadas dependente de EBI2 (LI et al., 2016; SHIN et al., 2016). Há fortes indícios que o subtipo de DCs CD8α^- secreta uma forma solúvel de CD25 que sequestra IL-2 no microambiente, uma citocina que reduz a diferenciação de T_{FH} pois estimula a fosforilação de STAT5 (LI et al., 2016). Associado a isso, esse subtipo de DCs ainda apresenta maior expressão de OX40L pela via não canônica de NF-κB, sendo que seu ligante OX40 na célula T sinaliza via STAT3

(SHIN et al., 2015). Assim, a diminuição da fosforilação de STAT5 com o aumento da fosforilação de STAT3 promove a diminuição da expressão de Blimp-1 (fator de transcrição que reduz a diferenciação de T_{FH}) e o consequente aumento de Bcl-6 e, portanto, a instrução de T_{FH} (BALLESTEROS-TATO ;RANDALL, 2014).

Em contrapartida, há dados que mostram que para as células T $CD4^+$ terminarem seu processo de diferenciação em T_{FH} maduras elas precisam interagir com células B (GOENKA et al., 2011). No direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^-$ via DCIR2 há um acúmulo de antígenos na região marginal a zona de células B, fazendo com elas entram em contato com o antígeno e possam interagir com as células T_{FH} promovendo sua diferenciação final e a formação de CG (CHAPPELL et al., 2012). Além disso, a cinética de internalização do receptor DCIR2 é mais lenta em comparação com a do receptor DEC205 (DUDZIAK et al., 2007). Isso pode aumentar a disponibilidade de antígeno para as células B. A imunização com αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE induziu a formação de centro germinativo e a diferenciação de plasmócitos, bem como altos títulos de anticorpos específicos a $MSP1_{19}$ após a primeira dose do mAb quimérico. Nossos resultados mostram que essa resposta humoral é dependente de células T $CD4^+$, possivelmente T_{FH} e, dessa forma, não é induzida somente pelo acúmulo de antígeno na região marginal e ativação somente de células B.

Os CGs, bem como as células T_{FH}, promovem a reação do CG que visa induzir a formação e a seleção de clones de células B com alta afinidade ao antígeno para a produção de anticorpos de alta avidez (ALLEN;OKADA ;CYSTER, 2007). No 5° dia após o direcionamento do antígeno para DCs $CD8\alpha^-$ houve o aumento de células B do centro germinativo corroborando os resultados de Shin e colaboradores (2015). Entretanto, no sexto dia essas células já não estão em maior número. Possivelmente houve uma forte expansão clonal (clamada de “explosão clonal”) entre o terceiro e o quarto dia depois da imunização e consecutivamente a seleção dos clones de maior afinidade e a mudança de classe (MESIN;ERSCHING ;VICTORA, 2016). Nossos resultados mostram a produção, possivelmente por plasmócitos, de anticorpos específicos de diferentes subclasses de IgG indicando que está ocorrendo a mudança de classe.

A segunda dose da imunização parece ser responsável pela promoção da resposta humoral no direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^+$ via DEC205. Os títulos de anticorpos séricos anti-$MSP1_{19}$ começam a aumentar após o segundo contato com o antígeno. Principalmente no terceiro dia após a imunização foram identificadas duas populações de células T_{FH}, uma população com um perfil de expressão intermediário ($CXCR5^{Inter}PD\text{-}1^{Inter}$) dos marcadores CXCR5 e PD-1 e outra com expressão alta dessas mesmas moléculas

($CXCR5^{High}PD\text{-}1^{High}$). A população de células $CXCR5^{Inter}PD\text{-}1^{Inter}$ é considerada como células pré-T_{FH} instruídas pelo contato com uma DC. Essas células diferenciam-se para T_{FH} madura ($CXCR5^{High}PD\text{-}1^{High}$) quando interagem com uma célula B (SUH, 2015). Apesar de não haver nenhum indício que o subtipo de DC $CD8\alpha^+$ ser especializado na instrução dessas células, nossos resultados mostram a presença dessas células no baço dos animais imunizados. Acredita-se que o segundo contato estimule a diferenciação dessas células devido a um contato mais prolongado com o antígeno que induz a diferenciação de T_{FH} (DEENICK et al., 2010). O direcionamento de antígenos para DC $CD8\alpha^+$ via Clec9a também induz a instrução de células T_{FH} (LAHOUD et al., 2011).

