



EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA FAMILIA DE LA TRANS-SIALIDASA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* DESTINADA AL DESARROLLO DE VACUNAS

Fessia Joana

Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Director: Marcipar Iván

Codirectora: Prochetto Estefanía

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Vacunas de subunidades, *Trypanosoma cruzi*, Trans-sialidasa

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), en donde existen a nivel mundial entre 6 y 7 millones de personas infectadas. Se encuentra sobre todo en zonas endémicas de 21 países de América Latina (Organización Mundial de la Salud, 2019). No existe vacuna para esta enfermedad el tratamiento actual se realiza con Benznidazol o Nifurtimox, medicamentos efectivos si se administran en la fase aguda de la enfermedad pero en los casos de infección crónica se consiguen tasas de curación muy bajas (Molina y col., 2015). En nuestro laboratorio se han ensayado varias proteínas de *T. cruzi* como candidatos para vacunas de subunidades, y se vio que entre todos estos, la proteína de superficie Trans-sialidasa (TS) fue la que mostró los resultados más promisorios (Bontempi y col., 2015). En base a este antecedente el objetivo es continuar y profundizar este estudio, trabajando con fracciones de esta proteína TS y formulándola con un adyuvante desarrollado en el laboratorio (Bertona y col., 2017).

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la protección que brindan fragmentos de la proteína TS de *T. cruzi* a corto plazo y a largo plazo frente a la infección por el parásito en un modelo murino de la enfermedad.

Objetivos particulares

- Expresar los fragmentos proteicos de una proteína de la familia de la TS de *T. cruzi* en *Escherichia coli* y purificarlos.
- Inmunizar los ratones BALB/c con los antígenos y evaluar la respuesta inmune generada a corto plazo y a largo plazo.
- Evaluar de la capacidad protectora de los antígenos a corto plazo y a largo plazo frente a un desafío con *T. cruzi*.

METODOLOGÍA

Obtención de los fragmentos proteicos

Se trabajó con dos fragmentos de la proteína TS de *T. cruzi* correspondientes a los extremos amino terminal (EAT-TS) y carboxilo terminal (ECT-TS). Estos fragmentos, ya clonados en el vector de expresión pET-28a (+), se expresaron en bacterias *E. coli*, se purificaron mediante cromatografía en columna de Ni⁺² y se cuantificaron las fracciones obtenidas por el método colorimétrico del ácido bicinónico.

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: CONICET.

Nombre completo del director: Marcipar Iván S.

Protocolo de inmunización

Para evaluar la capacidad protectora de los fragmentos a corto y a largo plazo se inmunizaron ratones hembras de la cepa BALB/c. Para la evaluación a corto plazo se trabajó con los siguientes grupos (n=5 ratones por grupo): Grupo EAT-TS, inmunizado con el extremo amino terminal de la TS; Grupo ECT-TS, inmunizado con el extremo carboxilo terminal de la TS; Grupo mezcla EAT-TS+ECT-TS, inmunizado con los dos fragmentos proteicos y el Grupo PBS (Grupo control), inmunizado con buffer fosfato salino (PBS). El protocolo de inmunización consistió en tres dosis subcutáneas, una cada 15 días, en donde cada ratón recibió 10 µg del antígeno correspondiente formulado con 3 µl del adyuvante ISPA (Adyuvante de producción propia del laboratorio, Bertona y col., 2017). El grupo control recibió 100µl de PBS y el grupo mezcla fue inmunizado con 5 ug de cada antígeno más ISPA. Para la evaluación de las formulaciones a largo plazo se trabajó con los mismos grupos experimentales, a excepción del grupo mezcla y con el mismo esquema de inmunización.

