



ipbln

CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS



Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” CSIC

Universidad de Granada

**Dinámica de la respuesta de linfocitos TCD8⁺
específicos de antígenos parasitarios en pacientes
chagásicos bajo tratamiento.**

Directores de Tesis:

Dr. Manuel Carlos López López

Dra. Concepción Marañón Lizana

Dra. M^a Carmen Thomas Carazo

*Memoria presentada por la licenciada Adriana Egui Machado
para optar al grado de Doctor.*

Granada, 2013

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Adriana Egui Machado
ISBN: 978-84-9163-256-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/47083>

Resumen

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es una afección producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta antropozoonosis, constituye una de las enfermedades parasitarias más importantes del continente americano, encontrándose actualmente, al menos 10 millones de personas en Centroamérica y Sudamérica (WHO 2012) afectadas por esta patología crónica, que presenta elevados índices de morbilidad y mortalidad (10.000 muertes por año) (Schofield, Jannin et al. 2006), así como una clara disminución tanto de la calidad de vida como de la productividad laboral del individuo afectado.

Históricamente la infección por *T. cruzi* era limitada a Suramérica, Centroamérica y parte de Norteamérica (México y sur de los Estados Unidos) donde la principal vía de transmisión al hombre se produce por vía vectorial (Rassi, Rassi et al. 2012). Sin embargo, los flujos migratorios de América Latina han originado cambios sustanciales en la epidemiología de la enfermedad de Chagas. De ser una enfermedad muy ligada a la pobreza en zonas rurales de América Latina, ha pasado, primero, a las grandes ciudades del continente americano y, posteriormente, a zonas no endémicas, tales como Japón, Canadá, España, Alemania, Australia y Estados Unidos, donde se considera una enfermedad emergente (de Meis, Morrot et al. 2009; Gascon, Bern et al. 2009). Si bien, en zonas no endémicas no es posible la transmisión vectorial, la naturaleza hemática de este patógeno hace posible la transmisión, por transfusión sanguínea, por trasplante de órganos y por vía congénita.

El desarrollo de esta patología se da en dos fases comprendidas por una etapa de infección aguda subclínica en la mayoría de los casos, y una etapa crónica que puede ser o bien asintomática (fase indeterminada) o bien sintomática con compromiso miocárdico, intestinal o neurológico progresivo. Actualmente no existe un fármaco ideal para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, que actúe tanto sobre el parásito circulante en sangre como el presente en tejidos, y ello sin producir reacciones secundarias adversas, siendo la toxicidad y la eficacia de las drogas actualmente utilizadas la limitación del tratamiento empleado. En este sentido, si bien han sido investigados una gran cantidad de compuestos candidatos para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas, sólo dos de ellos han superado la etapa clínica (Benznidazol y Nifurtimox). En la fase aguda de la enfermedad, la administración de estos fármacos ayuda a controlar la infección y disminuye la probabilidad de cronicidad

(de Andrade, Zicker et al. 1996; Jannin and Villa 2007). Sin embargo, su eficacia terapéutica disminuye con el avance de la infección, existiendo controversias sobre su efectividad en la fase crónica de la enfermedad (Sosa-Estani and Segura 2006). Como primer tratamiento se recomienda el uso del benznidazol dado que este fármaco tiene un mejor perfil de seguridad y eficacia presentando una menor incidencia de efectos secundarios (Viotti, Vigliano et al. 2009; Murcia, Carrilero et al. 2012).

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se realiza, principalmente, mediante técnicas serológicas convencionales las cuales tienen una alta sensibilidad y especificidad (Britto, Silveira et al. 2001). Sin embargo, estas técnicas presentan la desventaja de requerir tiempos de seguimiento muy prolongados, para dar alguna evidencia serológica de cura en individuos con infección crónica (Viotti, Vigliano et al. 1994) (Fabbro, Streiger et al. 2007). Así, dichas metodologías no son adecuadas para evaluar el estatus clínico del paciente en su fase crónica, ni permiten determinar la evolución de la enfermedad post-tratamiento. Por ello, es necesario el desarrollo de marcadores que permitan evaluar la progresión de la enfermedad y posibiliten determinar la eficacia terapéutica frente a la infección (Requena-Mendez, Lopez et al. 2013).

Las reacciones de defensa del hospedador frente a la infección implican mecanismos efectores de la respuesta inmunitaria innata y adquirida (Tarleton 2007). Tanto la diversidad genética de *T. cruzi* como la genética del hospedador resultan determinantes en la patología de la enfermedad, donde las lesiones en los tejidos resultantes de esa actividad inmunológica se acumulan, llevando eventualmente a las alteraciones funcionales musculares y nerviosas características de la enfermedad de Chagas crónica (Tarleton, Reithinger et al. 2007). Por ello, con el fin de limitar el potencial daño producido por una respuesta inflamatoria excesiva, el sistema inmunitario desarrolla mecanismos inmuno-reguladores, tales como regulación negativa en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, inducción de células T reguladoras y regulación positiva de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) (Knubel, Martinez et al. 2010).

La respuesta inmunitaria desencadenada en la fase inicial de la patología logra controlar la proliferación del parasitario y resolver los signos y síntomas clínicos de la etapa aguda de la enfermedad, estableciéndose un equilibrio con el parásito que conduce a la cronicidad de la infección. En esta fase de la patología, el control de la infección por *T. cruzi* depende de mecanismos de la respuesta inmunológica celular y humoral del

hospedador basados en la secreción de anticuerpos líticos y en la activación linfocitaria tanto de células T CD4 como de células T CD8. En este sentido, los linfocitos T CD8 han demostrado ser cruciales en el control de la infección. Sin embargo, son escasos los epítopes T CD8⁺ identificados en antígenos del parásito e insuficiente el conocimiento de las bases celulares que permitan entender la dinámica de la respuesta inmune antiparasitaria durante la evolución de la enfermedad de Chagas.

Sobre esta base el objetivo de este trabajo es la identificación y caracterización de nuevos epítopes T CD8⁺ contenidos en antígenos específicos de *T. cruzi*. Así una vez identificados los epítopes se ha llevado a cabo el estudio funcional y fenotípico de las células T CD8⁺ presentes en pacientes con enfermedad de Chagas crónica en fases indeterminada y cardíaca que reconocen a dichos epítopes, así como su dinámica tras el tratamiento con benznidazol. Las conclusiones permitirán establecer útiles marcadores de grado de patología y eficacia terapéutica. Asimismo, se plantea la identificación de moléculas marcadoras de mecanismos implicados en la capacidad del sistema inmune para modificar su potencial respuesta frente a la infección por *T. cruzi*.

Los resultados obtenidos muestran la identificación de 11 nuevos epítopes, restringidos a la molécula HLA-A*02:01, contenidos en las proteínas HSP70 (HSP70₂₁₀₋₂₁₈ y HSP70₃₁₆₋₃₂₄), PFR2 (PFR2₁₉₋₂₈, PFR2₁₅₆₋₁₆₃ y PFR2₄₄₉₋₄₅₇), PFR3 (PFR3₄₂₈₋₄₃₆ y PFR3₄₈₁₋₄₈₉) y TcCA-2 (12819, 12822, 12827 y 12828) de *T. cruzi*. Dichos epítopes son capaces de inducir una respuesta multifuncional secretora de citoquinas (INF- γ , TNF- α e IL-6) e inductora de actividad citotóxica (GzB) en linfocitos T CD8⁺ de pacientes con enfermedad de Chagas. Así mismo, se observa una actividad IDO en células mononucleares de sangre periférica de pacientes de Chagas estadísticamente superior con respecto a individuos sanos, existiendo una correlación positiva entre los niveles de actividad IDO y el grado de patología en la fase crónica de la enfermedad. Adicionalmente, se observa que el tratamiento con benznidazol induce cambios inmunológicos en los pacientes incluidos en este estudio, tales como modificaciones a nivel funcional y fenotípico de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígenos de *T. cruzi* y ruptura de la tolerancia inmunológica, esta última reflejada por la disminución de la actividad IDO. Así, estos datos proporcionan una evidencia inmunológica de los efectos favorables del tratamiento con el fármaco benznidazol durante la fase crónica de la enfermedad.