Além disso, sabe-se que células B do CG expressam o receptor endocítico DEC205, pois a citometria de fluxo dessas células confirma a expressão desse marcador em células $B220^+GL\text{-}7^+CD95^+$ (resultados não mostrados) (VICTORA et al., 2010). Possivelmente, essas células participem da indução da resposta humoral no direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^+$. Dessa forma, na segunda dose da imunização, o mAb αDEC205 direciona antígenos também para a população $B220^+GL\text{-}7^+CD95^+DEC205^+$ (VICTORA et al., 2010). Sabe-se que após o direcionamento de antígenos para células B do CG via DEC205, essas células proliferam com maior intensidade induzindo a explosão clonal do CG. Entretanto, essa explosão clonal ocorre 36 horas após a administração do αDEC205, depois dessas 36 horas, as células B do CGs interagem com células T_{FH} e sendo assim selecionadas, diminuindo sua frequência (KALAITZIDIS et al., 2017). Provavelmente não detectamos a formação de CG, pois analisamos a presença dessas células 72 horas após a imunização. Novos experimentos serão realizados para confirmar esses achados em 36 horas após a segunda dose. Além disso, foi possível verificar a presença de plasmócitos e a mudança de classe de anticorpos IgG depois da segunda dose de αDEC205-$MSP1_{19}$PADRE que pode estar acontecendo devido a reação do CG.

Já na imunização com αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE, os resultados demonstram que não houve aumento das populações de células T_{FH} e células B do CG depois da segunda imunização. Acreditamos que a primeira dose da imunização já foi capaz de induzir um número otimizado de células T_{FH} e células B para promoção da resposta humoral. Após a primeira dose, os títulos séricos de anticorpos IgG anti-$MSP1_{19}$ já estavam bastante elevados (DEENICK et al., 2010). Contudo, na segunda imunização foi possível observar que ainda está ocorrendo a mudança de classe, pois a razão entre IgG1 e IgG2c foi diminuindo nos dias 3, 4, 5 e 6 após da segunda dose.

A resposta celular de células T $CD4^+$ inflamatórias ($IFN\text{-}\gamma^+IL\text{-}2^+TNF\text{-}\alpha^+$) foi amplificada com a segunda dose da imunização no direcionamento do antígeno $MSP1_{19}$PADRE para DCs $CD8\alpha^+$. Nossos resultados estão de acordo com vários estudos que mostram que direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^+$ sistematicamente induz células T $CD4^+$ produtoras de IFN-γ na presença de um adjuvante (AMORIM;RAMPAZO; et al., 2016; BONIFAZ et al., 2004; HENRIQUES et al., 2013; RAMPAZO et al., 2015; TRUMPFHELLER et al., 2008). Supreendentemente foram detectadas células T $CD4^+$ produtoras de IL-10 que não secretam IFN-γ, IL-2 e $TNF\text{-}\alpha^+$, sendo outra subpopulação de células T $CD4^+$ (JANKOVIC;KUGLER ;SHER, 2010). Possivelmente, essas células podem ser células T reguladoras que são instruídas para evitar o excesso de resposta inflamatória. Porém, novos experimentos serão realizados para melhor caracterização dessas células.

Como no direcionamento do antígeno $MSP1_{19}$PADRE para DCs $CD8\alpha^-$ não detectamos citocinas pró-inflamatórias, IL-10 nem IL-17 por ICS, avaliamos 14 dias após a segunda dose a produção de citocinas por CBA no sobrenadante das culturas de células de camundongos. Nos animais imunizados com αDEC205-$MSP1_{19}$PADRE confirmamos os resultados do ICS. Entretanto, detectamos IL-5, IL-13 e IL-17 nos camundongos imunizados com αDCIR2-$MSP1_{19}$PADRE. Assim, a reposta celular ao direcionamento para DCs $CD8\alpha^-$ via DCIR2 após a segunda dose da imunização é induzida para um perfil misto Th2/Th17. Portanto, as DCs $CD8\alpha^-$ também podem induzir respostas T Th2/Th17, podendo ser especializadas na instrução dessas células (SCHLITZER et al., 2013).

Finalmente, a promoção e a própria resposta imune induzida pelo direcionamento de antígenos para DCs $CD8\alpha^+$ e $CD8\alpha^-$ via os receptores endocíticos DEC205 e DCIR2 são diferentes. Acredita-se que essas respostas são montadas de forma dependente da própria biologia de cada subtipo de DC, bem como de sua localização anatômica. Entretanto, pouco se sabe sobre as diferenças biológicas entre esses dois subtipos de DC que levam na indução de diferentes respostas. Novas pesquisas são necessárias para elucidar a influência da biologia de diferentes populações de DCs na promoção de respostas adaptativas.

6 CONCLUSÃO

Com esses resultados podemos concluir que o direcionamento de antígenos para DCs não altera o perfil de ativação dessas células comparando as diferentes imunizações. O aumento da expressão de CD80, CD86 e CD40 ocorre por efeito do adjuvante. Contudo, observa-se que as DCs CD8α$^+$ apresentam uma maior expressão de CD80 e CD40 comparadas com as DCs CD8α$^-$. Além disso, os níveis séricos de TNF-α também se mantem semelhantes nas imunizações com αDEC205-MSP1$_{19}$PADRE, αDCIR2-MSP1$_{19}$PADRE, ISO-MSP1$_{19}$PADRE ou somente Poly I:C. Entretanto, há um aumento sistêmico de IL-6 quando o antígeno é direcionado via DCIR2. Assim, pode-se inferir que há diferenças na biologia das DCs CD8α$^+$ e CD8α$^-$, pois elas se ativam de formas diferentes na presença do mesmo estímulo.

