

Construção do Vetor Recombinante pUS2000/Quimera para Expressão em *Mycobacterium bovis* BCG

JOÃO VICTOR FERNANDES MARCOS¹; RAFFAELA DE HOLLEBEN CAMOZZATO BENETTI²; SUZANA LEMKE LANIUS³; FERNANDA SEVERO SOUSA; LAURA GOMES⁵; FABIANA KOMMLING SEIXAS⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – marcosvictorjoao5@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – raffaella.cbenetti@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – suzana.l.lanius@gmail.com

⁴Universidade Federal de pelotas – fernandassabedra@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – laura@radiologue.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – fabianak@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de câncer de pele com alta taxa de metástase, o que torna essa neoplasia altamente agressiva quando não diagnosticada em estágios iniciais (PATEL, H. et al., 2020). De acordo com Instituto Nacional de Câncer (INCA), 8.980 novos casos de melanoma são esperados anualmente durante o triênio de 2023, 2024 e 2025. Os métodos tradicionais de terapias para essa doença incluem a remoção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia (SWITZER, B. et al., 2022). Entretanto, novas terapias devem ser desenvolvidas buscando uma alternativa mais eficaz, personalizada e segura para esse tipo de tumor.

Algumas destas terapias inovadoras são a imunoterapia e a terapia alvo, que consiste na escolha de um alvo molecular presente no câncer para ser utilizado como antígeno em abordagens terapêuticas, sendo capaz de modular o sistema imunológico do próprio paciente (GHMERNAWI et al., 2024). Os genes codificantes das proteínas ACRBP (Acrosin-binding protein) e SYCP1 (Synaptonemal Complex protein 1) são expressos em condições normais e desempenham papéis importantes, como a estabilização da enzima acrosina que garante a penetração do espermatozóide no óvulo, como é o caso do ACRBP, além da formação do complexo sinaptonêmico, estrutura vital para a divisão de células germinativas permitindo a correta segregação dos cromossomos homólogos durante o crossing-over (SYCP1) (VILAGRAN et al., 2013; WHITEHURST et al., 2010).

Nesse sentido, diversos estudos apontam alta expressão desses genes em diferentes tumores, como no câncer de mama e melanoma (KAZEMI-OULA et al., 2015; SAFAVI, A., 2020; SAFAVI, A., 2019), caracterizando-os como CTA'S (Cancer-Testis Antigens). Os CTA'S compreendem genes expressos normalmente em células reprodutivas saudáveis e de forma anormal no câncer (GORDEEVA, O., 2018). O ACRBP quando reativado no câncer não encontra a acrosina e assume outros papéis, como auxiliando na estabilização do fuso mitótico, dando continuidade a proliferação celular (WHITEHURST et al., 2010). Por outro lado, o SYCP1 tem sua função amplamente debatida e sabe-se que seu papel original é importante para meiose e que em função de instabilidade epigenética este é reativado e representa um alvo promissor capaz de estimular o sistema imune, dado que células somáticas não o expressam em condições normais (DE VRIES et al., 2005).

O *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) é tradicionalmente utilizado na vacinação contra a tuberculose e também é aprovado para o tratamento do

câncer de bexiga não invasivo muscular, devido à sua capacidade de induzir uma resposta imune robusta envolvendo macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e células natural killer (NK) (CHEN, G. et al., 2023). Essa propriedade imunomoduladora motivou o desenvolvimento do BCG recombinante (rBCG), geneticamente modificado para expressar antígenos associados a tumores, como ACRBP e SYCP1. Assim, o objetivo deste trabalho foi construir um plasmídeo recombinante pUS2000 contendo a quimera (ACRBP-SYCP1) e utilizá-lo para gerar uma cepa recombinante de BCG (rBCG), para estudos pré-clínicos de modulação da resposta imune no melanoma.

2. METODOLOGIA

2.1. Construção *in silico* da quimera.

As moléculas alvo (SYCP1 e ACRBP) foram selecionadas e suas sequências nucleotídicas obtidas através do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para construção da quimera. A partir dessas sequências, o gene sintético foi desenhado utilizando o software *Vector NTI 11 (Invitrogen™)*. Sítios de restrição enzimáticos (*XbaI* e *HindIII*) foram adicionados nas extremidades 5' e 3' das sequências, permitindo a clonagem no vetor de expressão (pUS2000).

