

AVANCES EN EL DESARROLLO DE NUEVAS VACUNAS CONTRA *Fasciola hepatica*

Advances in the Development of New Vaccines against Fasciola hepatica

Darío PERALLÓN MANTAS; Javier SÁNCHEZ MONTEJO; Antonio MURO ÁLVAREZ
Grupo de Enfermedades Infecciosas y Tropicales (e-INTRO). Instituto de
Investigaciones Biomédicas de Salamanca-Centro de Investigación de Enfermedades
Tropicales de la Universidad de Salamanca (IBSAL-CIETUS). Facultad de Farmacia.
Universidad de Salamanca. 37008 Salamanca, España.
ama@usal.es

RESUMEN: La fasciolosis es una zoonosis provocada por el trematodo *Fasciola hepatica* que afecta ampliamente al sector ganadero. Sin embargo, aún no se ha desarrollado una vacuna eficaz para evitar el contagio de este parásito.

En este trabajo se ha empleado la tecnología del ácido ribonucleico mensajero para desarrollar un transcrito de una proteína recombinante de *Fasciola hepatica* que podrá emplearse para completar la formulación de una posible vacuna.

Gracias al uso de plásmidos como vectores de clonación de la secuencia de nuestra proteína antigénica de interés, en el estudio transformaremos en cultivos bacterianos dicha proteína para su posterior transcripción.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*; vacuna; clonación; ARNm.

ABSTRACT: Fasciolosis is a zoonosis caused by the trematode *Fasciola hepatica* that widely affects the livestock sector. However, an effective vaccine has not yet been developed to prevent the spread of this parasite.

In this work, messenger ribonucleic acid technology has been used to develop a transcript of a recombinant protein of *Fasciola hepatica* that can be used to complete the formulation of a possible vaccine.

Thanks to the use of plasmids as cloning vectors of the sequence of our antigenic protein of interest, in the study we will transform this protein into bacterial cultures for later transcription.

Keywords: *Fasciola hepatica*; vaccine; cloning; mRNA.

1. INTRODUCCIÓN

Fasciola hepatica es un parásito del orden *Digenea* que pertenece a la clase *Trematoda*. Presenta una amplia distribución mundial y provoca importantes pérdidas económicas en el sector ganadero (Mas-Coma *et al.*, 2009). Al ser una zoonosis afecta también a las personas, siendo prevalente en algunos países del mundo (Howell *et al.*, 2015).

El estudio del proteoma del parásito nos permite identificar proteínas importantes para su supervivencia. Las FABP (*Fatty Acids Binding Proteins*) constituyen una familia multigénica de proteínas cuya función está asociada al transporte de ácidos grasos al interior del parásito. Algunas FABP nativas que se han empleado como antígenos vacunales, como Fh12, tienen el inconveniente de que son de difícil extracción del parásito (CDC, 2022). La solución ha sido el diseño de alternativas recombinantes, como Fh15, que ha demostrado en estudios previos una reducción del 76 % de trematodos en conejos infectados experimentalmente con *F. hepatica*, empleando el adyuvante de Freund (Muro *et al.*, 1997). Además, Fh15 ha demostrado protección cruzada contra *Schistosoma bovis* (López-Abán *et al.*, 2007).

Las vacunas de ARN mensajero (ARNm) son de reciente descubrimiento y están demostrando prometedores resultados. Instruyen a la célula para que cree en sus ribosomas proteínas que actuarán como antígenos vacunales, desencadenando respuesta inmunológica que lo neutralizará y generará memoria inmunológica (Deng *et al.*, 2022).

Para conseguir grandes cantidades de ARNm, habitualmente la secuencia de la proteína de interés se clona en un plásmido de ADN con un promotor de ARN polimerasa dependiente de ADN, como T7, aguas arriba a la secuencia de interés (Rong *et al.*, 1998). Además, estas secuencias incluyen regiones no traducidas que aseguran una alta estabilidad y traducibilidad del constructo (Jackson *et al.*, 2020). Tras la clonación, el vector de ADN se linealiza para que sirva de molde para la ARNm polimerasa que genere el transcrito. Posteriormente, el transcrito se encapsula en nanopartículas lipídicas que se inocularán para la inmunización (Zhang *et al.*, 2020).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal es la síntesis de ARNm codificante de la proteína de unión a ácidos grasos de *Fasciola hepatica*, denominada Fh15, como una nueva alternativa vacunal.