Evaluación de la respuesta inmune generada por EAT-TS y ECT-TS

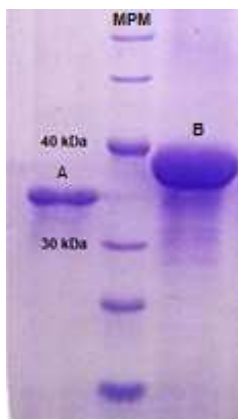
Siete días finalizado el esquema de inmunización se extrajeron muestras de sangre de cada ratón para de evaluar la presencia de anticuerpos específicos mediante ELISA. También se realizó un ensayo de hipersensibilidad retardada (DTH) el cual permite evaluar la generación de una respuesta celular local específica. Para esta DTH se inoculó en la almohadilla plantar izquierda de cada ratón 5 ug del antígeno correspondiente sin adyuvante y antes y 48 hs después de la inoculación se midió la inflamación generada en cada pata con un calibre Vernier. Para la técnica de ELISA se sensibilizaron con 0,5 ug de antígeno placas de 96 wells y se trabajó con diluciones de plasmas 1/100. Se evaluaron los isotipos IgG1 e IgG2a específicos. A los grupos de experimentación para la evaluación a largo plazo, no solo se realizó una prueba de DTH y ELISA a los 7 días post inmunización sino que también a los 45 días para evaluar la respuesta a largo plazo.

Análisis de la capacidad protectora de los fragmentos y supervivencia

Quince días post inmunización para los grupos de evaluación a corto plazo y a los 60 días para los grupos de evaluación de memoria, se infectaron los ratones con 1000 *T. cruzi* de la cepa Tulahuen inoculados de forma intraperitoneal. A los 14, 21 y 28 días post infección se llevó a cabo la parasitemia, en donde se tomó 5 ul de sangre de la cola de cada ratón y se realizó un recuento de parásitos en microscopio. Se evaluó la supervivencia hasta los 90 días post infección.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Obtención de los fragmentos proteicos



Los fragmentos exitosamente expresados se cuantificaron y se corrieron en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para corroborar su pureza (Figura 1). La concentración obtenida de cada proteína fue de 1000 ug/ml para EAT-TS y de 1700 ug/ml para ECT-TS.

Figura 1: Purificación de las proteínas recombinantes: SDS-PAGE de las proteínas purificadas. MPM: marcador de peso molecular. **A)** EAT-TS de peso molecular de 35 KDa aproximadamente. La concentración obtenida fue de 1000 ug/ml. **B)** ECT-TS de peso molecular de 38 KDa aproximadamente. La concentración obtenida fue de 1700 ug/ml.

Evaluación de la respuesta inmune generada por EAT-TS y ECT-TS

En el análisis de anticuerpos específicos por ELISA se puede observar que los diferentes antígenos son capaces de generar anticuerpos y que estos son de un mayor perfil IgG2a el cual se relaciona en ratones BALB/c con el desarrollo de una respuesta inmune celular, importante para el control del *T. cruzi* (Dos Santos y col., 2014) (Figura 2). La mezcla de los dos antígenos mostró un menor nivel de anticuerpos específicos (Figura 2C). Para el caso de los ratones inmunizados para la evaluación de memoria, se puede ver que estos anticuerpos específicos siguen aumentando a los 45 días post inoculación (Figura 2A y 2B).

