

Obtención y evaluación preclínica de dos fracciones de la proteína transialidasa de *T. cruzi* para ser usadas como subunidades en el desarrollo de vacunas contra el parásito.

Estefanía Prochetto.

Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas- UNL.

Área: Ciencias Biológicas- Biotecnología.

INTRODUCCIÓN:

El *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es un parásito protozoario que en la actualidad infecta a más de 10 millones de personas, mientras que más de 60 millones están en riesgo de infección, principalmente en Latinoamérica (Reithinger y col.,2009).

Aunque se han desarrollado drogas parasiticidas muy efectivas en niños en la etapa aguda de la infección, en la etapa crónica de esta parasitosis el tratamiento es controvertido. Por lo tanto, el desarrollo de una inmunoprofilaxis para el control de la enfermedad es una necesidad debido a las ventajas comparativas de costo, seguridad y el control epidemiológico que la vacunación permite (Lee y col., 2010). Con esta finalidad se han llevado a cabo numerosos estudios y se ha obtenido importante información proveniente tanto de humanos como de modelos experimentales.

Aunque la complejidad de la infección por *T. cruzi* no ha permitido aún la elaboración de una vacuna que sea esterilizante para el parásito, en varios estudios preclínicos se ha conseguido una importante capacidad inmunoprotectora medida en términos de sobrevivencia a un desafío (Gupta y Garg, 2010). El mayor éxito obtenido hasta el momento se ha conseguido con antígenos de la superfamilia de la transialidasa (TS), la cual es una enzima de *T. cruzi* que tiene un rol crítico en la infección, ya que transfiere residuos de ácido siálico desde las células del huésped a la superficie del parásito, dificultando el reconocimiento del sistema inmune y permitiendo el ingreso del parásito a las células que infecta (Fontanella y col., 2008; Bontempi y col.,2015)

OBJETIVOS:

Objetivo general:

En base a la experiencia adquirida y a los resultados promisorios de protección obtenidos con la TS de *T. cruzi*, ahora nos proponemos obtener en nuestro laboratorio nuestros propios antígenos de la TS para continuar con los estudios desarrollados hasta el momento, con el propósito final de desarrollar un inmunógeno efectivo contra la enfermedad de Chagas.

Objetivos particulares:

- Diseñar cebadores de PCR para aislar los fragmentos amino terminal (N-term) y carboxilo terminal (C-term) de la proteína transialidasa de *T. cruzi* a partir de ADN genómico.
- Clonar, secuenciar y expresar los fragmentos C-term y N- term en *E. coli*.
- Purificar los antígenos en estudio.
- Inmunizar ratones Balb/c con los antígenos obtenidos formulados con adyuvantes liposomales, para luego evaluar la generación de anticuerpos IgG por ELISA, y la capacidad protectora ante un desafío con *T. cruzi*.

PICT 2012-1228. "Desarrollo de una estrategia inmunomoduladora para el control de infecciones producidas por cepas heterogéneas de *Trypanosoma cruzi*". Director: Iván S. Marcipar.

Premio "Incentivo a la Innovación en Enfermedades Huérfanas" entre el Conicet, el Mincyt y Sanofi-Aventis Argentina: "Diseño y evaluación de un prototipo de vacuna oral contra la enfermedad de Chagas en modelo murino. Desarrollo de un nuevo sistema de expresión antígeno y adyuvante utilizando *Lactococcus lactis* como vehículo", Integrantes del Grupo Responsable: Christian Magni, Ana Rosa Perez e Ivan Marcipar.

Iván S. Marcipar (director), Gabriel Cabrera (colaborador).

METODOLOGÍA:

Actividad 1: Construcción, obtención y purificación de los fragmentos amino terminal y carboxi terminal de la Transialidasa.

