

# EVALUACIÓN DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE *TRYPANOSOMA CRUZI* PARA EL DISEÑO DE UNA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Díaz, Genaro

Laboratorio de Tecnología Inmunológica LTI - UNL

Director: Bontempi, Iván

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, Vacuna, ISPA.

## INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es el causante de la enfermedad de Chagas, que constituye la principal endemia de América Latina, siendo la sexta enfermedad tropical más importante del mundo (Dumonteil y col., 2012). Actualmente entre 6 y 7 millones de personas están infectadas (OMS, 2019), siendo un problema de salud pública a nivel mundial, habiéndose registrado casos en Estados Unidos, Europa, Australia y Japón (Bonney, 2014). Por otro lado, los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de la infección por *T. cruzi* (Nifurtimox y Benznidazol), no son eficaces una vez que los pacientes adultos entran en la fase crónica de la infección (Coura y Borges-Pereira, 2012). En base a lo expuesto, la elaboración de una alternativa para el control de dicha enfermedad supone una necesidad clave, siendo la vacunación una gran candidata. Esto implicaría, no solo la eliminación del desarrollo de la infección con *T. cruzi*, sino también la reducción de enfermedades cardíacas severas.

Los principales candidatos vacunales, aquellos inmunógenos de *T. cruzi* que mayor éxito obtuvieron en modelos murinos de infección, provienen principalmente de la familia de la Transialidasa (Rodríguez-Morales y col., 2015). Entre los pertenecientes a dicha familia, un candidato vacunal también muy evaluado en la bibliografía, es la proteína de superficie de amastigotes 2 (ASP-2). Este antígeno generó gran protección en los distintos modelos de infección evaluados (Boscardin y col., 2003; Machado y col., 2006; Araujo y col., 2014), aunque principalmente con el adenovirus como plataforma de trabajo.

Si bien las vacunas de subunidad presentaron baja inmunogenicidad, la disponibilidad actual de diferentes adyuvantes ha permitido optimizar las formulaciones de vacunas, las cuales son consideradas las más seguras y una vía más rápida para su aprobación (Dumonteil y col., 2012). En particular, para *T. cruzi*, la inmunoprotección generada empleando formulaciones proteicas formuladas con adyuvantes, ha sido recientemente evaluada por numerosos autores (Rodríguez-Morales y col., 2015). En particular, nuestro grupo de trabajo viene evaluando vacunas a subunidad empleando un adyuvante de última generación basado en saponinas (ISCOMATRIX e ISPA, Bertona y col., 2017) el cual generó una importante respuesta inmune protectora (Bontempi y col., 2015; Prochetto y col., 2017). Por todo lo expuesto, en este trabajo nos proponemos a expresar la ASP-2 recombinante y formularla con el adyuvante ISPA, para evaluarla en un modelo murino de infección con *T. cruzi*.

Título del proyecto: Hacia el control de la infección producida por *Trypanosoma cruzi* mediante una vacuna segura: análisis preclínico de la eficacia

Instrumento: PICT

Año de la convocatoria: 2015

Organismo financiador: FONCYT

Director: Marcipar, Iván

## OBJETIVOS

**Objetivo general:** Evaluar en una formulación de vacuna de subunidad al antígeno Proteína de Superficie de Amastigotes-2 de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino de infección con dicho parásito.

### Objetivos específicos:

- Clonar y expresar la proteína ASP-2 de *T. cruzi* en *Escherichia coli*.
- Evaluar la respuesta inmune de la ASP-2 formulada con el adyuvante ISPA.
- Evaluar la capacidad protectora de la formulación ASP-2/ISPA en un modelo murino de infección con *T. cruzi*.

