

## OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE CANDIDATOS VACUNALES CONTRA LA TRIPANOSOMIASIS BOVINA

**Farías, Amanda**

Laboratorio de Tecnología Inmunológica (LTI), FBCB, UNL

Director: Bontempi, Iván

Co-director: Díaz, Genaro

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: *Trypanosoma vivax*, *Pichia pastoris*, Inmunología

### INTRODUCCIÓN

El protozoo *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*) es el principal causante de la Tripanosomiasis bovina (TB) en América del Sur. Esta enfermedad causa signos clínicos como fiebre intermitente, anemia, aborto, apatía, anorexia, disminución de la producción de leche, pérdida progresiva de peso y, en algunos casos, muerte. En dicho continente, se transmite principalmente de forma mecánica por moscas hematófagas del género *Stomoxys* y *Tabanus* (Jones y col., 2001). Actualmente, en Argentina, el tripanocida empleado es el aceturato de diminazeno, que solo se aplica como agente curativo y tiene un costo de US \$24/animal (Abdala y col., 2020). Además, presenta una tasa de recidivas de un 30% de los animales tratados, luego de 2 meses. El desarrollo de una vacuna profiláctica surge como una solución estratégica para evitar el abuso de drogas antiparasitarias en el ganado y disminuir importantes pérdidas económicas generadas por la TB. Esta vacuna estimularía al sistema inmunitario para que responda de forma eficaz ante una futura infección por *T. vivax*, proporcionando protección que contribuiría a contener y controlar el avance de la enfermedad en nuestro país. Esta estrategia podría mejorar significativamente la calidad de producción de los establecimientos afectados.

En los últimos años, nuestro grupo de trabajo comenzó a evaluar antígenos de *T. vivax* como posibles candidatos vacunales. Para esto, se empleó como estrategia focalizar en proteínas conservadas de la superficie del parásito o enzimas encargadas de la infección (Antoine-Moussiaux y col., 2009). Algunos antígenos seleccionados fueron clonados y expresados en *Escherichia coli* (*E. coli*) y se emplearon para inmunizar ratones, formulados con el adyuvante ISPA (Bertona y col., 2017). Los resultados preliminares apuntan a que al menos dos candidatos brindaron protección a los ratones inmunizados. Ambos antígenos son miembros de una pequeña familia de proteínas que contiene otros candidatos con gran potencial. Sin embargo, se presentaron inconvenientes en los niveles de expresión de estos antígenos, con escaso rendimiento y dificultades en la purificación. Sumado a esto, los extractos de *E. coli* presentan LPS, una molécula que funciona como toxina, activando fuertemente al sistema inmune de manera inespecífica. Por este motivo, la misma debe ser removida, complejizando el proceso de purificación. En este sentido, una alternativa interesante para la expresión es la levadura *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) ya que no produce LPS. Esta levadura es empleada como plataforma para producir proteínas recombinantes, destacando su capacidad adicional de secretar la proteína heteróloga, lo cual facilitaría su purificación. Anteriormente, nuestro grupo ha trabajado con antígenos expresados en *P. pastoris*, obteniendo óptimos resultados en el modelo de inmunización e infección con *Trypanosoma cruzi* (Bontempi y col., 2015).

Por último, para superar las limitaciones de las estrategias convencionales de clonado, se implementará el método SLiCE (*Seamless Ligation Cloning Extract*) (Zhang y col., 2012).

Título del proyecto: "Desarrollo de una estrategia vacunal contra la infección con *Trypanosoma vivax*: Un resurgente patógeno que afecta la producción lechera en Argentina"

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2018

Organismo financiador: ANPCyT

Director: Bontempi, Iván

Este se basa en la recombinación *in vitro* entre regiones homólogas cortas (15-52 pb), empleando extractos bacterianos. El método permite el clonado eficaz de fragmentos de ADN en moléculas recombinantes en un único paso, sin utilizar ligasas ni enzimas de restricción.