2.2. Construção do plasmídeo recombinante

O gene sintético, previamente sintetizado no vetor pUC19, e o plasmídeo pUS2000 foram ambos digeridos com as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII*. Em seguida, o inserto foi ligado ao pUS2000 utilizando a enzima DNA ligase. A construção recombinante obtida foi introduzida em células *E. coli* TOP10 por eletroporação. As colônias transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido suplementado com canamicina e incubadas a 37 °C por 16 horas. Posteriormente, os plasmídeos recombinantes foram extraídos, submetidos a digestão de verificação e analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, confirmando o perfil esperado da construção.

2.3. Construção do rBCG

Após a obtenção e propagação do plasmídeo recombinante pUS2000/Quimera, foi realizada a transformação da cepa selvagem de *Mycobacterium Bovis* (BCG Pasteur). O rBCG foi mantido em 7H9 (líquido) ou 7H10 (sólido) com suplementação de OADC (*Oleic Albumin Dextrose Catalase*), além de suplementação com o antibiótico canamicina (50mg/mL) quando necessário. A expressão gênica da quimera será avaliada por RT-qPCR, permitindo confirmar a transcrição dos genes de interesse.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Plasmídeo recombinante pUS2000/Quimera

O design de cada plasmídeo realizado através de ferramentas de bioinformática é pensado para otimizar a clonagem do gene de interesse e garantir que a proteína em questão seja expressa de forma eficiente (GUARENTE, L. et al., 1980). Além da sequência de nucleotídeos do gene de interesse, também existem sítios de restrição enzimática para *Hind III* e *Xba I*, estas enzimas realizam o corte da dupla-fita, liberando as extremidades para que a sequência do gene possa ser integrada a construção por meio de suas extremidades complementares. Por fim, o gene de resistência ao antibiótico canamicina foi inserido para auxiliar na identificação dos clones recombinantes (Figura 1).

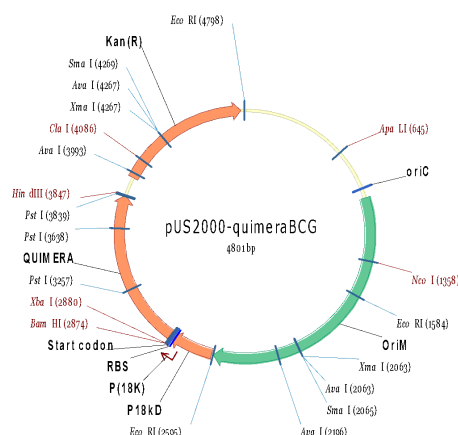


Figura 1. Gene sintético projetado no software Vector NTI 11 (Invitrogen™) inserido em vetor de expressão para BCG, pUS2000.

3.2. Confirmação do plasmídeo e BCG recombinantes

Após as etapas de clonagem, subclonagem do gene e inserção no vetor pUS2000, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar a presença da construção nas cepas de *E. coli* TOP10, utilizadas para a propagação do plasmídeo recombinante. A análise revelou, nas amostras 1 e 2, uma banda correspondente a aproximadamente 960 pb, confirmando a inserção do gene sintético e, consequentemente, a presença da quimera no plasmídeo recombinante (Figura 2).

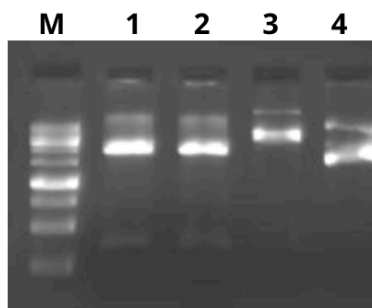


Figura 2. Corrida de eletroforese em gel de agarose 1%. (M) marcador de peso molecular; (1) pUS2000/Quimera digerido; (2) pUS2000/Quimera digerido; (3) pUS2000 digerido; (4) pUS2000 não digerido.

Além disso, a RT-qPCR permitiu detectar a expressão gênica dos transcritos correspondentes às proteínas da quimera, confirmando o sucesso na construção do rBCG (Figura 3). O presente estudo representa a fase inicial de um estudo que abrange futuros testes *in vitro* e *in vivo* (modelo animal camundongo).

