

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS ASP-2 E TC24 DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Matheus Canieles Neves<sup>1</sup>; Gustavo dos Santos Hartleben<sup>2</sup>; Bárbara da Rocha Fonseca<sup>2</sup>; Beatriz Oswald Rutz<sup>2</sup>; Gabriela Sanches de Avila; Sibele Borsuk<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – matheuscneves00@gmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – gustavo-hart@hotmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – Barbfonseca@hotmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – Beatrizrutz19@gmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – gabrielasanchesdeavila@gmail.com

<sup>3</sup>Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – sibeleborsuk@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo parasita intracelular obrigatório *Trypanosoma cruzi*, está entre as doenças tropicais negligenciadas mais relevantes, afetando mais de 7 milhões de pessoas ao redor do mundo (CDS, 2021). Atualmente não existe nenhuma vacina disponível no mercado com a capacidade de controlar a infecção de *T. cruzi* em humanos, mesmo com diferentes vacinas baseadas em sistemas de subunidades virais, de DNA ou proteicas com adjuvantes tenham sido testadas de forma pré-clínica (Rodríguez-Morales O et al., 2015). Entretanto, ainda não foi alcançada nenhuma vacina profilática esterilizante, indicando a necessidade de novas estratégias vacinais.

Dentro deste contexto, a estratégia vacinal utilizando *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) como vetor para a expressão de抗ígenos contra *T. cruzi* se torna muito promissora. Esse tipo de vacina utilizando BCG, de forma atenuada, já é amplamente usada para a prevenção de tuberculose, funciona bem para esse papel devido a sua segurança, estabilidade, custo eficiência, fácil administração e fortes propriedades como adjuvante (Tanner and McShane, 2020).

Como forma de induzir uma resposta imune mais efetiva, este estudo utilizou de estratégias similares ao Bontempi et al. (2020), porém com uma vacina de *M. bovis* BCG Pasteur expressando fragmentos das proteínas ASP-2 e Tc24 do *T. cruzi* como抗ígeno. A escolha das proteínas deve-se ao fato de ambas serem conservadas entre diversas cepas do parasita (Arnal et al., 2020). No entanto, a ASP-2 é predominantemente expressa durante a fase amastigota, se tornando um bom alvo durante a fase intracelular do parasita (Silveira et al., 2008). Por outro lado, a Tc24 apresenta expressão em diversos estágios do ciclo de vida do parasita e demonstrou, em estudos anteriores, a capacidade de reduzir a parasitemia e os danos aos tecidos (Dumontel et al., 2020).

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a resposta imune induzida pela vacina recombinante BCG expressando as proteínas ASP-2 e Tc24.

### 2. METODOLOGIA

Os genes *asp-2* e *tc24* foram ligados ao vetor pUS977 (Dellagostin et al., 1993) e pAE (Ramos et al. 2004). Os plasmídeos recombinantes pUS977/*asp-2* e pUS977/*tc24* foram transformadas em células eletrocompetentes de *M. bovis* BCG

Pasteur, como descrito por Leal et al. (2018). Em paralelo, os plasmídeos recombinantes pAE/asp-2 e pAE/tc24 foram transformados em células de *E. coli* BL21 (DE3) Star para a expressão, e posterior purificação das proteínas rASP2 e rTC24. A avaliação da expressão de proteína em rBCG foi seguida a metodologia descrita por Leal et al. (2018) utilizando um soro policlonal previamente produzido por camundongos Balb/c fêmeas com as proteínas recombinantes rASP-2 e rTC24.

O ensaio de imunização foi feito com 40 camundongos Balb/c fêmeas com idade entre 6 a 8 semanas, em 4 grupos: Grupo 1 (G1) - com 0,9% de solução salina; Grupo 2 (G2) -  $10^7$  CFU BCG Pasteur; Grupo 3 (G3) -  $10^7$  CFU rBCG/ pUS977/ASP-2 e Grupo 4 (G4) -  $10^7$  CFU rBCG/ pUS977/TC24. Cada grupo recebeu 2 doses vacinais contendo 100  $\mu$ L de forma subcutânea, com um intervalo de 21 dias entre as doses. Foram feitas 3 coletas de sangue, nos dias 0, 21 e 42. A resposta imune humoral foi avaliada por meio de ELISA indireto, utilizando placas de 96 poços sensibilizadas com as proteínas rASP-2 ou rTC24.