Para ello, planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Diseñar un vector de expresión de ARNm mediante herramientas bioinformáticas.
2. Clonar Fh15 en el vector diseñado.
3. Transcribir ARNm de Fh15 *in vitro*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño del vector de ARNm

Se diseñó un vector de expresión de ARNm utilizando los últimos avances en la tecnología ARNm disponibles (Deng *et al.*, 2022; Trepotec *et al.*, 2019). La secuencia se mandó sintetizar al servicio de biología molecular de la empresa NZYTech. Se obtuvo un plásmido de la familia pUC57 (Figura 1).

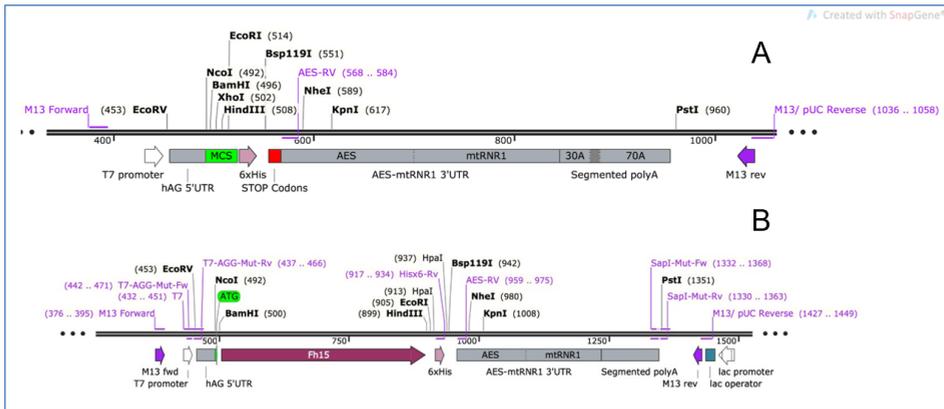


Figura 1: Vector de ARNm diseñado para vehicular la proteína de interés Fh15 (A). Se compone de: promotor T7; región UTR 5' hAG (*Alpha human globlin*) que garantiza una alta actividad de traducción, un MCS (*Multiple cloning site*) donde se incorporará Fh15 (B); una región UTR 3' con la secuencia AES-mtRNR1 que incrementa la estabilidad del ARN, y una cola de PolyA interrumpida por un conector corto (GCAUAU-GACU) que mejora la estabilidad del plásmido en *E. coli* (Deng *et al.*, 2022; Trepotec *et al.*, 2019).

3.2. Cultivos bacterianos

De forma rutinaria todas las cepas fueron cultivadas en el medio LB (*Lisogeny Broth*) (10 g/l peptona tríptica de caseína, 10 g/l NaCl y 5 g/l extracto de levadura, para cultivos líquidos o añadiendo 15 g/l de agar, para cultivos sólidos). Se utilizó ampicilina a 100 µg/ml como selección en las placas suplementadas con antibiótico.

Para la transformación se empleó el medio SOC (*Super Optimal broth + Catabolic repressor*) (20 g/l de peptona tríptica de caseína, 5 g/l de extracto de levadura, 0.58 g/l de NaCl, 0.19 de g/l KCl). Posteriormente se añaden 2 mM de glucosa y 20 mM de Mg⁺ (a partir de una solución 2 M de MgSO₄ y MgCl₂) previamente esterilizados por filtración.

