

# Marcadores celulares en el pronóstico de la enfermedad de Chagas

Manuel C. López, M<sup>a</sup> Carmen Thomas

Departamento de Biología Molecular. Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra CSIC. P. T. de Ciencias de la Salud

## Correspondencia:

Manuel C. López

Departamento de Biología Molecular. Instituto de Parasitología y Biomedicina

López Neyra, CSIC. P. T. de Ciencias de la Salud

Avda. del Conocimiento, s/n. 18100 Granada

E-mail: mclopez@ipb.csic.es

## Resumen

La respuesta primaria que induce la infección por *Trypanosoma cruzi* se caracteriza por una activación panclonal de células T la cual puede conducir a una inmunosupresión. En infección experimental la activación de células T CD4+ y CD8+ y producción de citoquinas de tipo I resulta crucial para controlar la parasitemia y superar la fase aguda de la enfermedad. Sugerimos que el análisis del nivel y tipo de células T respondedoras a específicas proteínas recombinantes de *T. cruzi* será una herramienta útil para identificar marcadores celulares del estado clínico y pronóstico de pacientes chagásicos.

**Palabras claves:** Enfermedad de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Infección. Antígenos recombinantes. Células T y B. Patología.

## Summary

The primary response induced by *T. cruzi* is characterized by a massive panclonal activation of T cells which may lead to immunological suppression. In experimental infection, generation of functional CD4+ and CD8+ T cells as well as the production of type I cytokines are crucial for the parasitaemia control and to overcome the acute infection. We suggest that the analysis of the level and type of T cells able to respond to specific *T. cruzi* recombinant proteins will be a useful tool for identifying cellular markers of the clinical status and prognosis of Chagasic patients.

**Key words:** Chagas' disease. *Trypanosoma cruzi*. Infection. Recombinant antigens. T and B cells. Pathology.

*Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, patología endémica de Centro y Sudamérica, la cual presenta elevados índices de morbilidad y mortalidad. El insecto vector deposita, pasivamente a través de sus deyecciones, las formas metacíclicas del parásito sobre la piel, penetrando estas en el cuerpo por la herida que causa la picadura u otras abrasiones, o a través de las mucosas. Estas formas metacíclicas del parásito infectan tanto células fagocíticas como no fagocíticas de diversos tejidos, principalmente cardíaco, de aparato digestivo y nervioso. En el interior de las células los parásitos se transforman en formas amastigotes que se replican y eclosionan la célula, saliendo al exterior como formas tripomastigotes capaces de reinfectar otras células.

La enfermedad de Chagas involucra tres fases distintas: 1. una fase aguda, inaparente en la mayoría de los casos pero en la que se encuentra un estado de inmunosupresión general; 2. una fase indeterminada (fase crónica asintomática), que compromete cerca del 40% de los casos serológicamente positivos; 3. una fase crónica sintomática, que se caracteriza, dependiendo de la cepa, por la afectación cardíaca o digestiva<sup>1</sup>.

El parásito *T. cruzi* coexiste con el hospedador en un equilibrio en el que intervienen mecanismos evolutivos. En general la respuesta inmune inducida por la infección de este protozoo parásito se caracteriza, en sus primeras etapas, por una intensa e inespecífica activación linfocitaria. Esta activación es panclonal y regulada por diferentes mecanismos<sup>2</sup>, estando acompañada por la activación de funciones efectoras, pudiendo dar lugar a una inmunodepresión. Se ha descrito la existencia de mimetismo molecular<sup>3,4</sup> con reacciones cruzadas entre antígenos de *T. cruzi* y moléculas del hospedador, las cuales darían lugar a procesos inflamatorios que se sumarían a aquellos mayoritarios, causados por la presencia de parásito en el tejido y que caracterizan a la fase crónica de la enfermedad<sup>5</sup>.

En infección experimental, se ha demostrado la existencia de una relación directa entre la exacerbación de la enfermedad y la deleción de células T<sup>6,7</sup>. Así, a pesar de que ratones CD4- o CD8- no muestran incremento general en las parasitemias, sí aumenta la respuesta inflamatoria y el número de parásitos localizados en el corazón de dichos animales<sup>8</sup>. Además, ratones deficientes en células CD8+ son altamente susceptibles a la infección por el parásito *T. cruzi*. Este hecho pone de manifiesto que las células T CD8+ parecen jugar un papel crucial en la resistencia a la infección por el referido parásito, así como para controlar la diseminación del mismo durante la enfermedad<sup>9</sup>. Datos recientes sugieren que el nivel de células T produciendo IFN- $\gamma$  estaría asociada, en Chagas crónico, con el estado clínico del paciente. Análisis de la respuesta celular frente a lisados de *T. cruzi*, medida como expresión de IFN- $\gamma$  en células de sangre periférica de enfermos de Chagas, muestra la existencia de un alto número de respondedores en el grupo de pacientes chagásicos con clínica suave y bajo número de respondedores en aquellos con clínica grave<sup>10</sup>. Así, se postula que la frecuencia de células T CD8+ específicas frente al parásito se correlacionaría con el estado de la enfermedad, siendo más débil la respuesta en pacientes chagásicos crónicos que se encuentran en fases tardías. Además, la reducción en la producción de IFN- $\gamma$  por estas células CD8+ estaría asociada con la severidad de la enfermedad<sup>10</sup>. Sin embargo, no se han identificado marcadores celulares específicos del estado clínico y pronóstico de la enfermedad Chagas.