Índice

| | |
|---|-----------|
| 1.-INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1.- TRIPANOSOMIASIS AMERICANA O ENFERMEDAD DE CHAGAS..... | 3 |
| 1.1.1.- AGENTE ETIOLÓGICO | 3 |
| 1.1.2.- CICLO DE VIDA DE <i>T. CRUZI</i> | 4 |
| 1.1.3.- VÍAS DE TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS..... | 6 |
| 1.1.4.- EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS | 9 |
| 1.1.5.- DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. | 12 |
| 1.1.6.- FASES Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. | 13 |
| 1.1.6.1.- Fase aguda. | 13 |
| 1.1.6.2.- Fase crónica..... | 14 |
| 1.1.7.- TRATAMIENTO PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS..... | 17 |
| 1.1.8.- BIOMARCADORES DE EFICACIA-RECHAZO (EFECTO) TERAPÉUTICO EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS | 20 |
| 1.2.- INMUNOLOGÍA E INMUNOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS | 24 |
| 1.2.1.- RESPUESTA INMUNITARIA INNATA FRENTE A <i>T. CRUZI</i> | 25 |
| 1.2.4.- ACTIVIDAD INDOLAMIL-DEOXIGENASA (IDO) FRENTE A <i>T. CRUZI</i> | 25 |
| 1.2.2.- RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA FRENTE A <i>T. CRUZI</i> | 27 |
| 1.2.3.- GENERACIÓN DE LINFOCITOS T DE MEMORIA..... | 31 |
| 1.3.- PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE <i>T. CRUZI</i>..... | 35 |
| 1.2.1.- GENERALIDADES DE LOS ANTÍGENOS DE <i>T. CRUZI</i> | 35 |
| 1.2.1.- PROTEÍNAS A ESTUDIO | 38 |
| 2.-OBJETIVOS..... | 43 |
| 3.-MATERIALES Y MÉTODOS | 47 |
| 3.1- MATERIALES..... | 49 |
| 3.1.1.- PRODUCTOS QUÍMICOS | 49 |
| 3.1.2.- TAMPONES | 49 |
| 3.1.3.- ANTICUERPOS. | 50 |
| 3.1.4.- MEDIOS DE CULTIVO..... | 52 |
| 3.1.5.- PATRONES DE PESO MOLECULAR..... | 52 |
| 3.1.6.- CEPAS DE <i>T. CRUZI</i> | 52 |
| 3.1.7.- CEPAS DE RATONES | 52 |
| 3.1.8.- LÍNEAS CELULARES..... | 53 |
| 3.1.9.- COHORTE DE PACIENTES ESTUDIADA. | 54 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1.10.- MITÓGENOS | 55 |
| 3.1.11.- PROTEÍNAS RECOMBINANTES | 55 |
| 3.1.12.- PÉPTIDOS SINTÉTICOS | 56 |
| 3.2.- MÉTODOS | 58 |
| 3.2.1.- CULTIVO IN VITRO DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> | 58 |
| 3.2.2.- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE <i>T. CRUZI</i> | 59 |
| 3.2.3.- PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES A ENSAYO Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS. | 59 |
| 3.2.4.- ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA: SDS-PAGE..... | 62 |
| 3.2.5.- INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS FIJADAS EN MEMBRANAS “WESTERN BLOT”..... | 62 |
| 3.2.6.- INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) SOBRE FORMAS EPIMASTIGOTES, AMASTIGOTES Y TRIPOMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i> | 63 |
| 3.2.7.- PÉPTIDOS..... | 63 |
| 3.2.8.- UNIÓN Y ESTABILIDAD DE PÉPTIDOS A2..... | 64 |
| 3.2.9.- INFECCIÓN DE RATONES CON <i>T. CRUZI</i> | 65 |
| 3.2.10.- DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS POR ELISA | 66 |
| 3.2.11.- OBTENCIÓN MUESTRAS BIOLÓGICAS | 66 |
| 3.2.12.- DETECCIÓN DE LINFOCITOS T CITOTÓXICOS (ENSAYOS ELISPOT). | 68 |
| 3.2.13.- DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS MEDIANTE ENSAYOS BIO-PLEX..... | 69 |
| 3.2.14.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LINFOCITOS T CD8 ⁺ PÉPTIDOS-ESPECÍFICOS CIRCULANTES, MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO. | 70 |
| 3.2.15.-DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ÍNDOLAMIL-2,3 DEOXIGENASA (IDO)..... | 71 |
| 3.2.16.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS | 71 |
| 4.-RESULTADOS | 73 |
| 4.1.- IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPES CD8⁺ RESTRINGIDOS A LA MOLÉCULA HLA-A*02:01 CONTENIDOS EN LAS PROTEÍNAS HSP70, PFR2, PFR3 Y TCCA-2 DE <i>T. CRUZI</i>. | 75 |
| 4.1.1.- IDENTIFICATION OF HLA-A*02:01-RESTRICTED CTL EPITOPES IN TRYPANOSOMA CRUZI HEAT SHOCK PROTEIN-70 RECOGNIZED BY CHAGAS DISEASE PATIENTS. | 75 |
| 4.1.2.- TRYPANOSOMA CRUZI PARAFLAGELLAR ROD PROTEINS 2 AND 3 CONTAIN IMMUNODOMINANT CD8 ⁺ T-CELL EPITOPES THAT ARE RECOGNIZED BY CYTOTOXIC T CELLS FROM CHAGAS DISEASE PATIENTS. | 85 |
| 4.1.3.- FUNCTIONAL AND PHENOTYPICAL CHARACTERIZATION OF IMMUNODOMINANT CD8 ⁺ T-CELL EPITOPES CONTAIN IN THE TRYPANOSOMA CRUZI TCCA-2 MEMBRANE ANTIGEN THAT ARE RECOGNIZED BY CYTOTOXIC T CELLS FROM CHAGAS DISEASE PATIENTS | 97 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.- ACTIVIDAD DE LA ENZIMA INDOLAMINA-2,3-DIOXIGENASA (IDO) EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS Y MODIFICACIONES POST-TRATAMIENTO CON BENZNIDAZOL..... | 119 |
| 4.2.1.- BENZNIDAZOLE TREATMENT REDUCES THE INDUCTION OF INDOLEAMINE 2, 3-DIOXYGENASE (IDO) ENZYMATIC ACTIVITY IN CHAGAS DISEASE SYMPTOMATIC PATIENTS. | 119 |
| 4.3.- EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON BENZNIDAZOL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS EN FASE CRÓNICA ASINTOMÁTICA Y EN FASE CRÓNICA CON SINTOMATOLOGÍA CARDIACA..... | 129 |
| 4.3.1.- RESPUESTA FUNCIONAL DE LINFOCITOS T CD8 ⁺ DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS, TRATADOS CON BENZNIDAZOL, A PÉPTIDOS CONTENIDOS EN ESPECÍFICAS PROTEÍNAS DE <i>T. CRUZI</i> | 131 |
| 4.3.2.- CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO DE MEMORIA, DIFERENCIACIÓN Y SENESCENCIA DE LINFOCITOS T CD8 ⁺ ESPECÍFICOS DE PÉPTIDOS CONTENIDOS EN LAS PROTEÍNAS HSP70, PFR2, PFR3, TcCA-2 Y KMP11 PRE Y POST TRATAMIENTO CON BENZNIDAZOL. | 134 |
| 4. 3.2.1.- Péptido HSP70 ₂₁₀₋₂₁₈ contenido en la proteína HSP70. | 137 |
| Caracterización fenotípica pre-tratamiento. | 137 |
| Caracterización fenotípica post-tratamiento con Benznidazol. | 140 |
| Modificaciones fenotípicas inducidas por el tratamiento con Benznidazol. | 143 |
| 4. 3.2.2.- Péptido PFR2 ₄₄₉₋₄₅₇ contenido en la proteína PFR2..... | 148 |
| Caracterización fenotípica pre-tratamiento. | 148 |
| Caracterización fenotípica post-tratamiento con Benznidazol. | 151 |
| Modificaciones fenotípicas inducidas por el tratamiento con Benznidazol. | 154 |
| 4. 3.2.3.-Péptido PFR3 ₄₂₈₋₄₃₆ contenido en la proteína PFR3..... | 158 |
| Caracterización fenotípica pre-tratamiento. | 158 |
| Caracterización fenotípica post-tratamiento con Benznidazol. | 161 |
| Modificaciones fenotípicas inducidas por el tratamiento con Benznidazol. | 164 |
| 4. 3.2.4.- Péptido 12822 contenido en la proteína TcCA-2..... | 169 |
| Caracterización fenotípica pre-tratamiento. | 169 |
| Caracterización fenotípica post-tratamiento con Benznidazol. | 170 |
| Modificaciones fenotípicas inducidas por el tratamiento con Benznidazol. | 173 |
| 4. 3.2.5.- Péptido 12827 contenido en la proteína TcCA-2..... | 177 |
| Caracterización fenotípica pre-tratamiento. | 177 |
| Caracterización fenotípica post-tratamiento con Benznidazol. | 178 |
| Modificaciones fenotípicas inducidas por el tratamiento con Benznidazol. | 180 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.2.6.- Péptido K1 contenido en la proteína KMP11..... | 185 |
| Caracterización fenotípica post-tratamiento con Benznidazol..... | 188 |
| Modificaciones fenotípicas inducidas por el tratamiento con Benznidazol..... | 191 |
| 5.-DISCUSIÓN | 195 |
| 5.1.- IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPES CD8⁺ RESTRINGIDOS A LA MOLÉCULA HLA-A*02:01 CONTENIDOS EN LAS PROTEÍNAS HSP70, PFR2, PFR3 Y TCCA-2 DE <i>T. CRUZI</i> | 197 |
| 5.2.- ACTIVIDAD DE LA ENZIMA INDOLAMINA-2.3-DIOXIGENASA (IDO) EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS Y MODIFICACIONES POST-TRATAMIENTO CON BENZNIDAZOL..... | 204 |
| 5.3.- CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LINFOCITOS TCD8⁺ ESPECÍFICOS DE ANTÍGENOS DE <i>T. CRUZI</i> POST TRATAMIENTO CON BENZNIDAZOL. | 206 |
| 5.4.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LINFOCITOS T CD8⁺ ESPECÍFICOS DE PÉPTIDOS CONTENIDOS EN LAS PROTEÍNAS HSP70, PFR2, PFR3, TCCA-2 Y KMP11 PRE Y POST TRATAMIENTO CON BENZNIDAZOL. | 207 |
| 6.-CONCLUSIONES | 211 |
| 7.-BIBLIOGRAFÍA | 215 |

| | |
|--------------|--|
| ADN | ácido desoxirribonucleico |
| ADNk | ADN del kinetoplástido |
| APC | aloficocianina |
| APC-H7 | aloficocianina H7 |
| FITC | isocianato de fluoresceína (FITC) |
| PBMC | células mononucleares de sangre periférica |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| PE | ficoeritrina |
| PerCp | proteína clorofila peridina |
| PerCp-Cy 5.5 | proteína clorofila peridina-R-ficoeritrina cianina 5.5 |

Listado de anglicismos no traducidos

| | |
|----------------------|---|
| TCD8 _{HIGH} | linfocitos T CD8 alto |
| TCD8 _{LOW} | linfocitos T CD8 bajo |
| T _{CM} | linfocitos T de memoria central |
| T _{EM} | linfocito T de memoria efectora |
| TED | linfocitos T en diferenciación temprana |
| T _{EMRA} | linfocito T de memoria efectora RA ⁺ |
| T _{NAIVE} | células T vírgenes |
| T _{TD} | linfocitos T en diferenciación tardía |

1.-Introducción

1.1.- Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es una afección producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta antropozoonosis, que constituye una de las enfermedades parasitarias más importantes del continente americano, fue descrita en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas. Actualmente, al menos 10 millones de personas en Centroamérica y Sudamérica (WHO 2012) se encuentran afectadas por esta patología crónica, que presenta elevados índices de morbilidad y mortalidad (10.000 muertes por año) (Schofield, Jannin et al. 2006), así como una clara disminución tanto de la calidad de vida como de la productividad laboral del individuo afectado. Esta patología es considerada por algunos autores como una de las enfermedades más desatendidas dentro de las enfermedades olvidadas (Tarleton and Curran 2012).

1.1.1.- Agente etiológico

Trypanosoma cruzi es un parásito intracelular obligado que pertenece al phylum *Sarcomastigophora*, subphylum *Mastigophora*, orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae* (Rassi, Rassi et al. 2012). Este orden se distingue por presentar una sola mitocondria de gran tamaño llamada kinetoplasto, localizada adyacente al cuerpo basal del flagelo (Stuart, Brun et al. 2008). Estos protozoos, presentan un ADN genómico (ADNg) localizado en el núcleo celular y un ADN extracromosómico situado en el kinetoplasto (ADNk) el cual, está constituido por una red de moléculas circulares concatenadas covalentemente que representan del 10 al 20% de todo el ADN del parásito (Simpson 1979; Simpson, Simpson et al. 1980). Dichas moléculas circulares de ADNk, están formadas por unos 50 maxicírculos de 30 a 40 kb y unos 10.000 minicírculos de 0,84 a 2,5 kb (Ryan, Shapiro et al. 1988). El proceso de replicación de este ADNk se inicia de forma casi simultánea con la replicación del ADN nuclear indicando, que la síntesis del ADN (fase S) tanto en núcleo como en mitocondria es un proceso coordinado (Pasion, Brown et al. 1994).

Según la relación o interacción parásito-hospedador, los kinetoplastidos, se pueden diferenciar en dos grupos: (a) monogénicos, los cuales parasitan a un único hospedador invertebrado, y (b) digénicos, que parasitan a dos hospedadores,

generalmente uno de ellos invertebrado y el otro vertebrado (Lake, de la Cruz et al. 1988).

1.1.2.- Ciclo de vida de *T. cruzi*

T. cruzi tiene un ciclo de vida digénico, que alterna entre dos hospedadores: uno invertebrado que actúa como vector transmisor de la enfermedad y que pertenece a la familia *Reduviidae* (Hemiptera y Heteroptera), y otro vertebrado que puede ser el hombre, animales domésticos, o animales salvajes.