## METODOLOGÍA

Se seleccionó de la base de datos una secuencia representativa de la ASP-2 y se realizaron oligonucleótidos para la amplificación por PCR de la secuencia de dicho gen, empleando ADN purificado de *T. cruzi* de la cepa Tulahuén cl2. Dichos primers presentan secuencias de homología con el vector pRSET B. Una vez amplificado, se realizó la ligación según el método de SLiCE (Zhang y col., 2012), al vector previamente linealizado. Luego se realizó la transformación en bacterias *E. coli*. Se seleccionó un clon positivo luego de corroborar su secuencia mediante secuenciación. Se indujo la expresión de la ASP-2 con el uso de IPTG, y se determinó su presencia mediante geles de poliacrilamida y *western blot*. Finalmente, la ASP-2 fue purificada mediante cromatografía de pseudoafinidad por metal inmovilizado.

Para la evaluación de la respuesta inmune que genera ASP-2, se formuló dicha proteína con el adyuvante particulado ISPA (Bertona y col., 2017). Para la inmunización, se utilizaron ratones hembras BALB/c de 8 semanas de edad, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, mantenidos con alimento y agua *ad libitum*. Se trabajó con dos grupos de ratones (n=5). Se inmunizó cada grupo en forma subcutánea con tres dosis cada dos semanas. El grupo ASP-2/ISPA, se inoculó empleando 10 µg de proteína, formulado con 5 µg de ISPA en un volumen final de 100 µl, y el grupo control empleando únicamente PBS. Se tomaron muestras de sangre de la vena mandibular 7 días luego de cada dosis. Para la evaluación de la respuesta humoral, se analizaron mediante ELISA indirecto, los plasmas obtenidos. Se detectaron los anticuerpos IgG totales, IgG1 e IgG2a (Jackson Immuno Research). Para estimar la activación de la respuesta celular, 10 días después de la última dosis, a los grupos inmunizados se les realizó la prueba de la hipersensibilidad retardada (DTH). Se administró 5 µg de ASP-2 en la planta de la pata izquierda trasera de los ratones y se midió con un calibre vernier el grosor de la pata antes y 48 horas después de la aplicación de la proteína.

Finalmente, para evaluar la capacidad protectora de la inmunización, quince días después de la última inoculación, se realizó el desafío de ambos grupos, infectándolos con 1000 parásitos de *T. cruzi* de la cepa Tulahuén cl2. Para evaluar la parasitemia se tomaron muestras de sangre a los 14, 21, 28 y 35 días posteriores a la infección (dpi), y se observaron directamente al microscopio óptico con un aumento de 400X, realizado el recuento de 25 campos. Se realizaron pesajes de cada ratón antes de llevar a cabo la infección y en los días 14, 21, 28 y 35 dpi. También se analizaron parámetros clínicos empleando un *score* de actividad durante la infección. Entre los aspectos evaluados se encuentran piloerección, formación de joroba, disminución del movimiento, diarrea y afección ocular. Por último, se registró durante 100 días la mortalidad en los grupos.

## RESULTADOS /CONCLUSIONES

### Clonado y expresión de la proteína ASP-2 en *E. coli*

Luego de la amplificación y ligación por el método de SLiCE, transformamos células competentes de *E. coli* y obtuvimos 84 colonias de las cuales 8 resultaron positivas mediante *Colony-PCR*. Todas fueron evaluadas por PAGE-SDS y *western blot*. Si bien en el PAGE-SDS no se observaron diferencias de intensidad de banda con el control sin inducir, en el *western blot* se observaron bandas en 7 de los 8 clones inducidos. Se obtuvo una banda intensa de ~70kDa, siendo el tamaño esperado para dicha proteína. Además, se observó una segunda banda intensa a ~35kDa y sucesivas bandas de menor tamaño, presentes en los 7 clones. Debido a la ubicación N-terminal de la His-tag y la fuerte expresión observada, suponemos que las bandas observadas son producto de degradación de ASP-2 debido a su estructura particular (proteína transmembrana) y su alta concentración en el citosol.