Los extremos N-term. y C-term. de la Transialidasa (TS) fueron obtenidos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de ADN genómico de *T. cruzi*. Los cebadores empleados se diseñaron mediante el programa Primer3 en base a la secuencia del gen trans-sialidase (GenBank AJ276679.1). A estos se les agregó además, sitios de corte para las enzimas de restricción ECO RI y SACI. El ADN obtenido fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 1%, purificado mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, (Promega®), cortado con las enzimas de restricción ECO RI y SACI y ligado al vector pGEM-Teasy (Promega®). Con estas construcciones se transformaron células *E.coli* DH5α; que se hicieron crecer en un medio LB-Agar-Ampicilina. El ADN plasmídico fue extraído de dichas bacterias utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega®). Las muestras obtenidas se cortaron con las enzimas de restricción correspondientes y se corrieron los fragmentos en un gel de agarosa 1%. Aquellas colonias que mostraron las bandas de interés se enviaron a secuenciar. Una vez corroborada la secuencia de ADN, se procedió a la expresión de las proteínas. Para esto se subclonaron dichos segmentos al vector pET28a en los sitios ECO RI y SACI y con ello se transformaron células *E. coli* DE3 que se hicieron crecer en un medio LB-Kanamicina. Como inductor de la expresión se utilizó IPTG. A continuación se realizó un screening de colonias, mediante una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), a fin de encontrar aquellas capaces de expresar a los antígenos de interés, con las cuales se continuó trabajando. Estas colonias se repicaron a un medio de mayor volumen y se volvieron a inducir. Las proteínas fueron extraídas del interior celular por sonicación y solubilizadas con urea 8N. Por último, fueron purificadas con una columna de Ni²⁺ utilizando soluciones de urea 8N-imidazol con diferentes concentraciones para su elusión. Las fracciones de elusión fueron analizadas mediante un SDS-PAGE para evaluar la integridad y pureza de las proteínas.

Actividad 2: Inmunización de ratones Balb/c con los fragmentos proteicos formulados junto con adyuvante liposomal y evaluación de la capacidad protectora ante un desafío con *T. cruzi*.

Se trabajó con ratones Balb/c de 6 a 8 semanas mantenidos con alimento y agua *ad libitum*, los cuales fueron separados en tres grupos de 5 ratones: grupo PBS o grupo control, grupo C-term. y grupo N-term. Cada grupo fue inmunizado, por vía subcutánea, con los antígenos correspondientes formulados con un adyuvante liposomal (desarrollado por nuestro grupo de trabajo en colaboración con Lipomize SRL, Santa Fe), a excepción del grupo control que solo recibió PBS. Las inoculaciones fueron tres, separadas unas de otras por 15 días. Luego de la tercera inmunización se tomaron muestras de plasma y se realizó un ELISA a fin de analizar la presencia de anticuerpos específicos anti- TS. Quince días luego de la última inmunización, los ratones de cada grupo fueron desafiados con 1000 parásitos *T. cruzi* de la cepa Tulahuen, inoculados intraperitonealmente. Se evaluó durante dos meses la parasitemia y mortalidad de los ratones a fin de determinar la capacidad protectora de los fragmentos.

RESULTADOS:

Actividad 1: Construcción, obtención y purificación de los fragmentos N-term. y C-term. de la Transialidasa.

Las secuencias de ADN de ambos fragmentos proteicos obtenidas por PCR mostraron una longitud de 900pb aproximadamente. El posterior clonado de dichas secuencias y

su expresión resultaron exitosas, obteniéndose proteínas cuyos pesos moleculares fueron, aproximadamente, de 36 kDa para el fragmento C-term. y 35 kDa para el extremo N-term. La figura 1 muestra los resultados de la purificación en columna de Ni²⁺ en donde se puede observar que los fragmentos fueron recuperados con un alto grado de pureza.