Para a avaliação de resposta imune celular, os camundongos foram eutanasiados, os esplenócitos foram cultivados em meio RPMI. Conforme o seu grupo experimental, as células foram estimuladas e os esplenócitos serão usados para a extração do RNA total com Trizol (Invitrogen), seguindo a metodologia do fabricante. Utilizando 1  $\mu$ g de RNA total, a síntese de cDNA será realizada através do High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Através de PCR em tempo real utilizando Stratagene Mx3005P Real Time PCR System (Agilent Technologies) e o reagente Syber Green (Applied Biosystems) seguindo as recomendações do fabricante, o cDNA será usado para quantificação da expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, e IL-17. As análises estatísticas foram feitas utilizando GraphPad Prism 7.0 e a diferença entre os níveis de IgG e citocinas em diferentes grupos foram analisadas por ANOVA de unidirecional seguido por pós teste de Tukey.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A confirmação da identidade das proteínas recombinantes foi feita por Western blotting utilizando o anticorpo monoclonal anti-histidina. Como o esperado, foi possível observar uma banda com o tamanho aproximado de 50 kDa (ASP-2; Fig. 1a) e outra banda de aproximadamente de 25 kDa (Tc24; Fig 1b). A confirmação da expressão das proteínas em BCG recombinante, foi feita por Western blotting utilizando o soro policlonal anti-rASP-2 (Fig 2A) ou anti-rTC24 (Fig 2B).

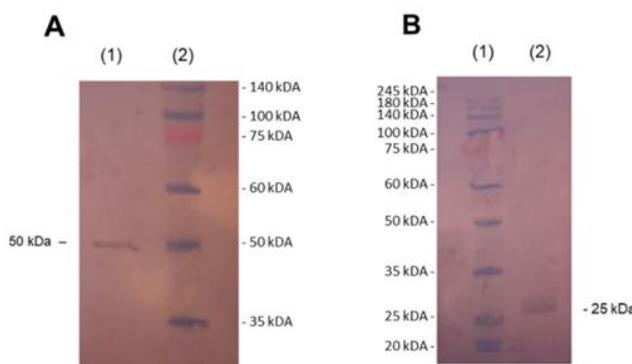


Fig. 1. Confirmação da expressão das proteínas ASP-2 e Tc24 através da técnica de Western blotting utilizando anticorpo monoclonal anti-6x His tag (Sigma Aldrich).

A: (1) rASP-2 purificada; (2) Marcador de peso molecular. B: (1) Marcador de peso molecular; (2) rTC24.

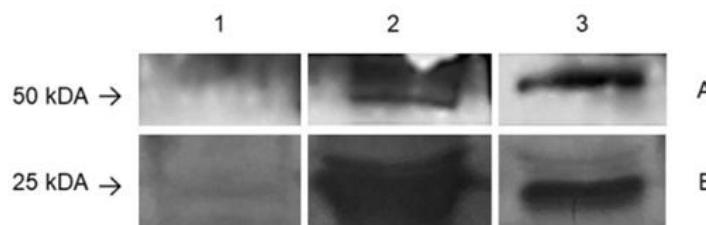


Fig. 2. Teste de Western blotting feito para confirmação da expressão em rBCG usando: (A) Anti-rASP-2: (1) rASP-2 purificada; (2) BCG Pasteur não transformada; (3) rBCG /pUS977/ASP-2. (B) Anti-rTC24: (1) rTC24 purificada; (2) BCG Pasteur não transformada; (3) rBCG /pUS977/TC24.