Mediante *western blot* se verificó que la totalidad de la proteína se dirige al pellet luego de la lisis por sonicado y se pudo establecer un protocolo de purificación que permite recuperarla con relativa pureza. Partiendo de aproximadamente 25ml de cultivo inducido, logramos obtener 1,5ml con una concentración de 1,325 mg.ml<sup>-1</sup> de ASP-2, adecuada para su posterior implementación en las etapas de inmunización y evaluación de la respuesta.

### Evaluar la respuesta inmune de la formulación ASP-2/ISPA

#### Evaluación de la respuesta humoral.

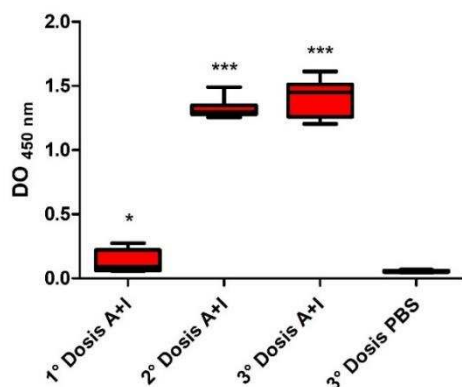


Figura 1: Densidad Óptica (DO) de IgG totales. ELISA indirecto de los plasmas de los grupos inmunizados. A+I: formulación ASP-2/ISPA; PBS: control; \*: valor  $P < 0,05$ ; \*\*\*: valor  $P < 0,0001$ .

Al evaluar los anticuerpos IgG total, observamos para el grupo ASP-2/ISPA diferencias significativas con respecto al grupo control luego de cada dosis (fig. 1). Para esta comparación se tomaron solo los datos del grupo control luego de la tercera dosis. Se observa diferencias estadísticas respecto al grupo control a partir de la primera dosis ( $P < 0,05$ ), aunque a partir de la segunda dosis los niveles de anticuerpos son altamente superiores con respecto al control ( $P < 0,0001$ , fig.1). También, se analizó la relación entre los isotipos IgG1 e IgG2a, observándose niveles superiores para la IgG2a ( $P < 0,001$ ). Esta proporción mayoritaria para IgG2a se ha asociado a mayor protección en modelos de infección con *T. cruzi*, propiciando una respuesta inclinada hacia el perfil Th1.

#### Evaluación de la respuesta celular.

Se realizó una reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) para evaluar *in vivo* la respuesta inmune mediada por células en respuesta a la ASP-2. Se graficaron las diferencias del grosor y se observó diferencias significativas para el grupo ASP-2/ISPA con respecto al grupo control ( $P < 0,001$ ), lo que supone una respuesta celular aumentada generada por la formulación. Este tipo de respuesta, es necesario para combatir microorganismos intracelulares como el *T. cruzi*.

### Evaluar la capacidad protectora de la formulación ASP-2/ISPA en un modelo murino de infección.

Luego del desafío, evaluamos la parasitemia, peso, parámetros clínicos (fig. 2) y mortalidad. Al observar la gráfica de parasitemia en función de los dpi, puede visualizarse una tendencia del grupo ASP-2/ISPA a niveles menores de parasitemia con respecto al grupo

control luego del día 14 (fig. 2A). Al evaluar el área bajo la curva del peso en función del tiempo (fig. 2B), se observan diferencias significativas del grupo ASP-2/ISPA con respecto al grupo control ( $P < 0,05$ ). En la evaluación de los parámetros clínicos, se observó diferencias significativas a partir del día 25 del grupo ASP-2/ISPA con respecto al grupo control. ( $P < 0,05$ ; fig. 2C). Finalmente, en la evaluación de la sobrevida el grupo ASP-2/ISPA logró un 100% de sobrevida, mientras que el grupo control finalizó con un 80%. La mortalidad del grupo control no logró alcanzar la tasa esperada del 50%, lo cual no permitió evaluar diferencias significativas. Esta baja infectividad en el modelo se debe a las variaciones de la actividad del *T. cruzi*. Si bien no permitió evaluar la mortalidad, permitió realizar una correcta evaluación durante toda la infección de los parámetros mostrados en la figura 2.