En base a los antecedentes presentados, este trabajo propone clonar y expresar antígenos de una familia de proteínas de *T. vivax* en *P. pastoris* y evaluar su potencial como candidatos vacunales. Para esto, se evaluará la respuesta inmune inducida por estos antígenos formulados con ISPA, así como su capacidad protectora frente a una infección con el parásito en un modelo murino.

## OBJETIVOS

- Clonar los antígenos de *T. vivax* mediante el método SLiCE para su expresión en *Pichia pastoris*.
- Expresar en *P. pastoris* y obtener los antígenos puros para emplearlos en una vacuna.
- Evaluar la respuesta inmune desarrollada por ratones inmunizados con la formulación vacunal.
- Evaluar la capacidad protectora de la formulación vacunal en un modelo murino de infección con *T. vivax*.

## METODOLOGÍA

Se utilizaron como punto de partida las secuencias de los antígenos seleccionados previamente clonadas en el vector pGEM T-easy y verificadas por secuenciación. El clonado se realizó mediante el método SLiCE (Zhang y col., 2012), evaluando distintos ratios inserto:vector (5:1, 10:1 y 15:1) y disposiciones de las secuencias heterólogas flanqueantes (en ambos extremos, solo en un extremo y sin secuencias flanqueantes). Se diseñaron *primers* específicos y se utilizó el vector de expresión pPICZ $\alpha$  A del kit comercial EasySelect™ *Pichia* Expression (Invitrogen), que permite la secreción de la proteína recombinante al medio de cultivo. Este vector permite la selección positiva en *E. coli* y *P. pastoris* y agrega a la proteína una etiqueta de polihistidina C-terminal para su posterior purificación por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). Se realizó la transformación en *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante *shock* térmico, se cultivaron a 37°C en placas de Petri con medio LB agar y 25 mg/ml de zeocina como marcador de selección. Las colonias positivas se identificaron por *colony* PCR. Para verificar la presencia del inserto y su correspondiente tamaño, el ADN plasmídico de cada clon se analizó mediante cortes con enzimas de restricción y posterior electroforesis en geles de agarosa. Finalmente, mediante secuenciación (Macrogen, Corea) se corroboró la identidad y correcta secuencia de la construcción.

Las construcciones obtenidas se utilizaron para transformar la cepa X-33 de *Pichia pastoris* mediante electroporación. Se emplearon cubetas estériles de 0.2 cm de tamaño (Bio-Rad), un electroporador Bio-Rad Gene-Pulser y se realizó un pulso eléctrico siguiendo las recomendaciones del fabricante. La inducción de la expresión en clones positivos se llevó a cabo empleando metanol como inductor. Se evaluaron distintas condiciones para la expresión de las proteínas con el fin de identificar aquellas que generen mayor rendimiento, variando: pH, composición del medio y tiempo. Inicialmente, para generar biomasa, se inoculó un clon en medio BMGY (1% extracto de levadura, 2% peptona, 100 mM fosfato de potasio pH 6.0, 1,34% YNB, 4x10<sup>-5</sup>% biotina, 1% glicerol) suplementado con 100 mg/ml de zeocina y se incubó *overnight* en agitación a 28°C. Luego, las células se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en medio BMMY (1% extracto de levadura, 2% peptona, 100 mM fosfato de potasio pH 5-8, 1,34% YNB, 4x10<sup>-5</sup>% biotina, 0,6% metanol), en un volumen cuatro veces mayor al inicial. La inducción se llevó a cabo en agitación a 25°C durante 120 horas, añadiendo diariamente 0,6% de metanol para mantener la inducción. Se tomaron muestras cada 24 horas. Los resultados de la expresión en sobrenadante e intracelular se visualizaron en geles de poliacrilamida y se confirmaron mediante *dot blot* y *western blot*, usando un anticuerpo

primario Anti-His para detectar la cola de polihistidina. Posteriormente, se purificaron las proteínas recombinantes mediante IMAC, empleando una columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA.