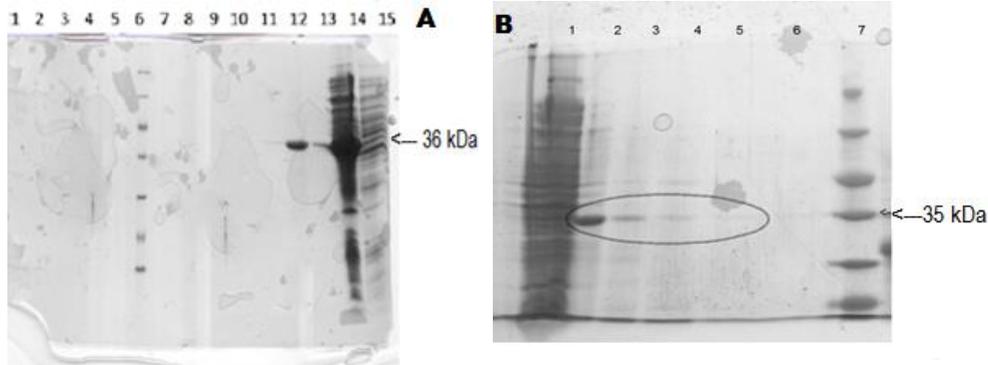


Figura 1: SDS-PAGE de las fracciones eluidas en la etapa de purificación. **A:** fragmento C-term. 1-5: fracciones eluidas con urea 8N-imidazol 100Mm. 6- Marcador peso molecular. 7-13: fracciones eluidas con urea 8N-imidazol 50 mM. 14- cultivo inducido. 15-cultivo sin inducir. **B:** fragmento N-term. 1- cultivo sin inducir. 2-4 fracciones eluidas con urea 8N-imidazol 250 mM. 5- 6 fracciones eluidas con urea 8N-imidazol 500mM. 7- marcador de peso molecular, cuyas bandas son las siguientes: 116 kDa, 66,2 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18,4 kDa.

Actividad 2: Inmunización de ratones Balb/c con los fragmentos proteicos formulados junto con adyuvante liposomal y evaluación de la capacidad protectora ante un desafío con *T. cruzi*.

En el análisis de anticuerpos anti-TS se evaluaron los niveles de IgG total de cada grupo y además, los isotipos IgG1 e IgG2. El fragmento C-term mostró mayores niveles de anticuerpos IgG total anti-TS en comparación con el N-term, el cual presentó valores muy bajos, con una diferencia pequeña respecto al grupo control (figura 2). En cuanto a los isotipos IgG1 e IgG2 específicos contra el antígeno, el extremo C-terminal fue también el que exhibió los niveles más altos de anticuerpos, con un mayor perfil IgG2. El extremo N-terminal en cambio, mostró valores bajos similares a los del grupo control (figura 3).

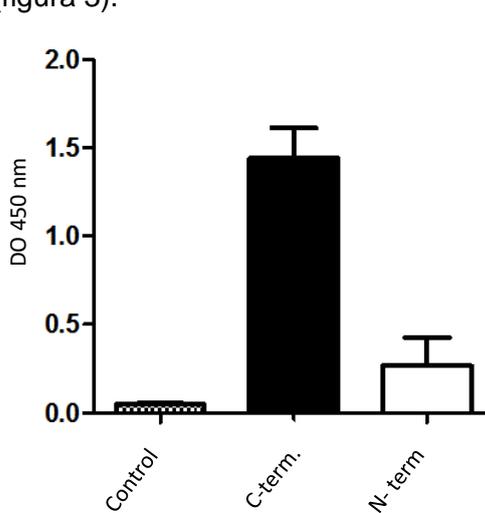


Figura 2: ELISA, análisis de IgG total.