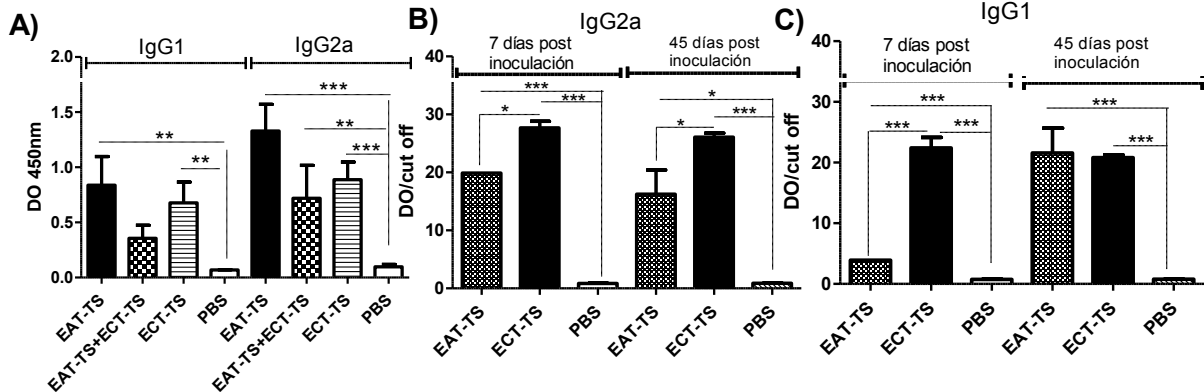


Figura 2: Determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos mediante ELISA. A) IgG1 e IgG2a a los 7 días post inoculación de los grupos de evaluación a corto plazo (** $p < 0,0005$, Mann Whitnet test). **B)** IgG2a de los grupos de evaluación a largo plazo a los 7 y 45 días post inoculación (** $p < 0,0001$, Unpaired t test). **C)** IgG1 de los grupos de evaluación a largo plazo a los 7 y 45 días post inoculación (** $p < 0,0005$; Unpaired t test).

Con respecto a la evaluación de la respuesta celular por DTH se puede ver que los distintos fragmentos generan una gran inflamación local específica (Figura 3) y que el grupo EAT-TS mostró los niveles más altos a los 7 días post inmunización (Figura 3A y 3B). Para el caso del modelo a largo plazo, se ve que el grupo EAT-TS disminuye este nivel de DTH a los 45 días post inoculación y que el grupo ECT-TS aumentó dicho nivel para este día, pero de igual manera estos niveles de inflamación se mantienen altos al mes y medio post inmunización (Figura 3A).

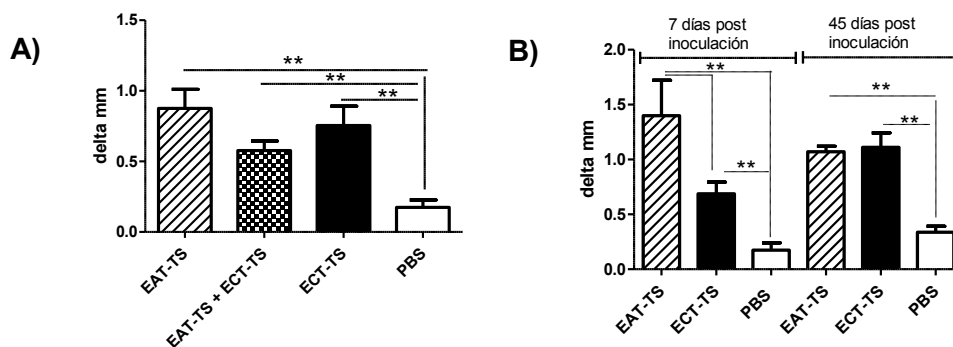


Figura 3. Evaluación de la respuesta inmune in vivo: test de hipersensibilidad retardada (DTH). A) DTH de los grupos de evaluación a corto plazo realizado a los 7 días post inmunización (** $p < 0,005$, Unpaired t test). **B)** DTH de los grupos de evaluación a largo plazo medidos a los 7 y 45 días post inmunización.

Análisis de la supervivencia de cada grupo

Con respecto al análisis de supervivencia podemos observar que para la evaluación a corto plazo el grupo EAT-TS fue el que presentó el mayor nivel de supervivencia, siendo este del 60%, seguido por el grupo ECT-TS que mostró un nivel del 40%. El grupo PBS presentó una mortalidad del 100% al día 19 post infección. El grupo EAT-TS+ECT-TS se comportó de igual manera, con una mortalidad del 100% al día 21 post infección (Figura 4 A). Con respecto a los grupos de evaluación a largo plazo, tanto el grupo PBS como el EAT-TS presentaron una mortalidad del 100% y solo el grupo ECT-TS presentó una supervivencia baja del 25% (Figura 4 B).