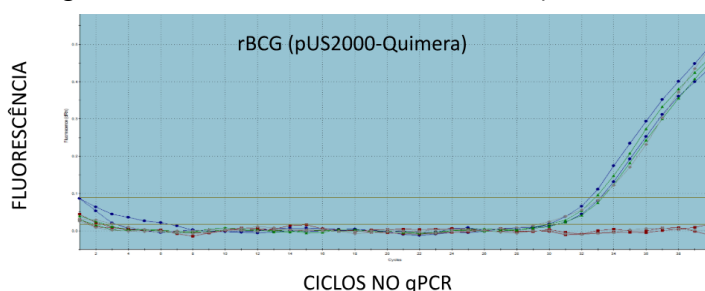


Figura 3. Gráfico gerado após RT-qPCR.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a construção da nova cepa de rBCG foi efetivamente obtida, possibilitando a realização de testes pré-clínicos. Dessa forma, estudos adicionais serão conduzidos visando compreender de maneira mais abrangente a modulação da resposta imune

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN J, GAO L, WU X, FAN Y, LIU M, PENG L, SONG J, LI B, LIU A & BAO F. 2023. BCG-induced trained immunity: history, mechanisms and potential applications. **J Transl Med**. F., DE BOER, E., VAN DEN BOSCH, M., BAAREND, W., OOMS, M., YUAN, L., LIU, J., VAN ZEELAND, A., HEYTING, C., & PASTINK, A. (2005). Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. **Genes & development**, 19 11, 1376-89 . <https://doi.org/10.1101/GAD.329705>.
- GUARENTE L, LAUER G, ROBERTS TM, PTASHNE M. Improved methods for maximizing expression of a cloned gene: a bacterium that synthesizes rabbit beta-globin. **Cell**. 1980 Jun;20(2):543-53. doi: 10.1016/0092-8674(80)90640-6. PMID: 6248249.
- GORDEEVA, O. (2018). Cancer-testis antigens: Unique cancer stem cell biomarkers and targets for cancer therapy. **Seminars in cancer biology**, 53, 75-89 . <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.08.006>.
- KAZEMI-OUA G, GHAFOURI-FARD S, MOBASHERI MB, GERANPAYEH L & MODARRESSI MH. 2015. Upregulation of RHOXF2 and ODF4 Expression in Breast Cancer Tissues Citation: Kazemi-Oula G, Ghafouri-Fard S, Mobasher MB, Geranpayeh L, Modarressi MH. Upregulation of RHOXF2 and ODF4 expression in breast cancer tissues. **Cell Journal(Yakhteh)** 17.
- PATEL, H.; YACOUN, N.; MISHRA, R.; WHITE, A.; YUAN, L.; ALANAZI, S.; GARRETT, J. Current Advances in the Treatment of BRAF-Mutant Melanoma. **Cancers**, v. 12, 2020. <https://doi.org/10.3390/cancers12020482>.
- SAFAVI A, KEFAYAT A, SOTOODEHNEJADNEMATALAHI F, SALEHI M & MODARRESSI MH. 2019. Production, purification, and in vivo evaluation of a novel multiepitope peptide vaccine consisted of immunodominant epitopes of SYCP1 and ACRBP antigens as a prophylactic melanoma vaccine. **Int Immunopharmacol** 76.
- SAFAVI, A.; KEFAYAT, A.; MAHDEVAR, E.; GHAHREMANI, F.; NEZAFAT, N.; MODARRESSI, M. Efficacy of co-immunization with the DNA and peptide vaccines containing SYCP1 and ACRBP epitopes in a murine triple-negative breast cancer model. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 17, p. 22-34, 2020. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1763693>.
- SWITZER, B.; PUZANOV, I.; SKITZKI, J.; HAMAD, L.; ERNSTOFF, M. Managing Metastatic Melanoma in 2022: A Clinical Review. **JCO Oncology Practice**, OP2100686, 2022. <https://doi.org/10.1200/OP.21.00686>.
- VILAGRAN I, CASTILLO J, BONET S, SANCHO S, YESTE M, ESTANYOL JM & OLIVA R. 2013. Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. **Theriogenology** 80: 443–450.
- WHITEHURST, A., Xie, Y., Purinton, S., Cappell, K., Swanik, J., Larson, B., Girard, L., Schorge, J., & White, M. (2010). Tumor antigen acrosin binding protein normalizes mitotic spindle function to promote cancer cell proliferation. **Cancer research**, 70 19, 7652-61 . <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0840>.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS. *Guia de Propriedade Intelectual*. Versão 4.0. Pelotas: UFPEL, 2018.