Los antígenos purificados se evaluaron individualmente en formulaciones con el adyuvante ISPA. Para la inmunización, se emplearon ratones BALB/cCmedc hembras de 6 a 8 semanas de edad al comienzo del protocolo de inmunización, obtenidos en el Centro de Medicina Comparada (ICIVET LITORAL, CONICET). Se mantuvieron en condiciones estables de luz y temperatura, con ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con alimento y agua *ad libitum*. Se trabajó con 4 grupos (n=5): Ag1-ISPA, Ag2-ISPA, Ag3-ISPA y control. La inmunización se realizó en forma subcutánea, realizando dos aplicaciones sucesivas con 21 días de diferencia entre ambas. Cada dosis constaba de 10 µg de proteína con 3 µl de ISPA, en un volumen final de 100 µl. El grupo control solo se inoculó con el adyuvante y el vehículo acuoso, PBS. Se tomaron muestras de sangre del seno venoso submandibular 7 días después de cada dosis para la obtención de plasma. Se caracterizó la respuesta humoral mediante la técnica de ELISA indirecto, sensibilizando las placas con los antígenos correspondientes para cada grupo. Se determinó el nivel de las IgG totales con anticuerpos monoclonales específicos anti-IgG totales, conjugados a peroxidasa y se empleó el cromógeno TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) como revelador. Los resultados se midieron en el lector específico a 450 nm (Bio-Tek Instruments). Por otro lado, se estimó la respuesta celular *in vivo* mediante la prueba de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH). La misma, se realizó 10 días después de la última inmunización, administrando 5 µg del antígeno correspondiente en la planta de la pata trasera de los ratones. El diámetro de la pata se midió antes y 48 horas después del estímulo utilizando un calibre Vernier. La variación del diámetro producida por la inflamación se usó como indicador del nivel de activación de la respuesta celular.

Con el objetivo de poner a prueba la inmunidad conferida por las formulaciones, los grupos inmunizados descritos previamente fueron desafiados con el parásito. Se infectaron 21 días después de la última inmunización y cada ratón recibió por vía intraperitoneal 1000 *T. vivax* de la cepa Y486. Durante el desafío, se dio seguimiento a diferentes parámetros que reflejaran el estado de los grupos. La parasitemia se determinó por recuento directo de parásitos al microscopio óptico. Junto con el peso se controlaron 2-3 veces por semana. Se evaluó supervivencia diariamente durante 60 días luego del desafío.

## RESULTADOS/CONCLUSIONES

Se clonaron con éxito las secuencias de los antígenos seleccionados en el vector pPICZα A utilizando el método SLiCE. Se observó una eficiencia de clonado superior al utilizar un ratio inserto:vector 15:1 y el vector sin secuencias heterólogas flanqueantes o con secuencias en un solo extremo. Estos hallazgos fueron consistentes con los obtenidos en estudios previos (Zhang y col., 2012). Los clones positivos fueron identificados mediante *colony* PCR y se confirmó la presencia del inserto correspondiente mediante cortes con enzimas de restricción. Estos se realizaron de forma tal que linealizaran la construcción, observándose la banda esperada de aprox. 6000 pb (vector ~3600 pb + inserto ~2400 pb). Los resultados de la secuenciación confirmaron la identidad y la secuencia correcta de los antígenos clonados, verificando que estaban en el marco de lectura adecuado con la secuencia señal factor α N-terminal, necesaria para la secreción, y con la etiqueta de polihistidina C-terminal.