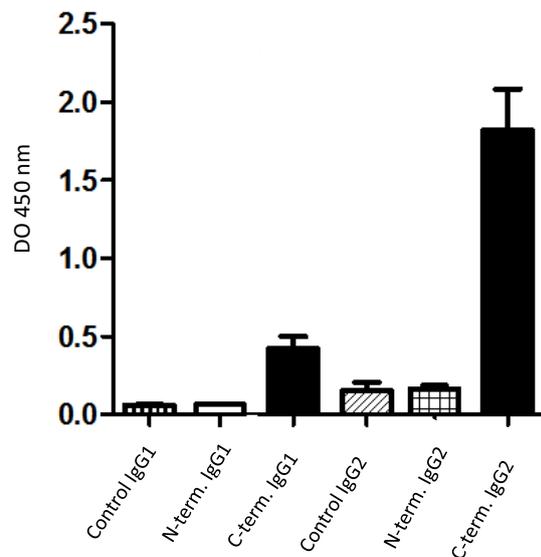


Figura 3: ELISA, análisis de isotipos IgG

El número de parásitos en sangre o parasitemia se evaluó a los 14, 21 y 28 días post infección. En dicho análisis se vio que los ratones vacunados presentaron una menor parasitemia respecto al grupo control, en donde el grupo C-term. mostró los mejores resultados (Figura 4). Los resultados de sobrevida fueron promisorios, ya que ambos grupos de ratones inmunizados tuvieron una sobrevida del 100%, mientras que la sobrevida del grupo control fue del 60%.

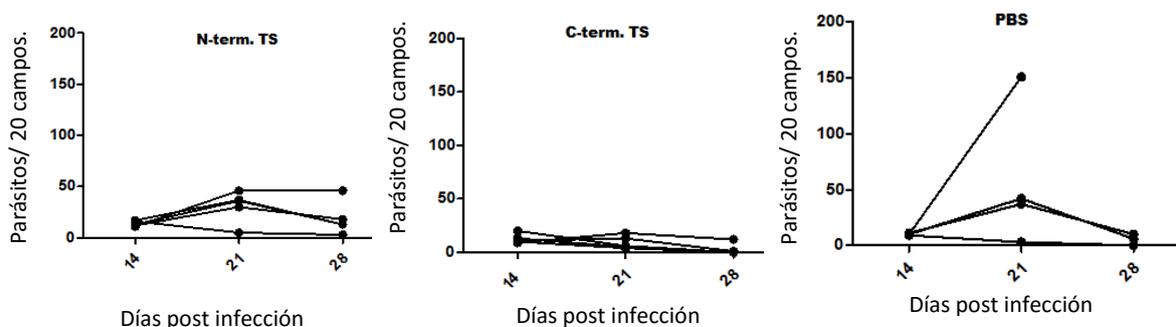


Figura 4: Número de parásitos contados en 20 campos en microscopio óptico a los 14, 21 y 28 días post infección.

CONCLUSIÓN

Los fragmentos de TS obtenidos mostraron capacidad protectora frente al desafío con *T. cruzi* siendo el extremo C-term. el que evidenció los mejores resultados, presentando altos niveles de anticuerpos, con un perfil IgG2 mayor, y una parasitemia muy baja, la cual se mantuvo estable a lo largo del experimento. Estos resultados correlacionaron con el ensayo de sobrevida, ya que si bien no se obtuvo significación estadística, los grupos inmunizados mostraron una mayor sobrevida que el grupo Control. Experimentos adicionales serán llevados a cabo para ampliar el estudio y confirmar la capacidad protectora de las formulaciones desarrolladas.

BIBLIOGRAFÍA:

- Bontempi I. A., Vicco M.H, Cabrera G., Villar S.R, González F. B., Roggero E. A., Ameloot P., Callewaert N., Pérez A. R., Marcipar I.S.**, 2015. Efficacy of trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease. *Vaccine*, 33, 1274- 1283.
- Fontanella G.H., De Vusser K., Laroy W., Daurelio L., Nocito A.L., Revelli S., Contreras R.**, 2008. Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental *Trypanosoma cruzi* infection: a vaccine candidate. *Vaccine*, 26(19), 2322-2324.
- Gupta S., Garg N.J.**, 2010. Prophylactic efficacy of TcVac2 against *Trypanosoma cruzi* in mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8), e797.
- Lee B., Bacon K., Connor D., Willig A., Bailey R.**, 2010. The potential economic value of a *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease) vaccine in Latin America. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(12), e916.
- Reithinger R., Tarleton R.L., Urbina J.A., Kitron U., Gürtler R.E.**, 2009. Eliminating Chagas disease : challenges and a roadmap. *BMJ : British Medical Journal*, 338 :b1283.