Em relação a resposta imune humoral (Fig. 3) não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos vacinais, como já demonstrado em estudos prévios (Bontempi et al. 2020). O resultado da análise de resposta imune celular está ilustrado na figura 4. Todos os grupos vacinados apresentaram um aumento na interleucina-4 (IL-4), que apesar de não possuir um papel claro na doença de chagas, normalmente está associado a susceptibilidade a infecções e a respostas do tipo Th-2, e na interleucina-10 (IL-10), que possui papel fundamental na prevenção de respostas imunológicas patológicas durante a infecção por *T.cruzi*. Além disso, o grupo 3 exibiu uma grande indução de IFN- $\gamma$ , que possui função crítica pró-inflamatória no gerenciamento de infecções (Azevedo et al., 2018). Por outro lado, o grupo 4 apresentou uma grande indução de interleucina-17 (IL-17), que é crucial para a sobrevivência das células T CD8 específicas para parasitas, sendo relacionada a redução dos sintomas de cardiomiopatia (Sousa et al., 2017; Guedes et al., 2012).

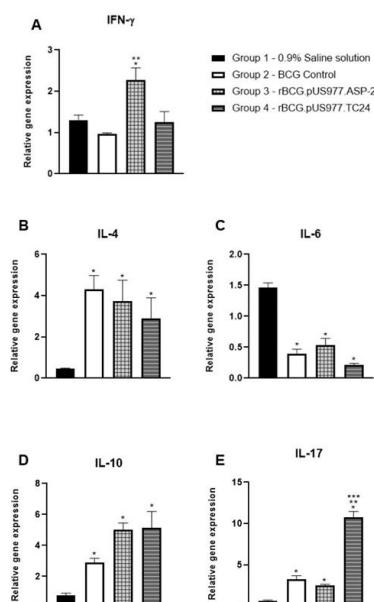


Fig. 4. Níveis de citocinas induzidas pelas formulações vacinais nos camundongos após 42 dias de experimento.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostraram o significativo potencial imunogênico do BCG recombinante expressando as proteínas ASP-2 e TC24, apesar dos baixos níveis de antígeno expresso, caracterizado pela alta indução de citocinas específicas. Para futuros experimentos é necessário maior caracterização das formulações vacinais, especialmente quanto a eficiência contra diferentes cepas virulentas de *T.cruzi*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bontempi, I., Leal, K., Prochetto, E., Díaz, G., Cabrera, G., Bortolotti, A., Morbidoni, H.R., Borsuk, S., Dellagostin, O., Marcipar, I., 2020. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG is a promising platform to develop vaccines against *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 201, 306–316. <https://doi.org/10.1111/cei.13469>.
- Dellagostin, O.A., Wall, S., Norman, E., O'Shaughnessy, T., Dale, J.W., McFadden, J., 1993. Construction and use of integrative vectors to express foreign genes in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 10, 983–993. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00970.x>.
- Dumonteil, E., Elmayan, A., Majeau, A., Tu, W., Duhon, B., Marx, P., Wolfson, W., Balsamo, G., Herrera, C., 2020. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* parasites infecting dogs in southern Louisiana sheds light on parasite transmission cycles and serological diagnostic performance. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14 (12), e0008932. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008932>.
- Leal, K.S., De Oliveira Silva, M.T., De Fátima Silva Rezende, A., Bezerra, F.S.B., Begnini, K., Seixas, F., Collares, T., Dellagostin, O., Portela, R.W., De Carvalho Azevedo, V.A., Borsuk, S., 2018. Recombinant *M. bovis* BCG expressing the PLD protein promotes survival in mice challenged with a *C. pseudotuberculosis* virulent strain. *Vaccine* 36, 3578–3583. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.049>.
- Silveira, E.L.V., Claser, C., Haolla, F.A.B., Zanella, L.G., Rodrigues, M.M., 2008. Novel protective antigens expressed by *Trypanosoma cruzi* amastigotes provide immunity to mice highly susceptible to Chagas' disease. *Clin. Vaccine Immunol* 15, 1292–1300. <https://doi.org/10.1128/CVI.00142-08>.
- Tanner, R., McShane, H., 2020. BCG and other vaccines. In: Friedman, L.N., Dedicoat, M., Davies, P.D.O. (Eds.), *Clinical Tuberculosis*, 6th edition. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 217–233. <https://doi.org/10.1201/9781351249980-12>. CRC Press2020.