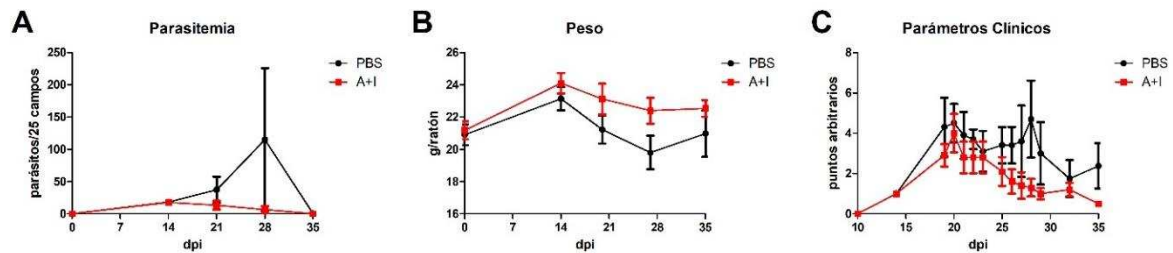


Figura 2 : Evaluación del modelo de infección con *T. cruzi*. Parámetros evaluados luego del desafío. (A): Parasitemia; (B): Peso; (C): Parámetros clínicos; dpi: días post infección; A+I: ASP-2/ISPA; PBS: control.

En este trabajo logramos clonar y expresar la proteína ASP-2. Además, evaluamos su capacidad inmunogénica, generando una potente respuesta humoral y celular cuando se formula con el adyuvante ISPA. Finalmente se evaluó su capacidad protectora en un modelo de infección con *T. cruzi*, y arrojó tener un gran potencial de protección, para ser empleado en futuras evaluaciones, empleándola sola o en una mezcla multicomponente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Araújo AF, de Oliveira G, Vasconcelos JF, Dominguez MR, Rodrigues MM, y col.,** 2014. Genetic vaccination against infection with myotropic parasite strains of *T. cruzi*. *Mediators Inflamm*, 2014,1-13.
- Bertona D, Pujato N, Bontempi I, Cabrera G, Marcipar IS, y col.,** 2017. Development and assessment of a new cage like particle adjuvant. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69 (10), 1293-1303.
- Bonney, KM,** 2014. *Chagas disease in 21st century: a public health emerging threat?* *Parasite*, 21, 11.
- Bontempi IA, Vicco MH, Cabrera G, Villar SR, González FB, Marcipar IS, y col.,** 2015. Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease. *Vaccine*, 33(10), 1274-83.
- Boscardin SB, Kinoshita SS, Fujimura AE, Rodrigues MM,** 2003. Immunization with cDNA expressed by amastigotes of *T. cruzi* elicits protective response against infection. *Infect Immun*, 71(5), 2744-57.
- Coura JR, Borges-Pereira J,** 2012. *Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review.* *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 45(3), 286–296.
- Dumonteil E, Bottazzi ME, Zhan B, Heffernan MJ, Jones K, Hotez PJ, y col.,** 2012. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Review of Vaccines*, 11(9), 1043–1055.
- Machado AV, Cardoso JE, Claser C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O,** 2006. Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding ASP-2 and trans-sialidase. *Human Gene Therapy*, 17(9), 898–908.
- Organización Mundial de la Salud (OMS),** 2019. La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana) [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Rodríguez-Morales O, Monteón V, Carrillo SC, Rios M, Martínez M, Carabarin A, Arce M,** 2015. Experimental Vaccines against Chagas Disease: A Journey through History. *J Immunol*, 2015, 489758.
- Zhang Y, Werling U, Edelmann W,** 2012. SLICE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. *Nucleic Acids*, 40(8), e55.