3.3 Clonación de la proteína *Fh15* en el vector de expresión *pUCEXP*

Se utilizaron técnicas de clonación estándar por ligación-restricción. Para ello se emplearon los kits Miniprep y Gelpure (NZYTech) para el aislamiento de plásmidos y purificación de fragmentos del gel, respectivamente. Las enzimas de restricción utilizadas fueron *Speedy NcoI* y *Speedy BamHI* (NZYTech). La ligasa fue *NZYTech T4 DNA ligase*. Todos los procesos fueron realizados según los protocolos establecidos por el fabricante.

3.4. Transformación

Se descongela en hielo un vial de células de *Escherichia coli* competentes con fenotipo DH5α e inmediatamente después se agregan 10 µL de la solución de ligación obtenida anteriormente, mezclando suavemente para evitar rupturas celulares. Se incuban las células en hielo durante 30 minutos y se les aplica un choque térmico durante 40 segundos en termobloque a 42 °C. Se coloca el vial en hielo durante 2 minutos. Después se agregan 0,9 mL de medio SOC a temperatura ambiente y se agita a 225 rpm durante 1 hora a 37 °C. Se siembran 100 µL de las células transformadas en placas de agar LB con 100 µg/ml de ampicilina y se incuban 16 horas a 37 °C.

3.5. Técnicas para evaluar la construcción

3.5.1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Se recogieron 8 colonias de los cultivos de *E. coli* transformadas con el vector de interés y se realiza PCR utilizando el *kit 2x PCR Master Solution (i-Taq)* de iNtRON Biotechnology.

3.5.2. Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo por el “Servicio NUCLEUS: Secuenciación ADN, Genómica y Proteómica de la Universidad de Salamanca” utilizando 300 µg de plásmido y 3,3 pmol de cebador. Se realizó la secuenciación utilizando el siguiente cebador: M13 Forward (GT^TTGTAAAACGACGGCCAGT).

3.6. Electroforesis

Se utilizaron geles de agarosa al 1 %. Para ello 40 mg de agarosa se disolvieron en 40 ml de TBE 0.5x [Tris (Roche) 450 mM ácido bórico (Sigma) 450 mM EDTA (Merck) 10 mM] y se añadieron 2µl de *Greensafe premium* (NZYTech) como agente intercalante. El ensayo se realizó durante 15 minutos a 60 V y 40 minutos más a 120 V.

Como marcador de peso molecular se utilizaron 2 µL de *NZYTech DNA ladder III*. Al resto de muestras se les añadió 1 µL de *NZYTech loading buffer 6x* por cada 5 µL.

Los geles de ARNm se realizaron en cubetas lavadas con inhibidores de ARNasas y se utilizó el marcador *RiboRuler* (Thermofisher). Se utilizaron 4 µL de una solución al 1 % de bromuro de etidio como agente intercalante. Las muestras se desnaturalizaron 10 minutos a 70 °C en presencia del tampón de carga proporcionado con el marcador de peso molecular.

3.7. Transcripción

Se cortó 1 µg de plásmido pUCEXP_Fh15 con la enzima *PstI* a 37 °C durante 15 minutos y se inactivó mediante calor durante 20 minutos a 80 °C. Se purificó el ADN cortado mediante el kit *Gelpure* de NZYTech. Las condiciones de transcripción fueron las establecidas en el kit *NZY T7 High Yield RNA Synthesis*.

A continuación, se incubó a 37 °C durante 2 horas. Se añaden 2 µL de acetato de sodio 3M (Thermofisher) y 60 µL de etanol absoluto a -20 °C, dejando precipitar toda la noche a -80 °C. A la mañana siguiente se centrifuga 30 minutos a máxima velocidad a 4 °C. Se lava con etanol frío al 70 % sin resuspender el pellet. Se retira el etanol y se deja secar, antes de resuspenderlo en 20 µL de agua libre de nucleasas.

4. RESULTADOS

4.1. *Diseño del vector de clonación*

El plásmido diseñado se nombró pUCEXP. Se utilizó 1 μ L de plásmido para transformar la cepa DH5 α . Se recuperaron 6 colonias y se comprobó mediante PCR si contenían el vector, empleando los cebadores *M13 forward* y *AES reverse*.