En función de la forma general de las células, la posición relativa entre el núcleo y el kinetoplasto, así como la manera de salida del flagelo *T. cruzi* presenta tres estadios morfológicos: la forma amastigote no flagelada, y las formas flageladas epimastigote y tripomastigote, esta última no replicativa (Figura I1) (Brenner, Andrade et al. 2000).

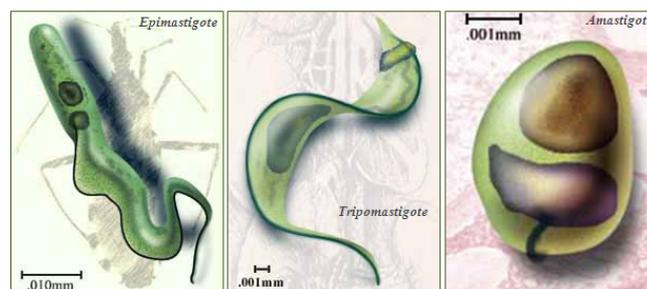


Figura I1.- Formas evolutivas de *T. cruzi*. Epimastigote; Tripomastigote y Amastigote.

<http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html>

El ciclo se inicia cuando el insecto hematófago se alimenta de la sangre de un hospedador vertebrado infectado, ingiriendo así al parásito en su forma tripomastigote (figura I2 (1)). Dentro del insecto vector, a mitad del intestino, los parásitos viran a forma epimastigote, se replican por fisión binaria y migran al recto donde pasan a la forma infectiva para el hospedador vertebrado tripomastigote metacíclico (figura I2 (4-5)). La infección del mamífero se inicia cuando un insecto infectado con el parásito pica a un hospedador vertebrado y defeca mientras se alimenta (figura I2 (6-7)). El parásito localizado en heces u orina entra en el organismo a través de excoriaciones en la piel (sitio de la mordedura), o a través de las mucosas. En este momento, el parásito entra al torrente sanguíneo del hospedador en forma de tripomastigotes, los cuales son capaces de penetrar en una gran variedad de tipos celulares: macrófagos, fibroblastos, células del sistema nervioso y musculares (figura I2 (8-9)) (Burleigh and Andrews 1995). Al

infectar la célula hospedadora, las formas tripomastigotes se encuentran dentro de una vacuola que se funde con los lisosomas de la célula (Teixeira, Benchimol et al. 2012). En este ambiente ácido, los tripomastigotes secretan enzimas que conllevan a la lisis de la membrana de la vacuola parasitófora. Durante este proceso, la forma tripomastigote comienza un proceso de diferenciación hacia la forma amastigote, siendo esta liberada al citoplasma de la célula hospedadora donde se multiplica diversas veces por fisión binaria (figura I2 (10-11)). Tras varios ciclos de división, los amastigotes se diferencian a forma tripomastigote y tras la ruptura de la célula hospedadora, son liberados al medio extracelular (figura I2 (12-13)). De esta forma, los tripomastigotes infectivos pueden alcanzar nuevamente el torrente sanguíneo e infectar otras células (figura I2 (15b)) o bien, ser ingeridos por un insecto vector cerrándose así el ciclo de vida del parásito (figura I2 (1)).

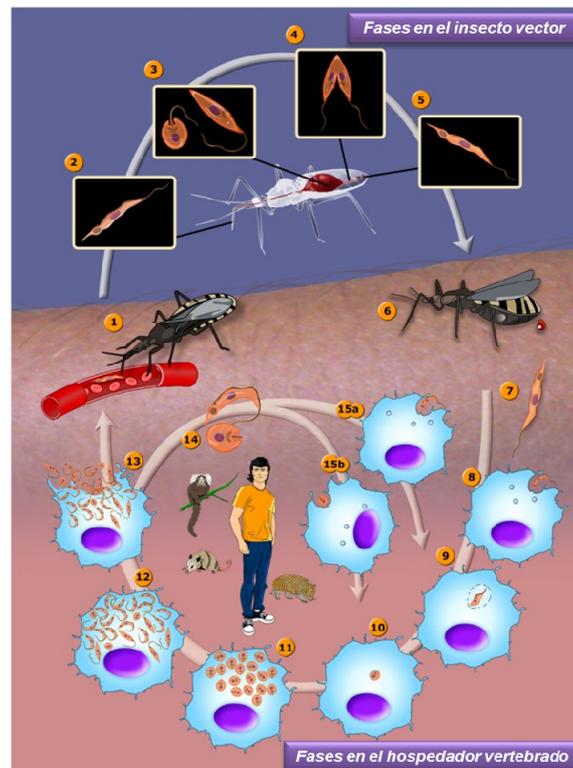


Figura I2- Ciclo de vida *T. cruzi*. 1) El insecto vector pica a un hospedador vertebrado infectado e ingiere tripomastigotes libres en el torrente sanguíneo. 2) Tripomastigotes metacíclicos. 3) Los tripomastigotes viran a formas epimastigotes. 4) Replicación de la forma epimastigotes en el intestino medio del insecto vector. 5) Evolución de formas epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos en el intestino grueso del insecto. 6) Liberación de tripomastigotes metacíclicos contenidos en las heces del insecto vector tras alimentarse del hospedador vertebrado. 7) Tripomastigotes metacíclicos. 8) Entrada de tripomastigotes metacíclicos en macrófagos del hospedador. 9 y 10). Diferenciación de tripomastigotes metacíclicos a formas amastigotes. 11) Replicación de forma amastigotes en el citoplasma celular. 12). Evolución de formas amastigotes a formas tripomastigotes. 13). Ruptura de la célula hospedadora y liberación de tripomastigotes al torrente sanguíneo. 15 a y b) Reinfección de macrófagos por tripomastigotes y amastigotes. (Teixeira, Benchimol et al. 2012).

1.1.3.- Vías de transmisión de la enfermedad de Chagas.

Transmisión Vectorial

En zonas endémicas, la principal vía de transmisión de la enfermedad de Chagas tanto en humanos como en más de 150 especies de animales domésticos (perros, gatos, etc), peridomésticos (cobayas, ratas, etc) o silvestres (marsupiales, primates etc), es a través de insectos hematófagos (machos y hembras) de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae* (Deane 1964; Rassi, Rassi et al. 2012). Estos insectos son hematófagos en todos sus estadios y desde que comienzan a alimentarse (ninfa estadio I), pueden infectarse y transmitir la enfermedad de Chagas. La probabilidad de infección de un triatomino con *T. cruzi* aumenta proporcionalmente con el número de ingestas de sangre, por lo que la tasa de infección más alta se observa en la fase adulta. Según el hábitat preferido del insecto se distinguen tres ciclos de transmisión de *T. cruzi* en los que interviene el vector: doméstico, peridoméstico y selvático (Deane 1964).

Aunque han sido identificadas más de 130 especies de triatominos, las especies con mayor capacidad vectorial y distribución geográfica son *Triatoma infestans*, el cual es el vector más importante en el sur de Sudamérica, *Triatoma dimidiata* presente en el norte de Centroamérica y Sudamérica extendiéndose hasta México y *Rhodnius prolixus* presente en el norte de Centroamérica y Sudamérica (figura I3) (Lent, Ono et al. 1979; Zeledon and Rabinovich 1981; WHO 2002; Galvão, Carcavallo et al. 2003).

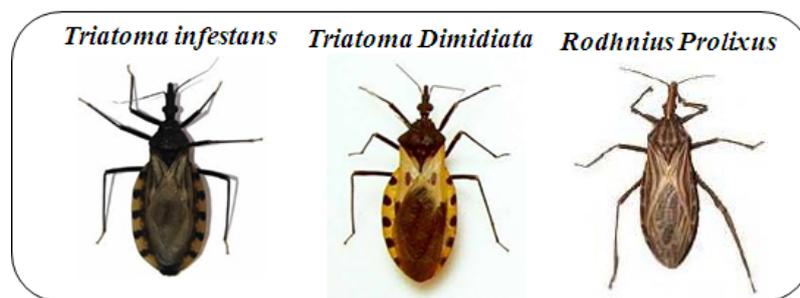


Figura I3- Especies de vectores invertebrados con mayor capacidad vectorial y distribución geográfica. *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*

Otras vías de transmisión

Dada la naturaleza hemática de este patógeno, la transmisión es posible a través de transfusiones sanguíneas o trasplantes de órganos. Así mismo, el parásito también puede ser transmitido de madre a feto (transmisión congénita) (Guhl 2000; Dias 2009), por vía oral o bien por accidentes de laboratorio. Siendo estas las principales vías de propagación de la enfermedad en países no endémicos tales como Japón, Canadá, España, Alemania, Australia y Estados Unidos, donde se considera una enfermedad emergente (de Meis, Morrot et al. 2009; Gascon, Bern et al. 2009).

Transmisión vía transfusión sanguínea

Las transfusiones sanguíneas se han convertido en una fuente importante de transmisión de la enfermedad de Chagas, tanto en América Latina, debido a los flujos migratorios desde zonas rurales a urbanas, como en países no endémicos. Esta vía de transmisión cobra importancia en aquellas regiones donde la detección de la enfermedad no está muy desarrollada. En este sentido, debido al aumento del flujo migratorio de personas procedentes de zonas endémicas a España, en el año 2005 se elaboró un Real Decreto por el Ministerio de Sanidad, que establece cribar en bancos de sangre todos los donantes de sangre con riesgo de infección por *Trypanosoma cruzi* o bien excluirlos de la donación si el cribado no es posible (RD 1088//2005).

El riesgo de infección con *T. cruzi* post la transfusión de una unidad de sangre proveniente de un donante infectado, es entre el 10 y 20 %, y está determinado por varios factores, entre los cuales se incluye, la concentración de parásitos en la sangre del donante, el componente de la sangre transfundida y la cepa del parásito (Schijman, Altcheh et al. 2003; Bern, Montgomery et al. 2008). Así mismo, la transfusión de plaquetas constituye un mayor riesgo de infección con respecto a otros componentes sanguíneos, dada una mayor concentración de parásitos en esta fracción tras la centrifugación de la sangre (Rassi, Rassi et al. 2010).

Transmisión vía trasplante de órganos

La transmisión de la infección a partir de un órgano sólido o médula ósea proveniente de un donante infectado es posible y ha sido documentado en América Latina y en regiones no endémicas, como EE.UU, Canadá, España y Suiza (Villalba,

Fornes et al. 1992; Cimo, Luper et al. 1993; Sosa-Estani and Segura 2006) (Rassi, Rassi et al. 2012).

Según el órgano trasplantado, el riesgo de transmisión oscila en el caso del riñón entre un 17 y un 18% cuando este proviene de un donante con serología positiva y alrededor de un 10% en el caso del hígado (transplante. 2009). Si el órgano trasplantado es el corazón el riesgo de infección es mayor con respecto a riñón e hígado (Villalba, Fornes et al. 1992; Barcan, Luna et al. 2005; Fores, Sanjuan et al. 2007).