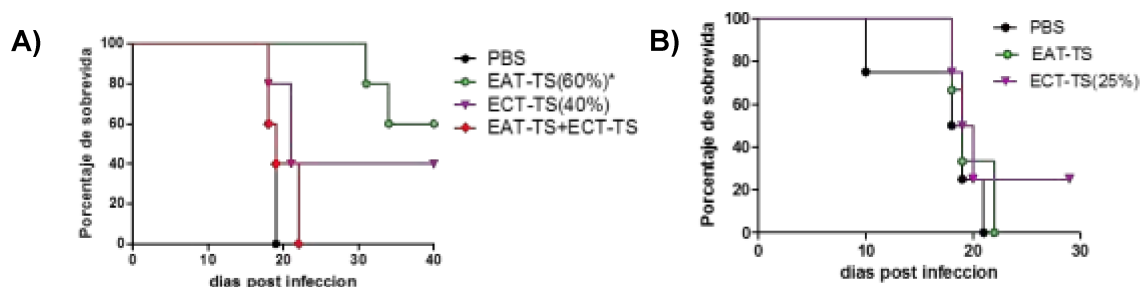


Figura 4: Protección obtenida con las formulaciones vacunales: supervivencia luego de un desafío con 1000 *T. cruzi*. A) Gráfico de supervivencia de los grupos de evaluación a corto plazo. B) Gráfico de supervivencia de los grupos de evaluación a largo plazo. (* $p < 0,05$ para el grupo EAT-TS vs PBS y EAT-TS vs EAT-TS+ECT-TS, Log-rank (Mantel-Cox) Test).

Como puede evidenciarse los fragmentos EAT-TS y ECT-TS son capaces de generar una buena respuesta inmune, la cual se mantiene hasta 45 días post inmunización, y generan protección frente a un desafío con *T. cruzi* cuando este se realiza a corto plazo (15 días post inmunización). El grupo inmunizado con la mezcla de los fragmentos no mejoró los resultados obtenidos comparados con el desempeño de los fragmentos por si solos, presentó una mortalidad del 100%. Cuando se realiza el desafío a largo plazo (45 días post inmunización), si bien la respuesta inmune a esa fecha siguió siendo buena, los grupos vacunados no lograron sobrevivir a esta dosis de parásitos, revelando que la capacidad de protección de las formulaciones vacunales disminuye con el tiempo. Esto podría deberse a que el esquema de inmunización empleado, de tres dosis seguidas, no favorezca el desarrollo de la memoria inmunológica (Siegrist, 2018), aspecto a seguir trabajando para poder mejorar estos resultados. Otro ensayo a realizar a futuro para evaluar si nuestras formulaciones generan memoria es la medición por citometría de flujo para la determinación de linfocitos T de memoria utilizando marcadores celulares como lo son el CD44 y CD62.

BIBLIOGRAFIA BÁSICA

- Bertona D, Pujato N, Bontempi I, Cabrera G, Nicastro A, Calvino L, Marcipar IS. (2017). Development and assessment of a new cage-like particle adjuvant. *J Pharm Pharmacol.* 69(10)
- Bontempi I, Vicco M, Cabrera G, Callewaert N, Pérez A, Marcipar I. (2015). Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease. *Vaccine.* 33(10):1274-83.
- Dos Santos Virgilio, F.; Pontes, C.; Vasconcelos, J. (2014). CD8+ T Cell-Mediated Immunity during *T. cruzi* Infection: A Path for Vaccine Development?. *Mediators of Inflammation*, 2014.
- Organización Mundial de la Salud (2019). La enfermedad de Chagas. Recuperado de [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypansomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypansomiasis))
- Siegrist C., (2018). *Vaccine Immunology*. En: Stanley A. Plotkin, Offit, Kathryn M. Edwards (Ed.), *Plotkin's Vaccines* (séptima edición) 16-34.e7. Elsevier.