

UTILIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ASP-2 e TC24 ASSOCIADAS COMO ESTRATÉGIA VACINAL CONTRA A DOENÇA DE CHAGAS

FERNANDA KANAAN DE AZAMBUJA¹; BARBARA DA ROCHA FONSECA²;
GUILHERME SENNA DOS SANTOS²; GUSTAVO DOS SANTOS HARTLEBEN²;
LUIZA DOMINGUES MORON²; SIBELE BORSUK³

¹Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – nandakanaan_02@hotmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – barbfonseca@hotmail.com

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – gsennasantos@gmail.com

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

²Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária; CDTec, UFPel – moronluiza@gmail.com

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

1. DESCRIÇÃO DA INOVAÇÃO

A Doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, consiste em uma infecção parasitária crônica e sistêmica causada pelo protozoário flagelado, da família Trypanosomatidae, *Trypanosoma cruzi* (GALVÃO, 2014). Estima-se que a DC afeta cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada (FONSECA et al., 2020). A forma clássica de transmissão da DC se dá de forma vetorial através de insetos triatomíneos (RASSI et al., 2010). Entretanto, na última década, o Brasil apresentou aumento de casos de infecção de forma oral, através da ingestão de alimentos contaminados, destacando-se o açaí e a cana de açúcar (JANSEN et al., 2018).

A prevalência da DC no Brasil varia de acordo com a região. A Sociedade Brasileira de Cardiologia estima que 1,2 milhões de pessoas estejam infectadas com o parasito, principalmente em regiões rurais e populações mais pobres (MARIN-NETO et al., 2023). Quando a infecção por *T. cruzi* se estabelece, a DC pode ser dividida em três fases distintas: aguda, indeterminada e crônica (GUARNER, 2019). A fase aguda apresenta-se altamente parasitária e caracteriza o início da infecção podendo durar de semanas a meses (RASSI et al., 2010). Predominantemente, com a atuação do sistema imunológico, os níveis de parasitemia tornam-se estáveis e há ausência de sinais clínicos, sendo esta fase chamada de indeterminada (ROMAN-CAMPOS et al., 2024). Em torno de 30% a 40% dos casos evoluem para a fase crônica, no qual caracteriza-se por complicações no sistema cardiovascular e no trato gastrointestinal. Contudo, há possibilidade de permanecer sem sintomas e sem desenvolvimento de anormalidades (BONNEY et al., 2019).

O tratamento antiparasitário é crucial para o controle da doença (SWETT et al., 2024). Todavia, a escolha do método terapêutico está diretamente relacionada com a fase em que a doença se encontra (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019). Os fármacos Nifurtimox e Benznidazol são considerados base deste tratamento, embora apresentem níveis de segurança questionáveis e eficácia que diminui ao longo da infecção (PÉREZ-MOLINA & MOLINA, 2018). Desse modo, o desenvolvimento de medidas profiláticas para DC é de grande importância, destacando-se as vacinas (WHO, 2020).

Diversas estratégias vacinais experimentais já foram testadas, porém nenhuma chegou ao estágio de estudo clínico (BEAUMIER et al., 2016). A metodologia de vacinas de subunidade vem ganhando destaque nessa linha de pesquisa, visto que apresentam maior segurança e alta imunogenicidade (BIVONA et al., 2020). Dentre os alvos vacinais descritos na literatura, sobressaem-se as proteínas TC24 e ASP-2, ambas consideradas promissoras quanto à sua imunogenicidade (GUNTER et al., 2018; RIBEIRO et al., 2019). A proteína flagelar de ligação ao cálcio de 24 kDa (TC24) apresenta capacidade imunomoduladora, promovendo aumento na produção de IFN- γ (DUMONTEIL et al., 2020). Ademais, a proteína de superfície de amastigota nº 2 (ASP-2), segundo RIBEIRO et al., 2019 atua no recrutamento de células T citotóxicas CD8+.

Em vista disso, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma vacina de subunidade recombinante para a DC associando as proteínas recombinantes TC24 e ASP-2.

2. ANÁLISE DE MERCADO

Estima-se que indivíduos infectados com o parasito apresentam um custo superior a 600 milhões de dólares por ano na América Latina, relativos a gastos médicos, hospitalizações e compras de medicamentos para o tratamento da DC. Além disso, estes enfermos expressam uma perda estimada de 750.000 anos de vida produtiva e um impacto econômico de 1,2 milhões de dólares (LEE et al., 2010). Dessa forma, o estudo de LEE et al., 2012 sugere que a produção de uma vacina terapêutica contra DC apresenta uma perspectiva de custo-benefício, sinalizando um retorno financeiro a longo prazo (LEE et al., 2012).