Transmisión Congénita

T. cruzi puede ser transmitido al feto, durante el embarazo de una madre infectada en etapa aguda o crónica de la enfermedad, aunque en la etapa aguda de la infección existe una intensa parasitemia y, por lo tanto, un mayor riesgo de transmisión. Esta infección puede darse en embarazos sucesivos, en gemelos, e incluso se ha descrito infección congénita de segunda generación. El 60% por ciento de los recién nacidos, hijos de madres infectadas son seropositivos debido al traspaso de anticuerpos pasivos maternos, observándose serologías negativas antes del año de edad (Gomes, Lorena et al. 2009).

Algunos otros factores de la madre como, carga parasitaria, estado inmunológico o cepa de *T. cruzi* con la que está infectada, también definen las diferencias observadas en la tasa de transmisión según la zona geográfica (endémica o no endémica). En Sudamérica, la prevalencia de la infección en mujeres embarazadas, varía según las zonas estudiadas de 2 a 51% en zonas urbanas y de 23 a 81% en zonas rurales.

La transmisión de *T. cruzi* puede darse, o bien por vía hematogena como resultado de una placentitis, donde se encuentran focos inflamatorios agudos o crónicos, áreas de necrosis, presencia de células gigantes o parasitismo de macrófagos y células trofoblásticas; o bien por la penetración del parásito en forma activa hacia la circulación fetal.

Transmisión Oral

La transmisión de la enfermedad de Chagas puede darse por vía oral tras la ingesta de alimentos o líquidos contaminados con *T. cruzi*, triatomos triturados, frutas o partes aéreas de vegetales contaminadas con heces de triatomos y por carne o sangre de mamíferos infectados. Así mismo, se ha encontrado el parásito en leche humana de

pacientes en fase aguda de la enfermedad, describiéndose casos de infección por *T. cruzi* vía oral a través de la leche durante la lactancia materna (Ferreira, Martinho et al. 2001). Esta ingestión de alimentos contaminados, se asocia generalmente con la infestación parasitaria masiva, lo que resulta en una fase clínica aguda más grave con una alta tasa de mortalidad. Tras los trabajos desarrollados por Schenone y col esta vía de transmisión de *Trypanosoma cruzi* se considera como parte habitual del ciclo enzoótico de este parásito (Schenone, Gonzalez et al. 1982). A pesar de ello, esta vía de transmisión ha estado desestimada hasta que recientemente han sido identificados varios brotes de transmisión oral, entre ellos el mayor descrito hasta la fecha que afecto a más de 100 personas de un colegio en Caracas (Venezuela) tras la ingesta de un zumo de frutas contaminado con el parásito (Alarcon de Noya, Diaz-Bello et al. 2010).

El parásito en su forma tripomastigote metacíclico, presenta la máxima capacidad infectiva por vía oral. Esta forma del parásito es capaz de adherirse, penetrar y resistir a la capacidad proteolítica de la mucosa gástrica (Neira, Silva et al. 2003). Dicha capacidad de infectar las mucosas de la vía digestiva se relaciona con la presencia de la glicoproteína gp82 específica del estadio metacíclico del parásito. Esta molécula de adhesión en un mecanismo mediado por receptor, se une a las células epiteliales e induce movilización de Ca^{+2} , esencial para el ingreso del parásito a la célula (Ruiz, Favoreto et al. 1998). Esta glicoproteína, ha sido descrita en la superficie de la forma tripomastigote metacíclico de distintas cepas de *T. cruzi* (Yoshida 2006). Por otro lado la glicoproteína gp30 similar a gp82; presenta gran capacidad de infectar células *in vitro* pero baja afinidad por la mucina gástrica; por lo que, su implicación en la transmisión oral *in vivo* es baja (Cortez, Silva et al. 2006; Cordero, Gentil et al. 2008; Yoshida 2008).

1.1.4.- Epidemiología y control de la enfermedad de Chagas

De acuerdo con estimaciones de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), 7-10 millones de personas están infectadas crónicamente con *T. cruzi*, y entre 10.000 y 14.000 muertes al año son causados por la enfermedad de Chagas, siendo los países con más alta prevalencia Bolivia (6,8 %), Argentina (4,1 %), El Salvador (3,4 %), Honduras (3,1 %) y Paraguay (2,5 %) (Rassi, Rassi et al. 2012).

Hasta la fecha la infección por *T. cruzi* era limitada a Suramérica, Centroamérica y parte de Norteamérica (México y sur de los Estados Unidos) donde la principal vía de transmisión al hombre se produce por vía vectorial (Rassi, Rassi et al. 2012). Sin embargo, los flujos migratorios de América Latina han originado cambios sustanciales en la epidemiología de la enfermedad de Chagas. De ser una enfermedad muy ligada a la pobreza en zonas rurales de América Latina, ha pasado, primero, a las grandes ciudades del continente americano y, posteriormente, a zonas no endémicas, tales como Estados Unidos de América, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental (figura I3) (Gascon and Pinazo 2008).



Figura I3.- Distribución geográfica según la vía de transmisión de la enfermedad de Chagas.

En este sentido, en los últimos 20 años en la mayoría de los países endémicos se han desarrollado distintas iniciativas con el fin de erradicar la enfermedad de Chagas (Moncayo 2003). Dichas iniciativas se basan en: programas de control vectorial, análisis sistemáticos de sangre de donantes, educación de las poblaciones en riesgo, tratamiento de casos agudos y niños y detección y/o tratamiento de casos congénitos (Rassi, Rassi et al. 2012). Debido a la implantación de estos mecanismos de control, se ha observado una disminución tanto en, prevalencia, incidencia de nuevos casos (700.000 por año en 1990 frente a 41.200 al año en 2006) y mortalidad (50.000 por año frente a 12.500 por año) por la enfermedad de Chagas (Moncayo and Silveira 2009). Sin embargo, a pesar de estos logros la enfermedad de Chagas está clasificada como enfermedad tropical

olvidada (neglected tropical disease), y continua siendo la principal causa de cardiopatía y muerte por enfermedad cardiovascular en pacientes entre 30 y 50 años en países endémicos (Rassi Jr, Rassi et al. 2009; Martins-Melo, Alencar et al. 2012).

La afluencia de inmigrantes procedentes de zonas endémicas, ha hecho de la enfermedad de Chagas un importante problema de salud en zonas no endémicas, principalmente en EE.UU el cual es el destino más común de inmigración de personas provenientes de Latinoamérica, estimándose que 300.000 personas principalmente provenientes de México están infectados con *T cruzi* (Bern and Montgomery 2009). España representa el segundo país con mayor número de personas infectadas (47.000-67.000) la mayoría procedentes de Ecuador, Argentina, Bolivia y Perú (figura I4) (Gascon, Bern et al. 2010).

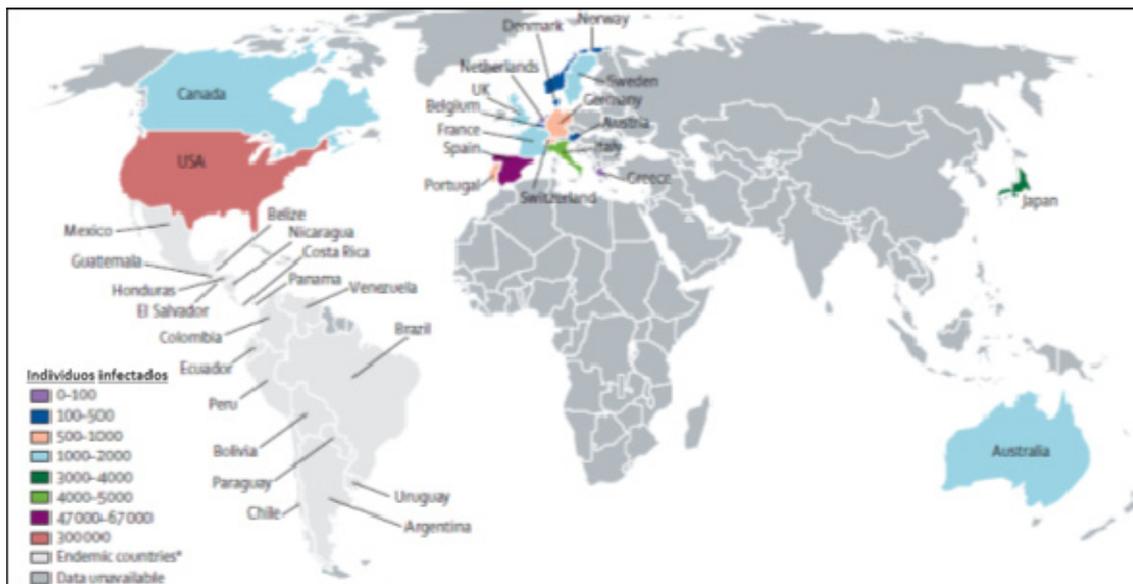


Figura I4.- Número estimado de inmigrantes con infección por *Trypanosoma cruzi* que viven en países no endémicos. Modificado de (Rassi, Rassi et al. 2010).

Si bien, en estas zonas no endémicas no es posible la transmisión vectorial, sí que es posible la transmisión por vía congénita y por trasplante de órganos, esto ha hecho necesario la implantación de controles adicionales en bancos de sangre. Así mismo, es necesario proporcionar asistencia de calidad a los pacientes con enfermedad de Chagas a través del diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad.

1.1.5.- Diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se basa en ensayos de laboratorio que permitan determinar tanto, la presencia del parásito en muestras de sangre periférica o en tejido, como la secreción de anticuerpos específicos frente a antígenos del mismo.

En la fase aguda de la infección, el alto nivel de parasitemia en sangre permite que el parásito pueda ser detectado en sangre, por observación directa en el microscopio óptico (examen en fresco, gota gruesa-frotis), por métodos de concentración de parásitos (microhematocrito, concentración de Strout), o tras la expansión parasitaria en insectos (xenodiagnóstico), animales de experimentación y cultivo *in vitro* (hemocultivo) (Strout 1962; Segura, Cura et al. 1974; Abramo Orrego, Lansetti et al. 1980). Dichos métodos de detección pueden ser empleados para determinar la transmisión congénita, sin embargo en esta fase la concentración de parásitos en sangre es variable y dependiente del momento de la transmisión, que puede ser incluso durante el parto (Luquetti, Dias et al. 2005).

En la fase crónica de la enfermedad, el nivel de parasitemia en sangre periférica es muy bajo, por lo que no pueden ser empleados métodos directos de detección del parásito. Por ello, el diagnóstico de la infección en esta fase se lleva a cabo empleando métodos serológicos y moleculares (PCR). Los métodos serológicos usados (hemaglutinación indirecta (IHA), inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)), se basan en la detección de anticuerpos frente a antígenos específicos de *T. cruzi*. El antígeno empleado en dichas pruebas serológicas, puede ser extractos solubles de proteínas totales aisladas del parásito, antígenos recombinantes o bien péptidos sintéticos. Los resultados positivos deben ser confirmados con 2 técnicas serológicas que utilicen antígenos distintos y una tercera en caso de discordancia (WHO 2002). En el caso de transmisión congénita, resultados serológicos positivos podrían deberse a una transferencia pasiva de anticuerpos de la madre, los cuales pueden ser detectados hasta los 6-9 meses de edad (Gomes, Lorena et al. 2009). Por ello, estos ensayos deben ser repetidos transcurrido este período.