Dado que la respuesta celular del hospedador ante el parásito *T. cruzi* resulta esencial en la evolución y severidad de la enfermedad de Chagas, planteamos la hipótesis de que el análisis de la frecuencia de células T respondedoras a determinados antígenos recombinantes del parásito, así como la naturaleza de las mismas, resultará útil para la identificación de marcadores celulares del estado clínico de la enfermedad y de su evolución en enfermos crónicos.

En los últimos años se han aislado e identificado, en nuestros laboratorios, varios antígenos de membrana, flagelo y citoplasma del parásito *T. cruzi*, conservados o específicos de kinetoplastidos. Se han estudiado desde un punto de vista molecular, funcional e inmunológico, mostrando que algunos de ellos pueden ser herramientas útiles en inmunodiagnóstico e inmunoterapia<sup>11-16</sup>. Asimismo, hemos identificado patrones inmunológicos, de citoquinas, moléculas de coestimulación y marcadores de activación, asociados a la susceptibilidad *versus* resistencia a la infección experimental por *T. cruzi*<sup>17</sup>.

La proteína TcMeP, localizada en la membrana de las formas tripomastigotes infectivas de *T. cruzi*, está implicada en la entrada del parásito en la célula hospedera. Anticuerpos frente a un polipéptido de la región carboxilo de la mencionada proteína inhiben *in vitro* la internalización de las formas infectivas del parásito en fibroblastos LLC-MK2<sup>11</sup>. La proteína KMP11 de *T. cruzi* forma parte del singular citoesqueleto de kinetoplastidos, estructura envuelta en su movilidad, así como en la estrecha relación parásito-hospedador<sup>12,18</sup>. La proteína recombinante muestra ser muy antigénica, conteniendo un determinante antigénico de 20 aminoácidos reconocido con alta especificidad y sensibilidad por sueros de pacientes chagásicos<sup>14</sup>. La proteína KMP11 inoculada sin adyuvante en ratones, resulta ser un fuerte inductor de respuesta celular<sup>15,16</sup>, habiendo identificado en la misma un epitopo A2 inmunodominante y otro críptico, inductores de linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos de antígeno<sup>15</sup>. La inmunización de ratones con un vector DNA que porta los genes de *T. cruzi* KMP11-HSP70 fusionados induce una respuesta inmune humoral de tipo IgG2a de larga duración frente a KMP11, así como la activación de linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos del mencionado antígeno. Además, estos ratones inmunizados con el gen quimérico se protegen frente a la infección experimental con *T. cruzi*<sup>16</sup>.

La proteína HSP70 de *T. cruzi* tiene actividad mitógena estimulando, en células ganglionares y esplenocitos de ratones sin inmunizar, la rápida expansión de linfocitos T CD3+, TcRβ+, CD4+ que conduce a la internalización de los receptores CD3 y TcRβ, así como a una apoptosis no dependiente de Fas Ligando, que da lugar a una específica y reducida población de células T sensibilizadas<sup>13</sup>. Esta proteína, en forma aislada o fusionada a la KMP11, madura células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón induciendo la expresión de IL12, TNF-α, moléculas de coestimulación y marcadores de activación, mostrando tener las células una elevada capacidad aloestimuladora<sup>17</sup>.

Recientes resultados del laboratorio han mostrado que las proteínas recombinantes paraflagelares PFR2 y PFR3 son altamente antigénicas e inmunogénicas. En suero de pacientes crónicos de Chagas y de ratones infectados con *T. cruzi* se observan altos niveles de anticuerpos frente a las mismas, siendo el reconocimiento de tipo conformacional. Ambas proteínas son fuertes inductores de una respuesta celular proliferativa, habiéndose identificado la presencia de un epitopo T inmunodominante en la molécula PFR3. La inmunización de ratones con un vector DNA que porta el gen PFR2 fusionado al codificante para la HSP70 induce un incremento de la expresión de citoquinas de tipo 1, una respuesta humoral (IgG2a) y la activación de CTLs específicos del antígeno PFR2. La región carboxilo de la mencionada proteína posee un epitopo A2 inmunodominante inductor de CTLs.