Com todos os nossos resultados que analisaram a resposta após a administração da primeira dose, podemos afirmar que o direcionamento de antígenos para a população de DCs CD8α$^-$ induz uma robusta resposta humoral com altos títulos de anticorpos séricos. O direcionamento de antígenos utilizando αDCIR2 aumenta o número de células T$_{FH}$, de células B do CG e de plasmócitos. Isso sugere que as DC CD8α$^-$ são especializadas na instrução de células T$_{FH}$. Ainda, mostramos que essa resposta é dependente de células T auxiliares, não sendo uma ativação somente das células B da região marginal. Em contrapartida, o direcionamento para a população de DCs CD8α$^+$ induziu um maior número de células produtoras de IFN-γ e células T CD4$^+$ polifuncionais, indicando que essas células são especializadas da instrução de resposta celular do tipo Th1.

Depois da administração da segunda dose dos mAbs quiméricos, a resposta ao direcionamento do antígeno para as DCs CD8α$^-$ apresentou altos títulos de anticorpos específicos contra a proteína MSP1$_{19}$ e uma queda na razão IgG1/IgG2c com o passar do tempo, indicando que após a segunda dose ainda há mudança de classe. Entretanto, não houve aumento na frequência de células T$_{FH}$ e de células B do centro germinativo, mas houve aumento de plasmócitos e a instrução de uma resposta T auxiliar com um perfil misto Th2/Th17. Já no direcionamento do antígeno para as DCs CD8α$^+$ houve um aumento progressivo da resposta de células Th1 (células produtoras de IFN-γ, IL-2 e TNF-α) e de outras células T auxiliares que produzem IL-10. Além disso, os títulos de anticorpos contra a proteína MSP1$_{19}$ aumentaram depois da segunda dose e ocorreu mudança de classe de IgG. No segundo contato com o antígeno, houve um aumento de duas populações de células T$_{FH}$

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

Esses resultados contribuem para a elucidação dos mecanismos de indução de resposta imune nos protocolos que utilizam o direcionamento de antígenos como uma ferramenta de imunização para a indução de uma resposta imune adaptativa duradoura. Além disso, esses achados contribuem para o desenvolvimento de vacinas contra diversos patógenos, pois elucidamos as respostas induzidas pelas imunizações com αDEC205 e αDCIR2. Dessa forma, é possível otimizar a escolha da estratégia de imunização dependendo da resposta que melhor convém para a vacina. Também geramos dados que confirmam as especializações das DCs $CD8\alpha^{+}$ e $CD8\alpha^{-}$ em induzir a polarização de resposta T $CD4^{+}$ revelando diferenças na biologia das DCs $CD8\alpha^{+}$ e $CD8\alpha^{-}$.

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* De acordo com:

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

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

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

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

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

BONIFAZ, L. et al. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. **J Exp Med,**v. 196, n. 12, p. 1627-1638 2002.

BONIFAZ, L. C. et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. **J Exp Med,**v. 199, n. 6, p. 815-824 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HENRIQUES, H. R. et al. Targeting the non-structural protein 1 from dengue virus to a dendritic cell population confers protective immunity to lethal virus challenge. **PLoS Negl Trop Dis,**v. 7, n. 7, p. e2330 2013.

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

IDOYAGA, J. et al. Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. **Proc Natl Acad Sci U S A,**v. 108, n. 6, p. 2384-2389 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LAHOUD, M. H. et al. Targeting antigen to mouse dendritic cells via Clec9A induces potent CD4 T cell responses biased toward a follicular helper phenotype. **J Immunol,**v. 187, n. 2, p. 842-850 2011.

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

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

LONGHI, M. P. et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. **J Exp Med,**v. 206, n. 7, p. 1589-1602 2009.

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

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

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

MAHNKE, K. et al. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. **J Cell Biol,**v. 151, n. 3, p. 673-684 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TEWARI, K. et al. Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4+ T cell responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein (CSP) and alphaDEC-CSP in non human primates. **Vaccine,**v. 28, n. 45, p. 7256-7266 2010.

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

TRUMPFHELLER, C. et al. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. **Proc Natl Acad Sci U S A,**v. 105, n. 7, p. 2574-2579 2008.

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

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

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

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

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

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

WILSON, D. W. et al. Quantifying the importance of MSP1-19 as a target of growth-inhibitory and protective antibodies against Plasmodium falciparum in humans. **PLoS One,**v. 6, n. 11, p. e27705 2011.

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

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

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

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