Ademais, o desenvolvimento de uma estratégia vacinal terapêutica para DC apresenta potencial para melhorar e, talvez, substituir o tratamento atual da doença, visto que este apresenta diversos efeitos colaterais e é considerado uma estratégia de tratamento de longo prazo (BIVONA et al., 2020). Desse modo, encontrar novas abordagens para controle da DC demonstra vantagens à saúde pública, bem como em termos econômicos (BARTSCH et al., 2018).

3. ESTRATÉGIA DE DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO

Para o desenvolvimento deste produto, as proteínas rTC24 e rASP-2 foram expressas em cepa BL21 Star de *E. coli*, cultivadas em meio Luria Bertani (LB) sólido, por 16 h a 37° C. Ao atingir a densidade óptica desejada (entre 0,6 e 0,8) foi realizada a indução da expressão utilizando Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 1 mM. As proteínas recombinantes obtidas foram então purificadas através de cromatografia de afinidade ao níquel, em coluna de Sepharose HisTRAP (GE) e, posteriormente, suas respectivas identidades foram confirmadas através da técnica de *Western Blot*.

A imunização, para posterior avaliação da produção de anticorpos, foi realizada em camundongos Balb/c, alocados em 4 grupos de 10 animais, sendo: Grupo A: Solução salina 0,9 % (Controle); Grupo B: proteína recombinante rTC24 + hidróxido de alumínio; Grupo C: proteína recombinante rASP-2 + adjuvante hidróxido de alumínio; Grupo D: proteína recombinante rTC24 + proteína recombinante rASP-2 + adjuvante hidróxido de alumínio. Foram realizadas duas doses vacinais, de forma subcutânea, com intervalo de 21 dias. Ademais realizou-se coleta de sangue nos dias 0 (anterior a imunização), 21 (após a primeira dose) e 42 (após a segunda dose) do experimento. Todos os

experimentos com animais foram previamente aprovados pelo Comitê no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas (CEUA-UFPeI), sob número de protocolo 23110.031479/2021-17.

Para avaliação da resposta imune humoral, foi realizado teste de ELISA indireto para identificação da produção de IgG para cada proteína. Nesse ensaio, as sensibilizações foram feitas de acordo com as proteínas utilizadas pelos grupos experimentais, sendo Grupos A, B e D com a proteína rTC24 e Grupos A, C e D com a proteína rASP-2. Posteriormente, as análises estatísticas foram realizadas através de análise unidirecional de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey, utilizando o Software GraphPad Prism 7.0, sendo o valor de $p < 0,05$ definido como parâmetro de diferença estatística.

A partir dos resultados obtidos, foi possível desenvolver uma patente que atualmente está depositada no INPI (BR 10 2024 017417 8). Esta refere-se a uma patente de inovação intitulada “Associação de proteínas recombinantes rASP-2 e rTC24 como estratégia vacinal contra a doença de chagas”.

4. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO

Ao avaliar os níveis de produção de IgG, através de ELISA indireto, foi possível observar um aumento considerável na produção de anticorpos no grupo imunizado com a associação das proteínas (Grupo D), quando comparado com o grupo controle e com os grupos imunizados com as proteínas isoladas. A figura 1A representa os níveis de anticorpos IgG anti-TC24. Nota-se que a proteína isolada (Grupo B), apresenta aumento na produção de IgG a partir do dia 21, níveis superados no dia 42, em decorrência da segunda dose. Contudo, o grupo da associação das proteínas (Grupo D) também apresentou produção elevada de anticorpos no dia 21, com significativo aumento desses níveis no dia 42, superando a produção encontrada pela proteína isolada.

A figura 1B demonstra os níveis de anticorpos IgG anti-ASP-2 e é possível observar que o grupo contendo a proteína isolada (Grupo C) não apresentou efeito significativo na produção de anticorpos no dia 21 em comparação ao grupo controle, observando aumento apenas pelo dia 42. O mesmo padrão foi observado pelo grupo da associação (Grupo D), no qual o nível de anticorpos produzidos no dia 42 foi superior quando comparado ao grupo utilizando a proteína de forma isolada.

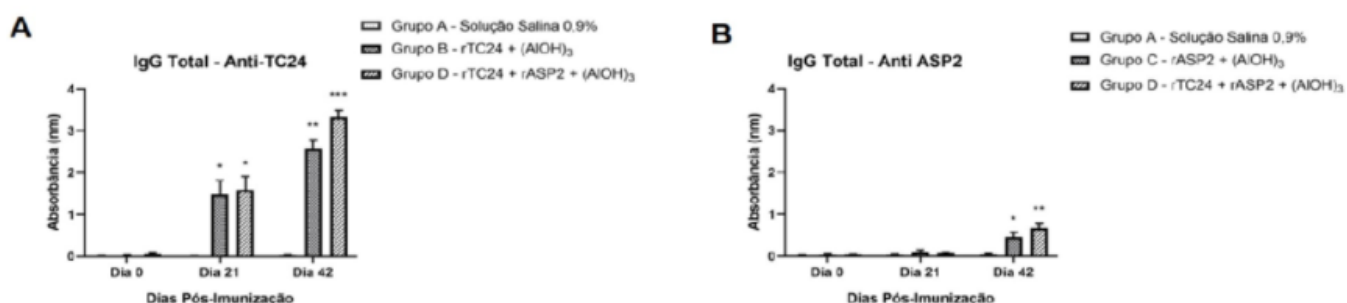


Figura 1. Determinação dos níveis de IgG total produzido contra rTC24 e rASP-2 nos dias 0 (não imunizados), 21 (primeira dose vacinal) e 42 (segunda dose vacinal).