Aunado a las pruebas diagnósticas de laboratorio, se recomienda realizar una exploración física del paciente para determinar posibles alteraciones en órganos diana. En este sentido, el diagnóstico de la afectación cardíaca inicialmente se lleva a cabo mediante electrocardiograma (ECG), radiografía de tórax, y ecocardiografía. En caso de

detectar alguna anomalía el paciente será evaluado empleando las pruebas que se consideren relevantes para determinar el grado de patología. Por otro lado, la afectación digestiva se determina llevando a cabo un esofagograma y un enema opaco para la evaluación colónica (Rezende J. M. 2000).

1.1.6.- Fases y manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas se desarrolla en dos fases comprendidas por una etapa de infección aguda, con un bajo índice de mortalidad, y una etapa crónica que puede ser o bien asintomática (fase indeterminada) o bien sintomática con compromiso miocárdico, intestinal o neurológico progresivo.

1.1.6.1.- Fase aguda.

Esta fase de la enfermedad que tiene una duración de 4 a 8 semanas, se caracteriza por una alta parasitemia circulante detectable en sangre periférica (Bern, Martin et al. 2011) la cual disminuye progresivamente, luego del desarrollo de la respuesta inmunitaria.

Durante este período agudo, el paciente puede permanecer asintomático, o presentar manifestaciones clínicas leves e inespecíficas (fiebre, temblores, vómitos, diarrea, etc.) por lo que normalmente pasa desapercibido (Prata 2001). Un bajo porcentaje de personas infectadas (<1%), principalmente niños o adultos inmunosuprimidos, pueden presentar un cuadro infeccioso severo con miocarditis, meningitis o encefalitis (Bern, Martin et al. 2011), siendo la tasa de mortalidad en esta fase inferior al 5%.

En algunos casos agudos sintomáticos se evidencia la vía de entrada del parásito, ya sea a través de la membrana conjuntival (signo de Romaña) (figura I5A) o bien a través de una herida en la piel (chagoma) (figura I5B) (Bern, Martin et al. 2011). Dichas lesiones representan un elemento de alto valor diagnóstico.

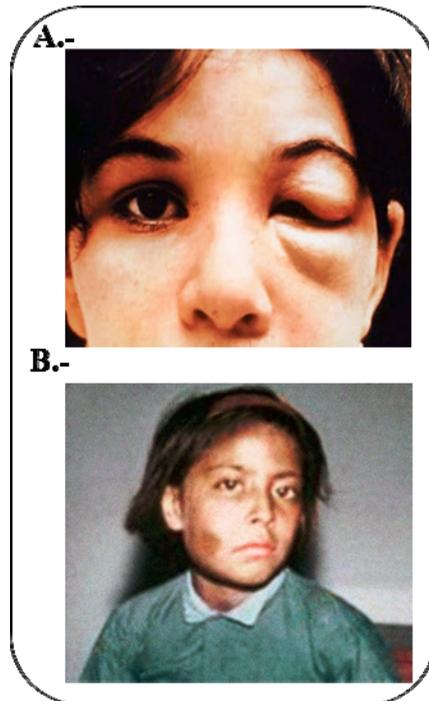


Figura 15- Lesiones en sitios de entrada de *T. cruzi* en pacientes en fase aguda de la enfermedad. A.- signo de Romaña, B.- chagoma de inoculación en la mejilla. Las imágenes fueron tomadas de: <http://apuntesdemed.blogspot.com/2008/04/trypanosomosis-enfermedad-de-chagas.html> y <http://areyesmed406.files.wordpress.com/2011/03/romana.jpg>.

1.1.6.2.- Fase crónica.

Fase crónica Indeterminada o asintomática

Tras la fase aguda, la mayoría de los pacientes entran en una etapa clínicamente silenciosa que puede prolongarse de 10 a 30 años tras la infección (Prata 2001). Durante esta fase, la presencia del parásito puede ser determinada mediante detección de anticuerpos en suero. Los pacientes en esta fase de la enfermedad, tienen una calidad y esperanza de vida similar a individuos sanos (Ribeiro and Rocha 1998).

Fase crónica sintomática

Tras el período asintomático, aproximadamente el 20-30% de los individuos infectados desarrollan alteraciones cardíacas progresivas e irreversibles. Así mismo, con menor frecuencia, pueden observarse lesiones en el sistema digestivo y en el sistema nervioso central y periférico.

Fase cardíaca: es la forma clínica más frecuente y grave de la fase crónica de la enfermedad. El alto índice de mortalidad asociado con la patología cardíaca se debe a diversos factores relacionados tales como, extensión del daño en miocardio, deterioro de la función cardíaca y presencia de arritmia ventricular.

Electrocardiogramas obtenidos en estudios longitudinales en áreas endémicas, han mostrado que, aproximadamente, el 2 % de los pacientes en fase indeterminada, progresan cada año a la forma cardíaca, presentando alteraciones leves del electrocardiograma que comprenden bloqueo de la rama derecha del haz de Hiss y un hemibloqueo anterior izquierdo. Estas alteraciones asintomáticas pueden mantenerse por un largo periodo o durante toda la vida del paciente. Sin embargo, puede observarse una progresión de la enfermedad a formas cardíacas graves. En este sentido, factores tales como, duración de la enfermedad, cepa del parásito, sexo masculino, actividad física intensa, reinfección de *T. cruzi*, estado nutricional, edad, y gravedad de la infección aguda, están asociados con la progresión de la cardiopatía Chagásica (Prata 2001).

De acuerdo al grado de compromiso cardíaco, los pacientes pueden ser separados en cuatro grupos siguiendo las clasificaciones descritas por Kuschnir (Tabla I) (Kuschnir, Sgammini et al. 1985):

Grupo 0: pacientes asintomáticos, con electrocardiograma y radiografía de tórax normales.

Grupo I: pacientes con alteraciones electrocardiográficas leves (bloqueo de la rama derecha, hemibloqueo anterior o posterior, extrasístoles ventriculares polifocales o con formas repetitivas, taquicardia ventricular sostenida y/o fibrilación ventricular) y radiografía de tórax normal.

Grupo II: pacientes con alteraciones electrocardiográficas severas (bloqueo aurículo-ventricular de 2^{do} y 3^{er} grado y depresión del nódulo sinusal) y cardiomegalia en la radiografía de tórax.

Grupo III: pacientes con alteraciones electrocardiográficas severas, cardiomegalia y signos clínicos y radiológicos de insuficiencia cardíaca con evidencias de lesión miocárdica.

Tabla II.- Clasificación de la cardiopatía chagásica crónica según Kuschnir.

| | Clasificación de Kuschnir | | | |
|---------------------------|---------------------------|---|---------------|------------------------|
| | 0 | I | II | III |
| <i>Serología</i> | + | + | + | + |
| <i>Electrocardiograma</i> | Normal | Patológico (principalmente alteraciones de la conducción intraventricular o extrasistolia ventricular) | | Patológico |
| <i>Rx Tórax</i> | Normal | Normal | Cardiomegalia | Cardiomegalia |
| <i>Sintomatología</i> | Asintomático | Asintomático | Asintomático | Insuficiencia Cardíaca |

Fase digestiva: el 15-20% de los pacientes pueden desarrollar alteraciones de motilidad, secreción y absorción del tracto digestivo, especialmente en esófago y colon. Los cambios de motilidad primero surgen con tránsito lento y estreñimiento, seguido por dilatación del órgano afectado (megaesófago (grado I a IV) o megacolon) (Prata 2001). La prevalencia de estas manifestaciones están vinculadas a la cepa del parásito siendo más frecuentes en la región central de Brasil, menos frecuente en Bolivia y prácticamente inexistente en los países al norte de la cuenca amazónica, América Central y México (Miles, Feliciangeli et al. 2003; Campbell, Westenberger et al. 2004). Si bien la tasa de mortalidad asociada es baja, conlleva un importante deterioro de la calidad de vida de los pacientes. Esta fase de la enfermedad es difícil de diagnosticar al confundirse los síntomas con estados aparentemente normales, pudiendo por lo tanto estar bajo estimada.

Fase cardiodigestiva: esta forma es la asociación de la sintomatología cardíaca con la sintomatología digestiva (megaesófago o megacolon). En la mayoría de los países, el desarrollo de megaesófago por lo general precede a las patologías cardíacas y de colon (Rassi, Rassi et al. 2012).

La reactivación de la enfermedad de Chagas puede ocurrir en pacientes en fase crónica que se encuentran inmunológicamente comprometidos, bien por tratamientos farmacológicos inmunosupresores o por co-infección con HIV (Braz, Amato Neto et al. 2008). En algunos casos de reactivación graves pueden observarse alteraciones en el sistema nervioso central.

Así, el desarrollo natural de la enfermedad de Chagas puede resumirse como se muestra en la figura I6.

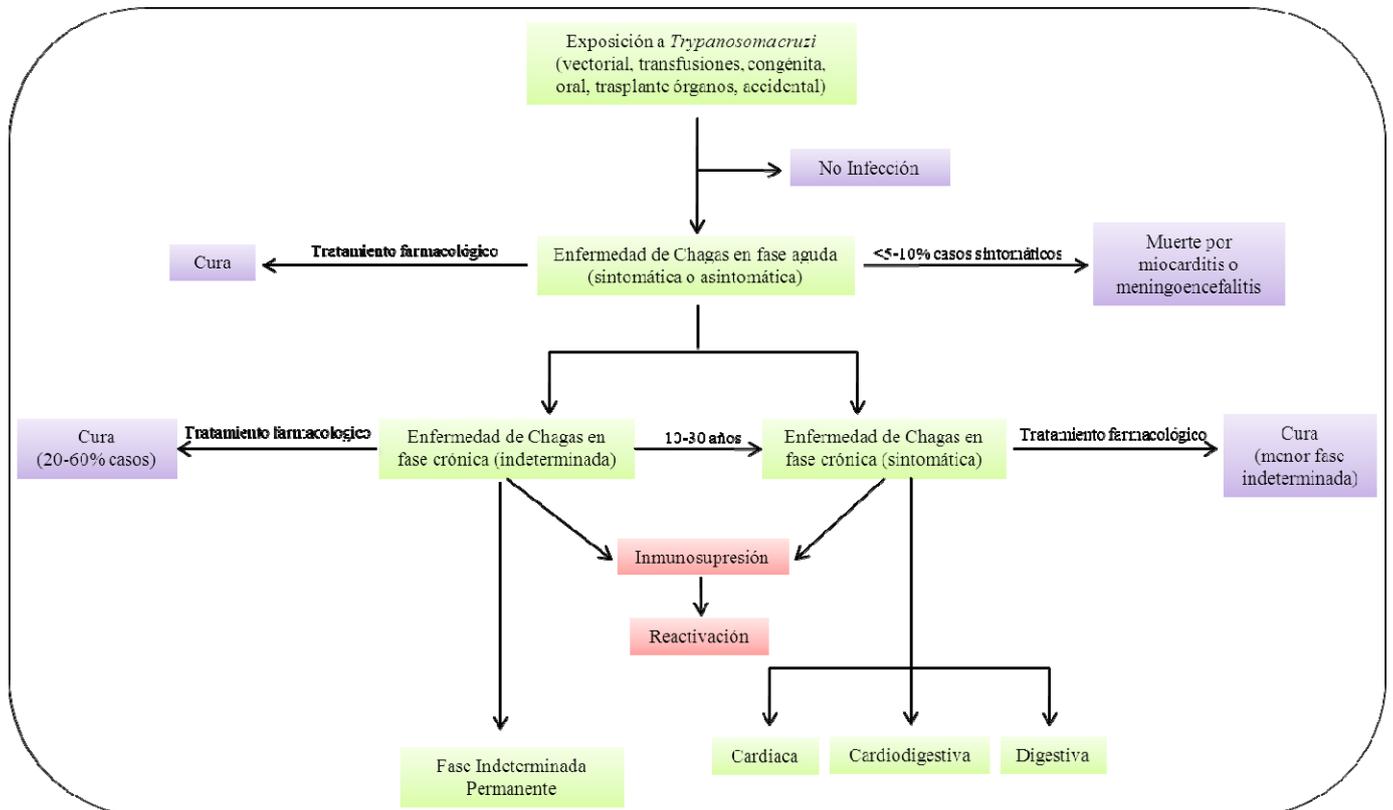


Figura I6.- Desarrollo natural de la enfermedad de Chagas en humanos. Modificado de (Rassi, Rassi et al. 2010).