Las 6 colonias mostraban una banda de aproximadamente 200 pb en la electroforesis de comprobación de la transformación de pUCEXP. Puesto que nuestra PCR debería tener una banda de 209 pb, asumimos que las 6 colonias contienen el vector deseado.

4.2. *Clonaje de la proteína Fh15 en el vector de expresión ARNm*

Se aisló pUCEXP de las colonias recuperadas y se realizó una restricción con las enzimas NcoI y BamHI. También se digirió el inserto Fh15 con dichas enzimas. Se corrió un gel de agarosa con ambas digestiones y se purificaron las bandas correspondientes a 400 pb para Fh15 y 3200 pb para pUCEXP. Se realizó la ligación de ambos fragmentos y 10 μ L de esta se utilizaron para transformar la cepa DH5 α , sembrándose las colonias en agar LB con ampicilina.

Las colonias resultantes del proceso fueron recogidas y comprobadas mediante PCR utilizando los cebadores *M13 forward* y *AES reverse*. Se analizaron 8 colonias, de las cuales 5 tenían la banda deseada (600 pb) y no presentaban ninguna banda no deseada (Figura 2).

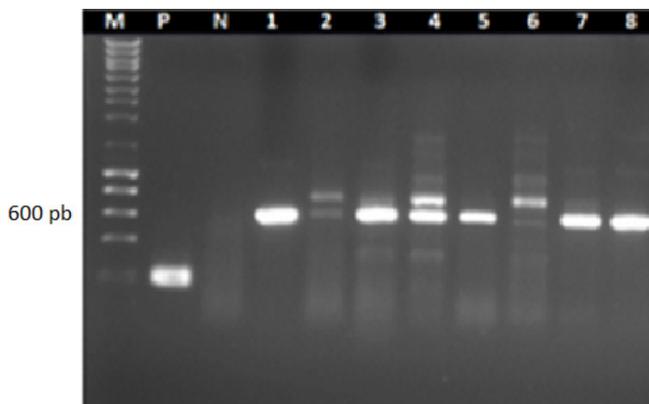


Figura 2. Gel de electroforesis de comprobación de Fh15 insertada en pUCEXP. El carril “M” corresponde al marcador de peso molecular NZYLadder III. El carril “P” al control positivo, pUCEXP sin inserto. El carril “N” es el control negativo (agua). Y los 8 pocillos restantes corresponden a las colonias sospechosas de portar el vector pUCEXP con el inserto.

Se aisló el plásmido de una de las cinco colonias mediante el kit Miniprep (NZYTech) y se enviaron a secuenciar, obteniendo un total de 546 pb con un 100 % de identidad a la secuencia esperada para la colonia seleccionada.

4.3. Obtención de ARNm mediante transcripción *in vitro*

El plásmido procedente de la cepa secuenciada se aisló en grandes cantidades y se linealizó mediante la enzima de restricción *PstI*. Se realizó un proceso de transcripción *in vitro* con la polimerasa del fago T7 y se corrió un gel de agarosa con 5 µL de ARNm. El transcrito tiene un tamaño de aproximadamente 1000 bases y presenta alta densidad en comparación con el control positivo, lo que nos señala que se ha conseguido transcribir alta cantidad (Figura 3).

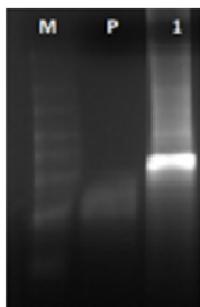


Figura 3. Gel de electroforesis de comprobación de la transcripción *in vitro* de Fh15. El pocillo “M” corresponde al marcador *RiboRuler* de Thermofisher. El pocillo “P” corresponde al control positivo del kit. El pocillo “1” corresponde al transcrito de Fh15.