Las construcciones obtenidas se utilizaron para electroporar la cepa X-33 de *P. pastoris*. Se evaluaron distintas condiciones para la expresión de las proteínas. Respecto a la composición del medio, se probó con un medio mínimo, pero se observó una baja expresión. Sin embargo, al utilizar un medio complejo que contenía extracto de levadura y peptona, los niveles de expresión aumentaron. Además, se ensayaron suplementos como EDTA, L-arginina y peptona ácida de caseína, obteniendo los mejores resultados con este último. Esto podría deberse a que la peptona, el extracto de levadura y la peptona ácida de caseína ayudan a estabilizar las proteínas secretadas y reducen su proteólisis. En cuanto al pH, no se observó

un efecto significativo en la expresión de las proteínas. Se utilizó idealmente un pH 7-8, ligeramente inferior al punto isoeléctrico de las proteínas (pI 8-9). Se analizó tanto el sobrenadante de cultivo como el pellet celular, observando una mayor acumulación citoplasmática de las proteínas de interés entre las 96 y 120 horas de inducción. En base a estos resultados, los antígenos fueron purificados mediante IMAC a partir de lisados celulares de *P. pastoris*.

Los antígenos obtenidos se ensayaron individualmente en modelos murinos, formulados con el adyuvante ISPA. Se evaluó la respuesta humoral mediante ELISA indirecto. Tras la primera dosis, se observaron bajos niveles de IgG totales. Sin embargo, se registró un aumento significativo en estos niveles en los tres grupos después de la segunda dosis, en comparación con el grupo control. Estos resultados sugieren que los ratones desarrollaron una respuesta humoral específica contra los antígenos administrados. Se realizó la prueba de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) a los 10 días posteriores a la última dosis. Los tres grupos experimentaron un aumento significativo en el diámetro de la pata, respecto al grupo control. Estos incrementos indican que los antígenos son capaces de inducir una respuesta celular específica y robusta, caracterizada por la presencia de células T efectoras que responden al estímulo.

Los grupos inmunizados fueron desafiados mediante una infección con *T. vivax*. Durante el primer pico de parasitemia todos los grupos mostraron niveles similares. Sin embargo, en el segundo pico de parasitemia, los grupos Ag1-ISPA y Ag3-ISPA mantuvieron la carga en niveles menores que el grupo control. De forma similar, los grupos Ag1-ISPA y Ag3-ISPA mostraron una menor pérdida de peso en comparación al grupo control. Estas variaciones se hicieron más evidentes mediante el análisis del área bajo la curva. Respecto a la supervivencia, el grupo control mostró una mortalidad total a los 41 días. En contraste, los grupos Ag1-ISPA y Ag3-ISPA mostraron una mayor supervivencia, manteniendo un 40% hasta el día 60 post infección.

En resumen, se clonaron con éxito los antígenos de *T. vivax* mediante SLiCE, se expresaron en la plataforma *P. pastoris* y se obtuvieron proteínas de calidad adecuada para su uso en formulaciones vacunales. La evaluación de dichas formulaciones mostró que los antígenos ensayados inducen potentes respuestas inmunes específicas, promoviendo el desarrollo de altos niveles de anticuerpos y activación de células efectoras. Además, dos de las tres formulaciones ensayadas mostraron protección, al menos parcial, contra la infección, destacando la disminución de los efectos de la infección y mayor supervivencia. Estos resultados se alinean con nuestros resultados preliminares, reforzando la idea de que esta familia de antígenos posee gran potencial como candidatos vacunales para ser empleados en futuros estudios.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Abdala A.A., Larriestra A.J., Signorini M.,** 2020. Estimación de pérdidas económicas causadas por Trypanosoma vivax en un rodeo lechero de Argentina. Revista veterinaria, 31, 115-9.
- Antoine-Moussiaux N., Büscher P., Desmecht D.,** 2009. Host-parasite interactions in trypanosomiasis: on the way to an antidisease strategy. Infection and Immunity, 77, 1276-84.
- Bertona D., et al.,** 2017. Development and assessment of a new cage-like particle adjuvant. Journal of Pharmacy and Pharmacol, 69, 1293-303.
- Bontempi I.A., et al.,** 2015. Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease. Vaccine, 33, 1274-83.
- Jones T.W., Dávila A.M.R.,** 2001. Trypanosoma vivax – out of Africa. Trends in Parasitology, 17, 99-101.
- Zhang Y., Werling U., Edelmann W.,** 2012. SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. Nucleic Acids Research, 40, e55.