1.1.7.- Tratamiento para la enfermedad de Chagas

Actualmente no existe un fármaco ideal para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, que actúe tanto sobre el parásito circulante en sangre como el presente en tejidos, y ello sin producir reacciones secundarias adversas, siendo la toxicidad y la eficacia de las drogas actualmente utilizadas la limitación del tratamiento empleado. Si bien, han sido investigados una gran cantidad de compuestos candidatos para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas, sólo dos de ellos superaron la etapa clínica:

Benznidazol (Radanil®, Roche (1972)) (figura I7A), es un nitroimidazol cuyo mecanismo de acción, se basa en la producción de metabolitos reducidos del grupo nitro, los cuales se unen covalentemente a macromoléculas celulares componentes del

parásito (ADN, lípidos y proteínas). El tratamiento con este fármaco se basa en una dosis de 5mg/kg/día durante 60 días.

Nifurtimox (Lampit®, Bayer (1967)) (figura I7B), es un nitrofurano cuya acción anti parasitaria se basa en su capacidad de formar aniones superóxidos, peróxido de hidrógenos y radicales hidroxilo. La presencia de estos radicales libres es letal para *T. cruzi*, dado que este no posee los mecanismos necesarios para su eliminación, produciéndose así, daños celulares que incluyen lesión de la membrana, inactivación de enzimas, daños en el ADN y mutagénesis. La dosis administrada de este fármaco es de 10mg/kg/día, y al igual que en el caso del Benznidazol se recomienda una duración de tratamiento de 60 días.

Como primer tratamiento se recomienda el uso del Benznidazol dado que este fármaco tiene un mejor perfil de seguridad y eficacia (Viotti, Vigliano et al. 2009; Murcia, Carrilero et al. 2012), presentando una menor incidencia de efectos secundarios.

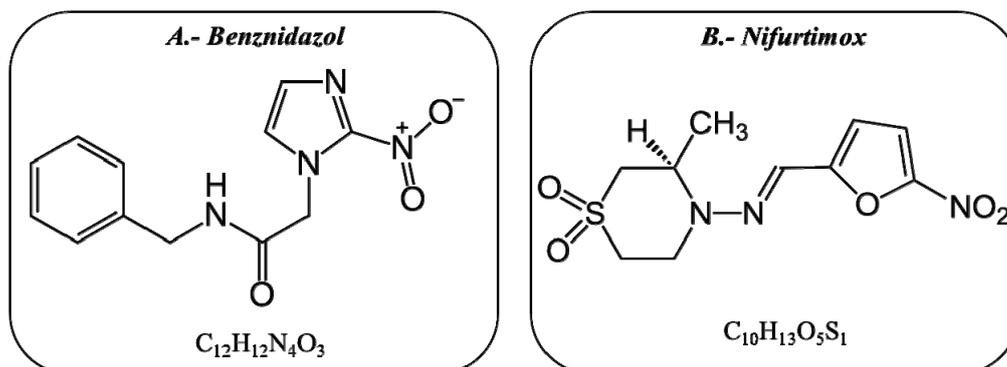


Figura I7.- Formula química de los medicamentos empleados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. A.- Benznidazol, B.- Nifurtimox.

Hay estudios que indican que en la fase aguda de la enfermedad, la administración tanto de benznidazol como de nifurtimox ayuda a controlar la infección y disminuye la probabilidad de cronicidad (de Andrade, Zicker et al. 1996; Jannin and Villa 2007). Así, en lactantes y en niños se observa una alta tasa de curación cercana al 100% (Schijman, Altchek et al. 2003) y al 60% respectivamente (de Andrade, Zicker et al. 1996; Andrade, Martelli et al. 2004). Así mismo, ha sido demostrados que el tratamiento de madres embarazadas evita la transmisión de la enfermedad (Murcia,

Carrilero et al. 2013). Sin embargo, la eficacia terapéutica de estos fármacos disminuye con el avance de la infección, existiendo controversias sobre su efectividad en la fase crónica de la enfermedad (Sosa-Estani and Segura 2006). A pesar de ello, existe una tendencia creciente a ofrecer tratamiento anti-tripanosómico a todos los pacientes con enfermedad de Chagas (Viotti, de Noya et al. 2013). En este sentido, ha sido descrito que el tratamiento con benznidazol en pacientes en fase indeterminada de la enfermedad de Chagas induce, a largo plazo una disminución significativa tanto en la progresión de la enfermedad, como en el nivel de anticuerpos frente al parásito, lo cual sería consistente con una reducción o eliminación de la carga parasitaria (Viotti, Vigliano et al. 2011). En este sentido, estudios clínicos han mostrado que el 80% de los pacientes tratados con benznidazol tuvieron una eliminación sostenida del parásito tras 12 meses post-tratamiento (DNDi 2013). Sin embargo, una de las limitaciones de los actuales fármacos empleados es que actúan, esencialmente, frente a las formas sanguíneas del parásito las cuales en fase crónica son poco frecuentes. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos que sean capaces de controlar el parásito en los tejidos, con una mayor eficacia y menor toxicidad.

En este sentido, los fármacos inhibidores de la síntesis de ergosterol tales como, ketoconazol, posaconazol e itraconazol son importantes candidatos para su uso como agente farmacológico en la enfermedad de Chagas. El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en la inhibición de la síntesis de *novo* de esteroides, los cuales son esenciales para la proliferación y viabilidad parasitaria. Estudios en modelos murinos de enfermedad de Chagas crónica, han demostrado que el posaconazol conlleva a la eliminación de amastigotes intracelulares en células cardíacas infectadas (Urbina 2009).

Así mismo, una posible estrategia para mejorar la eficacia de los tratamientos actuales es la combinación de medicamentos existentes con diferentes mecanismos de acción. En otras enfermedades infecciosas tales como malaria, SIDA y tuberculosis ha sido demostrado, que el tratamiento con más de un agente terapéutico puede aumentar la eficacia, debido a su doble mecanismo de acción y a los efectos sinérgicos que permiten reducir la dosis de cada uno de los fármacos, disminuyendo la probabilidad de efectos adversos. En este sentido, ha sido descrito que la combinación de benznidazol con alopurinol, el cual es otro de los fármacos que ha sido empleado para el tratamiento en fase crónica de la enfermedad, induce modificaciones significativas en el fenotipo de células T así como en el perfil de respuesta de células B lo que indica, reducción de la

carga parasitaria, y sostiene la viabilidad de la administración de dos fármacos antiparasitarios en la fase crónica de la enfermedad de Chagas (Perez-Mazliah, Alvarez et al. 2013) .

1.1.8.- Biomarcadores de eficacia-rechazo (efecto) terapéutico en la enfermedad de Chagas

La eficacia del tratamiento farmacológico contra la enfermedad de Chagas, podría ser evaluado combinando técnicas diagnósticas (serológicas y moleculares) con la evaluación clínica del paciente. Sin embargo, aunque estas técnicas tienen alta sensibilidad y especificidad (Britto, Silveira et al. 2001) presentan la desventaja de requerir tiempos de seguimiento muy prolongados, para evidenciar alguna alteración en individuos con infección crónica (Viotti, Vigliano et al. 1994) (Fabbro, Streiger et al. 2007). Así, dichas metodologías no son adecuadas para evaluar el estatus clínico del paciente en su fase crónica, ni permiten determinar la evolución de la enfermedad post-tratamiento. Por ello, es necesario el desarrollo de marcadores que permitan evaluar la progresión de la enfermedad y posibiliten determinar la eficacia terapéutica frente a la infección (Requena-Mendez, Lopez et al. 2013).

Un biomarcador idóneo para evaluar la evolución de esta patología sería aquel que permitiera tras obtener resultados negativos, descartar con certeza la progresión de la enfermedad y por ende no tendría que ser necesario, ni el tratamiento, ni el seguimiento del individuo. Así mismo, un biomarcador adecuado para detectar las primeras etapas de la enfermedad cardíaca o digestiva, tendría que tras obtener un resultado positivo, establecer el exhaustivo seguimiento del paciente para mejorar la gestión de futuras complicaciones de la enfermedad.

a) Biomarcadores detectores de etapas tempranas de la patología cardíaca y digestiva.

Péptidos natriuréticos: estos péptidos han sido descritos como marcadores de fallo terapéutico. En la enfermedad de Chagas ANP (péptido natriurético atrial), BNP (péptido natriurético cerebral) y el precursor N-terminal pro BNP han sido asociados con alteraciones cardíacas (daño en la fracción de eyección del ventrículo derecho, arritmias complejas ventriculares y disfunción diastólica del ventrículo izquierdo)

(Talvani, Rocha et al. 2005; Garcia-Alvarez, Sitges et al. 2010). Así, ha sido demostrado que la combinación de pruebas clínicas (electrocardiograma) con la determinación de BNP, es más eficiente para la determinar la disfunción del ventrículo izquierdo en pacientes con enfermedad de Chagas con respecto a otras pruebas convencionales (Ribeiro, Teixeira et al. 2006). Así mismo, estudios demuestran que altos niveles de BNP o ANP incrementan el riesgo de muerte y de necesidad de un trasplante cardiaco (Lima-Costa, Cesar et al. 2010). En este sentido, es necesario determinar si en pacientes en fase indeterminada con elevados valores de BNP con respecto a individuos sanos podrían desarrollarse patologías cardiacas.

Apolipoproteína A1 (Apo A1): Esta proteína ha sido descrita como un biomarcador negativo de la enfermedad de Chagas, encontrándose en pacientes en fase indeterminada bajos niveles de Apo A1 (Cano, Rubiolo et al. 1985).