5. DISCUSIÓN

La pandemia de SARS-CoV-2 nos ha enseñado que las nuevas vacunas de ARNm pueden constituir una nueva generación de vacunas útiles en las enfermedades producidas por trematodos. En este estudio se pretende dar un paso inicial para desarrollar una vacuna eficaz frente a *F. hepatica*. Para ello se ha diseñado un plásmido vector, denominado pUCEXP, basado en la tecnología descrita por BioNTech (Beissert *et al.*, 2020). En principio utilizamos una molécula de unión a ácidos grasos denominada FABP y que ha sido utilizada previamente por nuestro grupo de investigación como vacuna recombinante (Beissert *et al.*, 2020; Rodríguez-Pérez *et al.*, 1992). Los resultados muestran el exitoso proceso de clonación, comprobado mediante técnicas de PCR y posterior secuenciación. Además, hemos logrado transcribir altas cantidades de Fh15 *in vitro* a ARNm

que, con la adecuada formulación en nanopartículas lipídicas, se utilizará en un futuro como formulación vacunal en modelo murino de infección con *F. hepatica*. Se pretende que esta nueva tecnología de ARNm aporte mejores resultados vacunales que los obtenidos previamente.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha diseñado un vector de expresión de ARNm mediante herramientas bioinformáticas y los últimos conocimientos disponibles de tecnología de ARNm, cuya función es producir altas cantidades de la proteína de interés en células de mamífero.
2. Se ha clonado con éxito la proteína Fh15 en el vector diseñado y hemos comprobado su secuencia.
3. Se ha expresado Fh15 en forma de ARNm mediante transcripción *in vitro* con la polimerasa del fago T7 y comprobado su integridad por medio de electroforesis.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Beissert T, Perkovic M, Vogel A, Erbar S, Walzer K, Hempel T *et al.* A Trans-amplifying RNA Vaccine Strategy for Induction of Potent Protective Immunity. *Molecular Therap.* 2020; 28: 119-128.
- CDC-Centers for Disease Control and Diseases. Fascioliasis. DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. 2022 [última revisión 2 mayo 2019; citado 27 junio 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html>
- Deng Z, Tian Y, Song J, An G, Yang P. mRNA Vaccines: The Dawn of a New Era of Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology.* 2022; 13: 1-6
- Howell A, Baylis M, Smith R, Pinchbeck G, Williams D. Epidemiology and impact of *Fasciola hepatica* exposure in high-yielding dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine.* 2015; 121: 41-48.
- Jackson N, Kester K, Casimiro D, Gurunathan S, DeRosa F. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. *npj Vaccines.* 2020; 11: 1-5.
- López-Abán J, Casanueva P, Nogal J, Arias M, Morrondo P, Diez-Baños P *et al.* Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. *Veterinary Parasitology.* 2007; 145(3-4): 287-296.
- Mas-Coma S, Valero M, Bargues M. Chapter 2 *Fasciola*, Lymnaeids and Human Fascioliasis, with a Global Overview on Disease Transmission, Epidemiology, Evolutionary Genetics, Molecular Epidemiology and Control. *Advances in Parasitology.* 2009; 69: 41-146.

- Muro A, Ramajo V, López J, Simón F, Hillyer G. Fasciola hepatica: Vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Veterinary*. 1997; 69(3-4): 219-229
- Rodríguez-Pérez J, Rodríguez-Medina J, García-Blanco M, Hillyer G. Fasciola hepatica: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to a Schistosoma mansoni fatty acid-binding protein. *Experimental Parasitology*. 1992; 74(4): 400-407.
- Rong M, He B, McAllister W, Durbin R. Promoter specificity determinants of T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998; 95 (2): 515-519.
- Trepotec Z, Geiger J, Plank C, Aneja M, Rudolph C. Segmented poly(A) tails significantly reduce recombination of plasmid DNA without affecting mRNA translation efficiency or half-life. *RNA*. 2019; 25(4): 507-518.
- Zhang Q, Honko A, Zhou J, Gong H, Downs S, Vasquez J *et al.* Cellular Nanosponges Inhibit SARS-CoV-2 Infectivity. *Nano Letters*. 2020; 20 (7): 5570-5574.