Las proteínas conservadas H2A y S6P muestran ser altamente antigénicas, habiéndose identificado en las mismas diferentes determinantes antigénicos de reconocimiento específico por sueros de pacientes chagásicos<sup>19-21</sup>. Gironés *et al.*<sup>22</sup> identificaron, en células humanas y de ratón, un antígeno denominado Cha, reconocido por sueros de pacientes chagásicos. Cha posee dos epitopos (R1 y R3) miméticos, respectivamente, con los antígenos SAPA y TENU2845/36kDa del parásito. R1 es un epitopo T mientras que R3 es un epitopo B. Los autores observan que la transferencia pasiva de células autoreactivas generadas durante la infección por *T. cruzi* produce infiltrados inflamatorios en corazón y anticuerpos contra Cha en los ratones receptores<sup>22</sup>.

Sobre la base de las consideraciones realizadas y estudios avanzados, nuestros actuales objetivos van dirigidos a identificar marcadores celulares que permitan evaluar el estado clínico de pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas, severidad de la misma, evolución post-tratamiento y valoración de su potencial evolución.

## Agradecimientos

El trabajo de los laboratorios de M.C. Thomas y M.C. López está, respectivamente, financiado por los Proyectos de investigación PIO2/0862, PIO2/0565 del FIS (MSC). Asimismo, el trabajo de ambos laboratorios está financiado de forma conjunta a través de la RICET C03/04 del FIS (MSC) y del Plan Andaluz de Investigación, G-CVI155.

## Bibliografía

1. Pentreath VW. Trypanosomiasis and the nervous system. *Pathology and immunology. Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89: 9-15.
2. Minoprio P, Andrade L, Lembezat MP, Ozaki LS, Coutinho A. Indiscriminate representation of VH-gene families in the murine B lymphocyte responses to *T. cruzi*. *J Immunol* 1989;142:4017-21.
3. Leon JS, Engman DM. Autoimmunity in Chagas Heart disease. *Int J Parasitol* 2001;31:555-61.
4. Gironés N, Fresno M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both?. *Trends Parasitol* 2003;19:19-22.
5. Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol* 2001;31:550-54.
6. Tarleton RL. The role of T cells in *T. cruzi* infections. *Parasitol Today* 1995;11:7-9.
7. Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *T. cruzi*. *Parasite Immunol* 1998;20:207-16.
8. Tarleton RL, Sun J, Zhang L, Postan M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas disease. *Infect Immun* 1994;62:1820-29.
9. Zhang L, Tarleton RL. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by *in situ* immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur J Immunol* 1996;26:102-9.
10. Laucella SA, Postan M, Martin D, *et al.* Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis* 2004;189:909-18.
11. Martín F, Puerta C, Thomas MC, *et al.* Identification of a *T. cruzi* membrane epitope implicated in the infectivity of fibroblast LLC-MK2 cells. *Parasitol Res* 1997;83:226-32.
12. Thomas MC, García-Pérez JL, Alonso C, López MC. Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*. A cytoskeleton associated protein regulated at a translational level. *DNA and Cell Biol* 2000;19:47-57.
13. Marañón C, Planelles L, Alonso C, López MC. The heat shock protein 70 from *T. cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. *Int Immunol* 2000;12:1685-93.

14. Thomas MC, Longobardo MV, Carmelo E, *et al.* Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastid membrane protein-11: identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. *Clin Exp Immunol* 2001;123:465-71.
15. Marañón C, Thomas MC, Planelles L, López MC. The immunization of A2/K<sup>b</sup> transgenic mice with the KMP11-HSP70 fusion protein induces CTL response against human cells expressing the *T. cruzi* KMP11 antigen: identification of A2-restricted epitopes. *Mol Immunol* 2001;38:279-87.
16. Planelles L, Thomas MC, Alonso C, López MC. DNA immunization with the *T. cruzi* HSP70 fused to KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect Immun* 2001;69:6558-63.
17. Planelles L, Thomas MC, Pulgar M, Marañón C, Grabbe S, López MC. The *Trypanosoma cruzi* heat shock protein-70 kDa alone or fused to parasite KMP11 antigen induces functional maturation of mouse dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002;80:241-7.
18. Fuertes MA, Perez JM, Soto M, López MC, Alonso C. Calcium-induced conformational changes in *Leishmania infantum* kinetoplastid membrane protein-11. *J Biol Inorg Chem* 2001;6:107-17.
19. Puerta C, Martin J, Alonso C, López MC. Isolation and characterization of the gene encoding histone H2A from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1994;64:1-10.
20. Marañón C, Puerta C, Alonso C, López MC. Control mechanisms of the H2A genes expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1998;92:313-24.
21. Marañón C, Thomas MC, Puerta C, Alonso C, López MC. The stability and maturation of the H2A histone mRNAs from *Trypanosoma cruzi* are implicated in their post-transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* 2000;1490:1-10.
22. Gironès N, Rodríguez CI, Carrasco-Marin E, Hernaez RF, de Rego JL, Fresno M. Dominant T- and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease. *J Clin Invest* 2001;107:985-93.