CRA/FRA: Diversos trabajos han propuesto las proteínas CRA (antígenos del citoplasma de las formas epimastigote y amastigote) y FRA (antígenos del flagelo de las formas tripomastigote y epimastigote) como moléculas indicadoras de las distintas fases de la enfermedad. Observándose una respuesta diferencial, a nivel de anticuerpos de isotipo IgG2 frente al antígeno FRA, entre pacientes en fase IND y CARD (Vercosa, Lorena et al. 2007). La determinación de anticuerpos de isotipo IgA frente a dichas proteínas, demostró que, estas son capaces de diferenciar pacientes en fase indeterminada de pacientes con manifestaciones clínicas cardiacas y digestivas (CARD-DIG) (Vasconcelos, Amaral et al. 2010).

Citoquinas: Estudios del perfil de secreción de citoquinas *ex vivo* en leucocitos circulantes en fase crónica, mostraron que, los pacientes IND muestran un perfil de citoquinas reguladoras, mientras que los pacientes en fase cardiaca presentan un perfil proinflamatorio (Vitelli-Avelar, Sathler-Avelar et al. 2008). Así estudios fenotipos de células T en diferentes formas clínicas de la enfermedad, evidenciaron que *in vivo* los pacientes IND poseen células T reguladoras aumentadas, sugiriendo que la secreción de IL10 se relaciona con el control de la enfermedad en pacientes IND (de Araujo, Vitelli-Avelar et al. 2011).

Así, las citoquinas IFN- γ , IL-4 y TNF- α han sido propuestas como marcadores inmunológicos de la forma clínica cardíaca de la enfermedad de Chagas. Observándose que, la estimulación de células provenientes de pacientes, en fase indeterminada y cardíaca de la enfermedad, con las proteínas CRA y FRA muestran un mayor nivel de secreción de citoquinas (IFN- γ y TNF- α) frente a la proteína CRA en pacientes crónicos cardíacos (Lorena, Lorena et al. 2010).

En este sentido, diversos estudios han mostrado un incremento significativo en los niveles de secreción de TNF- α en pacientes en fase crónica cardíaca de la enfermedad con respecto a individuos sanos (Ferreira, Ianni et al. 2003; Talvani, Rocha et al. 2004). Interesantemente, en pacientes con alteraciones cardíacas inducidas por diversas etiologías se observa un incremento en los niveles de TNF- α lo cual ha sido asociado con la activación del sistema renina-angiotensina observada igualmente en pacientes fase cardíaca avanzada de la enfermedad de Chagas (Levine, Kalman et al. 1990). Así TNF- α y otros miembros de la familia de TNF tales como CD95L han mostrado una correlación inversa con la fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF) en pacientes con enfermedad de Chagas sugiriéndose así su uso como un potencial biomarcador de cardiomiopatía (Lula, Rocha et al. 2009).

Linfocitos T CD8: el estudio fenotípico de los linfocitos T CD8⁺ circulantes mostró un aumento en el número total de células efectoras/memoria en sujetos con dolencias cardíacas frente a individuos no infectados. Estos resultados fueron consistentes con la hipótesis de un agotamiento gradual clonal en la población CD8⁺, quizás como resultado de una estimulación continua antigénica por células infectadas (Albareda, Laucella et al. 2006).

b) Biomarcadores de cura terapéutica.

Reacción en cadena de la polimerasa: Técnicas moleculares basadas en la detección de ADN del parásito en muestras de sangre periférica o de tejidos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido empleadas como herramienta para la detección temprana de fallos terapéuticos. Dada la especificidad de las secuencias de *T. cruzi* que son amplificadas, esta técnica tiene una alta sensibilidad pudiéndose detectar la presencia de un parásito en diez mililitros de sangre (Avila,

Sigman et al. 1991; Britto, Cardoso et al. 1993). Así mismo, existen métodos de PCR cuantitativa que permiten evaluar muestras de sangre periférica en humanos (Duffy, Bisio et al. 2009).

Esta técnica presenta alta especificidad en el diagnóstico y monitoreo del tratamiento en pacientes en fase aguda de la infección y en casos de transmisión congénita por *T. cruzi* (Schijman, Altcheh et al. 2003). Dependiendo de la carga parasitaria en fase crónica de la enfermedad, se detecta material genético de *T. cruzi* en aproximadamente 60% de los pacientes con serología positiva en zonas endémicas de la infección, evidenciándose la limitación de esta técnica para evaluar la fase crónica de la enfermedad que cursa con baja parasitemia. En este sentido, ha sido demostrado que el porcentaje de detección de pacientes con fase crónica mediante la técnica de PCR disminuye a medida que aumenta la edad del paciente y el tiempo de vida en zonas no endémicas (Murcia, Carrilero et al. 2010).

Así mismo, a pesar del potencial de esta técnica ha sido observado que el nivel de sensibilidad y especificidad puede variar dependiendo de diversos factores técnicos, tales como volumen y condiciones de almacenamiento de la muestra a ensayar, métodos utilizados para el aislamiento del material genético del parásito, variabilidad genética de este, así como, los cebadores, reactivos y condiciones empleadas en la reacción de PCR (Britto 2009). Así, aunque esta técnica permite identificar fallo terapéutico cuando la detección de ADN de *T. cruzi* en sangre periférica es positiva (Murcia, Carrilero et al. 2010), no permite predecir el éxito del tratamiento dado que resultados negativos no son necesariamente indicativos de cura parasitológica al presentar la técnica un porcentaje de falsos negativos superior al 60% (Rassi, Rassi et al. 2010). De hecho, no hay una correlación directa entre resultados de PCR negativos e infección por *T. cruzi*. Por ello, actualmente se están realizando esfuerzos con el objetivo de estandarizar las técnicas de PCR para su aplicación como criterio válido de diagnóstico (Schijman, Bisio et al. 2011).

Anticuerpos líticos: Estos anticuerpos tienen capacidad funcional de activar la lisis de tripomastigotes mediada por el sistema del complemento (Krettli AU y col., 1979). A diferencia de los anticuerpos que reconocen parásitos enteros o fracciones antigénicas completas o semipurificadas de epimastigotes utilizadas en las serologías convencionales, los anticuerpos líticos descienden con el xenodiagnóstico en pacientes

con enfermedad de Chagas crónica tras el tratamiento farmacológico (Krettli AU y col., 1982).

KMP11, PFR2, HSP70, Tgp63: Se observa un descenso significativo en los títulos de anticuerpos específicos de 4 proteínas recombinantes derivadas de *T. cruzi* en pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica a tiempos tempranos, entre 6-9 meses postratamiento con Benznidazol (Fernandez-Villegas, Pinazo et al. 2011).

Si bien, se han propuesto potenciales biomarcadores para la detección temprana de patología cardíacas. La validación de este tipo de herramientas clínicas es imprescindible, a fin de identificar a los pacientes de alto riesgo que requieran un exhaustivo seguimiento y tratamiento temprano. Con respecto a los pacientes en fase indeterminada de la enfermedad, no existe actualmente ningún biomarcador que permita a priori predecir cómo va a progresar la enfermedad. A pesar de que algunos de estos biomarcadores puedan ser útiles para evaluar la cura de la infección tras el tratamiento farmacológico, se requieren estudios prospectivos con un seguimiento más prolongado.

1.2.- Inmunología e inmunopatología de la enfermedad de Chagas

El desarrollo de la infección por *T. cruzi* involucra interacciones complejas entre el huésped y el parásito. Las reacciones de defensa del huésped frente a la infección son numerosas y variadas, e implican mecanismos efectores de la respuesta inmunitaria innata y adquirida (Tarleton 2007). Esta compleja respuesta que se desarrolla en distintos compartimientos del sistema inmunitario, se caracteriza principalmente por procesos de proliferación celular, producción de citoquinas, e inducción de mecanismos de muerte celular (de Meis, Morrot et al. 2009). Como consecuencia de la respuesta desencadenada, el parásito pasa a ser combatido continuamente y su multiplicación en los tejidos del hospedero se reduce. En este sentido, la patogenicidad y persistencia del parásito está críticamente influenciada por la efectividad de la respuesta inmunológica del huésped, y por la habilidad del patógeno para evadir los mecanismos efectores del sistema inmunológico, pudiendo ser éste capaz de persistir indefinidamente en el hospedador. Tanto la diversidad genética de *T. cruzi* como la genética del hospedador resultan determinantes en la patología de la enfermedad, donde las lesiones en los

tejidos resultantes de esa actividad inmunológica se acumulan, llevando eventualmente a alteraciones funcionales musculares y nerviosas características de la enfermedad de Chagas crónica (Tarleton, Reithinger et al. 2007).

1.2.1.- Respuesta inmunitaria innata frente a T. cruzi

En la fase inicial de la infección, el parásito en su forma tripomastigote metacíclico una vez traspasa la barrera epidérmica y penetra al interior de la células, se diferencia a la forma amastigote. Tras varios ciclos de replicación los amastigotes se diferencian en tripomastigotes los cuales, rompen las células y pasan nuevamente al espacio intersticial. En esta fase, tanto el parásito como el contenido de la vacuola parasitofórica inducen elementos de la respuesta inmunitaria innata, sea por patrones moleculares asociados a patología que estimulan a receptores que reconocen dichos patrones, o por otros receptores que interactúan con ellos. Así, se activan vías de reconocimiento innato dependientes de My88 y TRIF en macrófagos y células dendríticas (Tarleton 2007). Diferentes moléculas del parásito han mostrado ser potentes estimuladores de la respuesta inmunitaria innata conllevando a la activación tanto de células fagocíticas (células dendríticas, neutrófilos y macrófagos) como de células NK y NKT (Abrahamsohn 1998; Brener, Andrade et al. 2000; Savino, Villa-Verde et al. 2007; Ferraz, Gazzinelli et al. 2009).

En la fase aguda de la infección, el parásito estimula la producción de las citoquinas TNF- α , IL-2 e IL-12, las cuales podrían ser responsables de la elevada actividad citotóxica y secretora de IFN- γ por parte de las células NK (Aliberti, Souto et al. 2001). En este sentido, ha sido demostrado que el IFN- γ derivado de las células NK está involucrado en limitar la expansión de los parásitos en macrófagos, principalmente a través de mecanismos mediados por óxido nítrico (Silva, Machado et al. 2003).

El microambiente de citoquinas producido, conjuntamente con la activación de células presentadoras de antígenos, conllevan a la activación de linfocitos T y B comenzando a conformarse la respuesta inmunitaria adaptativa la cual tiene un rol central en el control de la infección, en esta fase de la enfermedad.

1.2.4.- Actividad Indolamil-deoxigenasa (IDO) frente a T. cruzi

En modelos experimentales ha sido demostrado que el control de la infección por *T. cruzi* durante la fase aguda de la enfermedad es críticamente dependiente de la

activación eficaz de macrófagos, y de la producción de óxido nítrico dada la regulación positiva de la isoforma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) (Gazzinelli, Oswald et al. 1992; Silva, Vespa et al. 1995). Sin embargo, la presencia de altos niveles de óxido nítrico y citoquinas pro-inflamatorias puede ser perjudicial para el hospedador induciendo lesiones en los tejidos (Roggero, Perez et al. 2002). Por ello, con el fin de limitar el potencial daño producido por una respuesta inflamatoria exacerbada, el sistema inmunitario desarrolla mecanismos inmuno-reguladores, tales como regulación negativa en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, inducción de células T reguladoras y regulación positiva de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). (Knubel, Martinez et al. 2010)

IDO es una enzima intracelular que ha mostrado expresarse constitutivamente en modelos celulares humanos y de ratón. Esta enzima citosólica presente en células del sistema inmunitario innato tales como macrófagos y células dendríticas, cataliza la degradación del triptófano en la vía metabólica de la quinurenina, que resulta en la acumulación de catabolitos inmunosupresores en el ambiente extracelular (Munn and Mellor 2007).

