

# AVALIAÇÃO DA AVIDEZ DE ANTICORPOS INDUZIDOS POR IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM FORMULAÇÕES BASEADAS EM ANTÍGENOS DE *Plasmodium vivax*

**Camila Verholeak Maffetano**

**Dra. Laura Cristina Lima Diniz**

**Profa. Dra. Irene da Silva Soares**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

camilavka@usp.br; isoares@usp.br; laura\_lima@usp.br

## Objetivos

Com os indícios de mortalidade em decorrência de infecções por *Plasmodium vivax* (WHO, 2012; RAHIMI, et al., 2014) e a sua complexidade de invasão celular, formulações vacinais contendo mais de um antígeno de diferentes estágios de infecção vêm sendo estudadas (LIMA et al., 2020; LAURENS, 2018). Verificou-se que estudos anteriores caracterizaram a importância de proteínas como Proteína 1 de Superfície do Merozoíta, porção final de 19KDa (PvMSP1<sub>19</sub>) e Proteína Circunsporozoíta de *P. vivax* (PvCSP) como antígenos imunodominantes (LIMA et al., 2020; DOBRESCU et al., 2020). Para avaliar a efetividade vacinal de uma nova formulação, testes específicos são necessários, tais como a avidéz dos anticorpos frente aos seus antígenos. A partir disso, esse trabalho envolve a detecção de anticorpos IgG, assim como a avidéz destes anticorpos, a partir de soros de camundongos C57BL/6 imunizados com uma nova proteína quimérica recombinante envolvendo antígenos de dois estágios de vida do parasito *P. vivax* (yPvCSP-MSP1<sub>19</sub>) expressa por *Pichia pastoris*.

## Métodos e Procedimentos

Os soros utilizados nos experimentos são provenientes do projeto previamente aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais

da FCF/USP (CEUA/FCF 054.2021 – CEUA P614).

Para avaliação da magnitude dos anticorpos induzidos pelos protocolos de imunização, os soros dos camundongos coletados 21 dias após a terceira dose tiveram os títulos dos anticorpos detectados por ELISA. Nesse procedimento, os soros foram testados em diluições seriadas, a partir da diluição de 1:100, em placas de 96 poços sensibilizadas previamente com 200 ng das proteínas (DE CAMARGO et al., 2018). As variantes individuais de PvCSP e a proteína PvMSP1<sub>19</sub> foram obtidas por expressão em sistema bacteriano utilizando *Escherichia coli* (GIMENEZ et al., 2017). Os títulos específicos são definidos como a maior diluição com uma DO<sub>492</sub> superior a 0,1, determinada em um leitor de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA).

Para determinar a avidéz dos anticorpos IgG induzidos pelas imunizações experimentais, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 200 ng de cada uma das proteínas recombinantes em tampão carbonato. Cada placa teste recebeu uma placa espelho, a qual foi submetida a tratamento desnaturante com solução de uréia 6M em PBS-T durante 5 minutos. A leitura das placas foi realizada em um leitor de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA) e a porcentagem de avidéz foi definida como (D.O.<sub>492/630</sub> com tratamento) / (D.O.<sub>492/630</sub> sem tratamento) x 100% (DOBRESCU et al., 2020).

## Resultados

Analisando os títulos totais de anticorpos IgG anti-yPvCSP e anti-bPvMSP1<sub>19</sub> obtidos pela imunização em regime *prime-boost* homólogo, contra a proteína bPvMSP1<sub>19</sub> a formulação contendo a proteína quimérica (yPvCSP-MSP1<sub>19</sub>) foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos IgG, mas esses títulos foram menores do que os anticorpos produzidos pelas formulações que contém a proteína individual bPvMSP1<sub>19</sub> ou as proteínas yPvCSP e bPvMSP1<sub>19</sub> em combinação. Contra a proteína yPvCSP, a proteína quimérica foi capaz de induzir títulos ainda maiores de anticorpos IgG, não ocorrendo diferenças significativas dos anticorpos induzidos pelas diferentes formulações. Já quanto aos títulos de anticorpos IgG contra as variantes alélicas da proteína PvCSP, percebe-se que as porções C-terminal e PvCSP-*P. vivax-like* foram as mais reconhecidas, enquanto que variantes PvCSP-VK210 e PvCSP-VK247 foram menos reconhecidas.

Em regime *prime-boost* heterólogo, os títulos totais de anticorpos anti-yPvCSP e anti-bPvMSP1<sub>19</sub> frente às proteínas PvMSP1<sub>19</sub> e PvCSP foram maiores para a proteína quimérica em sistema P/P/Ad e menores para a proteína quimérica em sistema Ad/Ad/P, em comparação com os outros grupos. Quando analisadas as variantes da proteína PvCSP, novamente as porções C-terminal e PvCSP-*P. vivax-like* foram as mais reconhecidas e o sistema de formulação P/P/Ad utilizando a proteína quimérica foi a que mais induziu anticorpos.

A determinação da avidéz dos anticorpos induzidos por imunização em regime *prime-boost* homólogo resultou em uma porcentagem de avidéz em torno de 70% para a maioria dos grupos avaliados. Frente às proteínas PvMSP1<sub>19</sub>, PvCSP-VK210 e PvCSP-*P. vivax-like*, os anticorpos induzidos pela proteína quimérica apresentaram uma avidéz menor em comparação com os induzidos pelas proteínas em combinação. No regime *prime-boost* heterólogo, a avidéz foi em torno de 80%, superior à encontrada no regime *prime-boost* homólogo, sendo a avidéz da proteína quimérica do sistema P/P/Ad superior à da proteína quimérica do sistema Ad/Ad/P.

## Conclusões

A partir dos títulos de anticorpos IgG e valores de avidéz obtidos, percebe-se que a proteína quimérica yPvCSP-MSP1<sub>19</sub> apresenta favorável capacidade imunogênica, sendo de suma importância a continuação de estudos baseados em imunizações em regime *prime-boost* homólogo e heterólogo para aplicação de uma possível futura vacina.

## Referências Bibliográficas

- DE CAMARGO, T. M. et al. Prime-boost vaccination with recombinant protein and adenovirus vector expressing Plasmodium vivax circumsporozoite protein (CSP) partially protects mice against Pb/Pv sporozoite challenge. *Scientific Reports*, 8, n. 1, p. 1118, 2018.
- DOBRESCU, I. et al. Protective Immunity in Mice Immunized with P. vivax MSP119-Based Formulations and Challenged with P. berghei Expressing PvMSP119. *Frontiers in immunology*, v. 11, n. 28, 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.00028
- GIMENEZ, A. M. et al. Vaccine Containing the Three Allelic Variants of the Plasmodium vivax Circumsporozoite Antigen Induces Protection in Mice after Challenge with a Transgenic Rodent Malaria Parasite. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. 1275, 11 out. 2017.
- LAURENS, M. B. The Promise of a Malaria Vaccine—Are We Closer? *Annual Review of Microbiology*, v. 72, n. 1, p. 273–292, 8 set. 2018.
- LIMA, L. C. et al. A Multistage Formulation Based on Full-Length CSP and AMA-1 Ectodomain of Plasmodium vivax Induces High Antibody Titers and T-cells and Partially Protects Mice Challenged with a Transgenic Plasmodium berghei Parasite. *Microorganisms*, v. 8, n. 6, p. 916, 17 jun. 2020.
- RAHIMI, B. et al. Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. *Malaria Journal*, v. 13, n. 1, p. 481, 8 dez. 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Management of severe and complicated malaria : a practical handbook. Geneva: World Health Organization, 2012.