

Avaliação do perfil de isotipos de IgGs induzidos por imunização de camundongos com formulações baseadas em multiantígenos de *Plasmodium vivax*

Nathalia Tiemi Taguchi

Dr^a. Laura Cristina Lima Diniz

Prof^a. Dr^a. Irene Soares

Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Universidade de São Paulo

nath.taguchi@usp.br

Objetivos

A malária é uma doença que ameaça a saúde pública em escala global, sendo que o Brasil, mais especificamente na região Amazônica, é fortemente afetado (MEIRELES *et al.*, 2020). De acordo com o Ministério da Saúde (2020), 89,3% dos casos registrados de malária no país são causados pelo *Plasmodium vivax*, portanto, é relevante buscar o desenvolvimento de uma vacina contra essa espécie de parasita. Assim, o presente estudo avalia uma nova formulação que contém uma proteína quimérica (yPvCSP-MSP1₁₉) composta por antígenos de dois estágios diferentes do ciclo de vida do parasita, a Proteína 1 de Superfície do Merozoíto, porção final de 19kDa (MSP1₁₉) e a Proteína Circunsporozoíta (CSP). Para atingir tal objetivo, a magnitude e subclasses de IgGs induzida pela imunização com a proteína multi antigênica, na presença do adjuvante Poly(I:C), foram avaliadas.

Métodos e Procedimentos

A proteína bPvMSP1₁₉ foi expressa em *Escherichia coli* BL21 e purificada utilizando duas etapas de cromatografia (afinidade e de troca iônica) conforme descrito anteriormente (ROCHA *et al.*, 2017). As demais proteínas já estavam disponíveis para este estudo. As determinações de IgG total e subclasses de IgG foram realizadas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), 21 dias após a administração da terceira dose das

formulações. Os títulos de anticorpos contra cada uma das proteínas foram avaliados e expressos como média aritmética dos grupos experimentais em $\log_{10} \pm \text{SEM}$. A análise estatística foi realizada através do software (*GraphPad Prism 8*) utilizando o parâmetro *One-Way ANOVA* seguido por Tukey test para múltiplos eventos (DE CAMARGO *et al.*, 2018). Todos os soros avaliados são provenientes de experimentos realizados em um projeto previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP) (CEUA/FCF 054.2021 - CEUA P614)

Resultados

A proteína bPvMSP1₁₉ foi expressa de forma satisfatória onde foi obtida uma concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$. Durante esse período, foi possível analisar dois experimentos realizados em camundongos C57BL/6, sendo o primeiro, a imunização utilizando protocolo *prime-boost* homólogo e o segundo, *prime-boost* heterólogo.

Na etapa de imunização homóloga, a análise dos anticorpos anti-bPvMSP1₁₉ demonstrou que o grupo imunizado com a formulação contendo as 2 proteínas co-administradas (yPvCSP + bPvMSP1₁₉) induziu títulos de anticorpos significativamente maiores quando comparados aos induzidos pelas imunizações com as formulações contendo a proteína quimérica (yPvCSP-MSP1₁₉) e a proteína bPvMSP1₁₉ ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$

respectivamente). Já a análise dos títulos de anticorpos totais anti-yPvCSP não revelou diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

Para os títulos de subclasses de anticorpos IgG contra bPvMSP1₁₉, o grupo imunizado com a formulação composta pela proteína quimérica apresentou níveis de anticorpos IgG1 significativamente maiores em comparação aos títulos de IgG2b, IgG2c e IgG3 ($p < 0,01$, $p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Já os grupos imunizados com a proteína bPvMSP1₁₉ e as 2 proteínas co-administradas apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as subclasses IgG1 e IgG3 ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente).

Em relação aos títulos de subclasses de IgGs anti-yPvCSP, todas as formulações (proteína quimérica, proteína yPvCSP isolada e proteínas yPvCSP + bPvMSP1₁₉, co-administradas) apresentam valores de IgG1 significativamente maiores do que as outras subclasses ($p < 0,0001$), enquanto as outras subclasses não apresentaram significância estatística entre si ($p > 0,05$).

Por outro lado, no protocolo heterólogo, os camundongos imunizados com P/P/Ad contendo a proteína quimérica induziram os maiores títulos de anticorpos IgG anti-bPvMSP1₁₉ e anti-yPvCSP ($\log_{10} = 4$).

Os títulos de anticorpos anti-bPvMSP1₁₉ e anti-yPvCSP foram próximos de $\log_{10} = 3$ quando os animais foram imunizados em protocolo Ad/Ad/P contendo as proteínas yPvCSP e bPvMSP1₁₉, individualmente, ou as 2 proteínas co-administradas, e a proteína quimérica.

Dentre os títulos de subclasses de anticorpos IgG anti-bPvMSP1₁₉ induzidos através do protocolo P/P/Ad, a formulação contendo a proteína quimérica foi capaz de induzir títulos de anticorpos significativamente diferentes entre os valores de IgG1 e IgG2b (valores aproximados de $\log_{10}=5$ e $\log_{10}=3$ respectivamente, $p < 0,001$). Já o grupo imunizado em protocolo Ad/Ad/P foi capaz de induzir títulos de anticorpo IgG1 significativamente maiores do que os títulos de IgG2c (valores aproximados de $\log_{10}=4$ e $\log_{10}=2$ respectivamente, $p < 0,01$). Não houveram outras diferenças significativas entre IgG1 e IgG2b ou IgG2c dentre os outros grupos ($p > 0,05$).

Da mesma forma ao protocolo homólogo, os títulos de subclasses de IgGs anti-yPvCSP, induzidos por todas as formulações foram capazes de induzir valores de IgG1 significativamente maiores do que as outras subclasses ($p < 0,0001$). A presença de títulos mais altos da subclasse IgG1 em relação à IgG2c encontrada na maioria dos grupos ($\text{IgG1/IgG2c} > 1$) indica uma polarização da resposta imune para um padrão de resposta Th2.

Conclusões

Por meio das análises de títulos de IgG totais e subclasses, foi possível observar que as formulações contendo as proteínas individuais co-administradas e as que contêm a proteína quimérica foram capazes de induzir títulos satisfatórios de anticorpos. O protocolo homólogo de imunização induziu maiores títulos em comparação ao protocolo heterólogo. E foi possível observar que o padrão de resposta induzido pela maioria dos grupos é polarizado para uma resposta imunológica tipo Th2. As análises sugerem que a proteína quimérica pode ser promissora para o desenvolvimento de vacina contra malária.

Suporte financeiro: FAPESP (2012/13032-5, 2022/04180-2), CNPq.

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.
- MEIRELES, B. M. *et al.* Factors associated with malaria in indigenous populations: A retrospective study from 2007 to 2016. *PLOS ONE*, v. 15, n. 10, p. e0240741, 21 out. 2020.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico - Malária. Brasil. 2020.
- ROCHA, M. V. *et al.* Generation, characterization and immunogenicity of a novel chimeric recombinant protein based on Plasmodium vivax AMA-1 and MSP1₁₉. *Vaccine*. v. 25, n. 35(18), p. 2463-2472, 2017.