5. CONCLUSÕES

A associação das proteínas rTC24 e rASP-2 demonstrou-se vantajosa em uma formulação vacinal contra DC, apresentando produção de níveis significativos de anticorpos IgG de forma específica para cada proteína, destacando-se a proteína recombinante TC24. Esse aumento de produção de anticorpos é observado quando comparado ao grupo controle e aos grupos contendo as proteínas isoladas. Sobretudo, no dia 42 os níveis foram superados devido a imunização com a segunda dose da vacina.

Além disso, quando observamos a proteína rASP-2 isolada, nota-se que a produção de anticorpos apresenta aumento significativo, entretanto, quando comparado à proteína rTC24 os níveis foram mais baixos. Contudo, ao associarmos ambas as proteínas observa-se um efeito sinérgico, impulsionando a produção de anticorpos, sugerindo assim o benefício de desenvolver uma vacina utilizando tais proteínas, de diferentes fases do parasito, associadas visando ampliar a resposta imune humoral produzida por estes modelos murinos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIVONA, A.E., ALBERTI, A.S., CERNY, N., TRINITARIO, S.N. & MALCHIODI, E.L. (2020). Chagas disease vaccine design: the search for an efficient *Trypanosoma cruzi* immune-mediated control. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 1866(5).
- DUMONTEIL, E., HERRERA, C., TU, W., GOFF, K., FAHLBERG, M., HAUPT, E., KAUR, A., MARX, P.A., ORTEGA-LOPEZ, J., HOTEZ, P.J. & BOTTAZZI, M.E. (2020). Safety and immunogenicity of a recombinant vaccine against *Trypanosoma cruzi* in Rhesus macaques. *Vaccine*. 38(29). p. 4584–4591.
- FONSECA, B. DE P., ALBUQUERQUE, P.C. & ZICKER, F. (2020). Neglected tropical diseases in Brazil: lack of correlation between disease burden, research funding and output. *Tropical Medicine and International Health*. 25(11). p. 1373–1384.
- GUARNER, J. (2019). Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 36(3). p. 164–169.
- GUNTER, S.M., VERSTEEG, L., JONES, K.M., KEEGAN, B.P., STRYCH, U., BOTTAZZI, M.E., HOTEZ, P.J. & BROWN, E.L. (2018). Covalent vaccination with *Trypanosoma cruzi* Tc24 induces catalytic antibody production. *Parasite Immunology*. 40(11).
- LEE, B.Y., BACON, K.M., CONNOR, D.L., WILLIG, A.M. & BAILEY, R.R. (2010). The potential economic value of a *Trypanosoma cruzi* (chagas disease) vaccine in Latin America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 4(12). p. 1–8.
- MARIN-NETO, J.A., RASSI, A., OLIVEIRA, G.M.M., CORREIA, L.C.L., RAMOS, A.N., LUQUETTI, A.O., HASSLOCHER MORENO, A.M., DE SOUSA, A.S., DE PAOLA, A.A.V., SOUSA, A.C.S., RIBEIRO, A.L.P., FILHO, D.C., DE SOUZA, D.D.S.M., CUNHA-NETO, E., RAMIRES, F.J.A., BACAL, F., NUNES, M.D.C.P., FILHO, M.M., SCANAVACCA, M.I., ET AL. (2023). SBC Guideline on the Diagnosis and Treatment of Patients with Cardiomyopathy of Chagas Disease – 2023. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 120(6).
- PÉREZ-MOLINA, J.A. & MOLINA, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*. 391(10115). p. 82–94.
- RASSI, A., RASSI, A. & MARIN-NETO, J.A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*. 375(9723). p. 1388–1402.
- RIBEIRO, F.A.P., PONTES, C., GAZZINELLI, R.T., ROMERO, O.B., LAZZARIN, M.C., DOS SANTOS, J.F., DE OLIVEIRA, F., PISANI, L.P., DE VASCONCELOS, J.R.C. & RIBEIRO, D.A. (2019). Therapeutic effects of vaccine derived from amastigote surface protein-2 (ASP-2) against Chagas disease in mouse liver. *Cytokine*. 113. p. 285–290