La degradación oxidativa del triptófano se produce al romper la unión del doble enlace en posición 2,3 en el anillo indólico dando lugar a N-formil-quinurenina, que es rápidamente metabolizada a quinurenina. Si bien IDO presenta una actividad enzimática baja sus niveles pueden aumentar hasta 1000 veces cuando es inducida por factores que activan el sistema inmunológico como: interleuquinas 1 y 2, interferones γ y β , lipopolisacárido bacteriano (LPS) y algunos virus tales como HIV. Así, el promotor del gen IDO contiene múltiples elementos de secuencia que confieren capacidad de respuesta a mediadores proinflamatorios, demostrándose así la fuerte correlación entre la inflamación y la expresión inducida de IDO (Fujigaki, Saito et al. 2001).

IDO forma parte de la defensa innata del hospedador contra patógenos infecciosos, siendo demostrada su capacidad para inhibir la proliferación de patógenos intracelulares a través del consumo del aminoácido esencial triptófano (Byrne, Lehmann et al. 1986). Así, en modelos de infección experimental aguda ha sido descrito que la producción de quinureninas mediada por IDO conduce al control de la infección por *T. cruzi* (Mellor and Munn 2004). Así mismo, la carencia de triptófano y la acumulación de quinureninas inhibe la proliferación de células T, promueve la muerte o anergia en linfocitos T, y ejerce efectos diferenciales sobre la respuesta de linfocitos T CD4 cooperadores (Terness, Bauer et al. 2002; Munn, Sharma et al. 2005).

Si bien IDO podría tener un efecto directo *in vitro* sobre la replicación de diferentes agentes patógenos, el papel específico de esta enzima en la respuesta del hospedador frente a diferentes infecciones *in vivo*, no es tan evidente debido a la compleja función de IDO en la inmuno-regulación e interacción parásito-hospedador (Knubel, Martínez et al. 2010).

Así, la inmunosupresión y generación de células T reguladoras durante la infección, podrían ser una consecuencia de la expresión IDO por células del sistema innato llevando a la supresión de la respuesta de células T específicas antes de la eliminación del patógeno. No obstante el control de la infección, seguido de la inmediata activación de mecanismos inmuno-reguladores, constituye un papel crucial de la actividad IDO (Knubel, Martínez et al. 2010).

1.2.2.- Respuesta inmunitaria adaptativa frente a T. cruzi

En la fase aguda de la enfermedad, el proceso de diferenciación, replicación y metabolismo de *T. cruzi*, conlleva la liberación de una variedad de proteínas al citosol de la célula infectada, que son susceptibles a la degradación por el proteosoma. Esto resulta en la generación de péptidos, que potencialmente pueden ser presentados en el contexto de la molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Los linfocitos T CD8⁺ capaces de reconocer este complejo, inician una respuesta péptido-específica, que desencadena los mecanismos de acción necesarios para la eliminación de la célula infectada. Estos mecanismos se basan, principalmente, en proliferación celular, secreción de citoquinas y actividad citotóxica mediada por proteínas tales como perforinas y granzimas (figura 18). Las perforinas generan poros que permiten el paso de agua y electrolitos, induciendo lisis osmótica, mientras que las granzimas son proteínas pertenecientes a la familia de las serín proteasas que entran a la célula a través de los poros formados en la membrana por la perforina, induciendo la muerte celular programada (apoptosis) de la célula diana. Así mismo, la activación de estos linfocitos conlleva la secreción de citoquinas inflamatorias tales como INF- γ y TNF- α . En este sentido, el predominio de linfocitos T CD8⁺ en infiltrados inflamatorios de tejidos infectados y su capacidad de inducir actividad citotóxica y secretora de IFN- γ ante el estímulo con el parásito, indican el importante rol de esta población de linfocitos T en la resistencia a *T. cruzi* (Martin and Tarleton 2005). Así mismo, en modelos murinos ha sido observado que la ausencia de linfocitos T CD8⁺ funcionales conlleva

un incremento en la carga parasitaria en tejidos, así como la incapacidad de sobrevivir a la infección por *T. cruzi*, sugiriéndose que el papel protector de dichos linfocitos en la enfermedad de Chagas reside tanto en su actividad citotóxica como en la secreción de citoquinas tipo Th1, especialmente $\text{INF-}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$ (Martin and Tarleton 2004) (Wizel, Nunes et al. 1997).

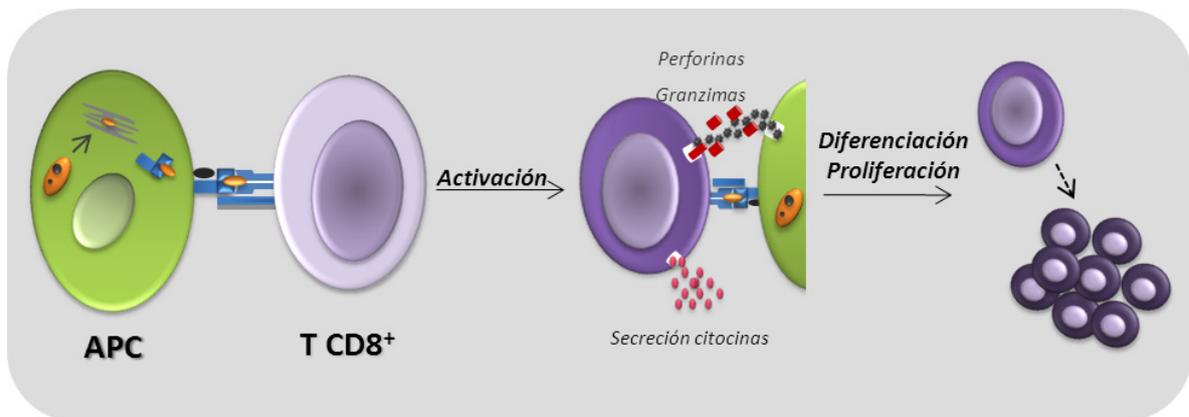


Figura 18.- Activación y funciones efectoras de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígenos de *T. cruzi*.

Así mismo, la respuesta inmunitaria desencadenada tras la infección está regulada por citoquinas producidas principalmente por linfocitos T CD4⁺ (Montiel and Díaz 2002). En este sentido, ha sido descrito un aumento de la parasitemia en personas co-infectadas con HIV dado el número reducido de linfocitos T CD4⁺, lo cual demuestra la importancia de estas células en el control de la enfermedad, siendo central el desarrollo de un perfil de tipo Th1 con producción de $\text{INF-}\gamma$ (Rosemberg, Chaves et al. 1992). Dependiendo de las citoquinas secretadas la respuesta será de tipo Th1, caracterizada por la producción de citoquinas ($\text{INF-}\gamma$, IL-2, IL-12 y $\text{TNF}\alpha$) que estimulan la respuesta T CD8⁺ efectora, o bien tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) que estimula la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Los linfocitos T CD8⁺ también pueden producir diferentes tipos de citoquinas en respuesta a la estimulación antigénica, polarizándose hacia perfiles Tc1/Tc2 (Woodland and Dutton 2003), aunque las vías de polarización de estas poblaciones son menos conocidas.

Recientemente ha sido descrito otro grupo de linfocitos T cooperadores denominados Th17, caracterizados por la producción de la citoquina proinflamatoria IL-17 (Jin, Zhang et al. 2008; Ouyang, Kolls et al. 2008). En este sentido, ha sido descrito que esta citoquina puede ser secretada por linfocitos T CD8⁺ sugiriendo que la diferenciación de estas células proviene del mismo precursor que diferencia a los

linfocitos TCD8⁺ productores de INF- γ . (Kondo, Takata et al. 2009). Modelos de infección experimental evidencian que IL-17 controla la diferenciación de células Th1 de ratones infectados (da Matta Guedes, Gutierrez et al. 2010). Así mismo, estudios en linfocitos de pacientes con enfermedad de Chagas (fases asintomáticas y cardíaca) han mostrado que los pacientes con patologías cardíacas tienen menor expresión de IL-17 y menor frecuencia de linfocitos T cooperadores productores de IL-17. Así, una alta expresión de esta citoquina es correlacionada con una mejor función cardíaca (Magalhaes, Villani et al. 2013).

Así, en esta fase inicial de la patología chagásica, la respuesta inmunitaria inducida por células Th1, se considera protectora (Briceno and Mosca 1996; Brener and Gazzinelli 1997). Mientras que, una mayoritaria respuesta por parte de las células Th2 caracterizada por el aumento de la producción de IL4 hace al huésped más susceptible a la infección por *T. cruzi* (Montiel and Díaz 2002). En este sentido, IL10 parece tener un importante papel en la mediación de la enfermedad de Chagas aguda dado que puede bloquear tanto la producción de IFN- γ como sus efectos sobre la replicación intracelular de *T. cruzi* en macrófagos peritoneales de ratón (O'Garra, Vieira et al. 2004). Esta importante citoquina supresora es producida por un gran número de células del sistema inmunitario, incluyendo los linfocitos T reguladores (Treg), tanto CD4⁺ como CD8⁺ (Lu and Cantor 2008), los cuales limitan el daño colateral asociado a la respuesta desencadenada (Shevach 2001).

Variaciones en la producción y secreción de citoquinas son encontradas de acuerdo al grado de afección tisular del paciente y a la susceptibilidad a la infección. En este sentido, en dos cepas de ratones fue demostrado un rápido aumento de los niveles de IL-12 e IFN- γ en la fase aguda de la infección experimental por *T. cruzi*, sugiriéndose así que la respuesta Th1 es determinante en la relación huésped – parásito, asociándose esta a un fenotipo de baja susceptibilidad a la infección (Planelles, Thomas et al. 2003). Adicionalmente, este patrón de citoquinas observado en respuesta a la infección con *T. cruzi*, fue asociado con la patología cardíaca observada en el huésped, encontrando cepas con una afinidad a desarrollar una respuesta Th1 por producción de IFN- γ , y otras cepas con afinidad para desarrollar una respuesta Th2 con producción de IL-4 conllevando esto a grandes diferencias en la miocarditis desarrollada (Briceno and Mosca 1996; Montiel and Díaz 2002). Estos resultados demuestran que en esta patología es crucial mantener un balance adecuado en la respuesta Th1/Th2 desencadenada favoreciéndose así un equilibrio entre los mecanismos inmunitarios que

controlan al parásito y los mecanismos inmunitarios que inducen la patología (Abrahamsohn 1998; Mosca and Briceño 2000).

Fase Crónica

La respuesta inmunitaria desencadenada en la fase inicial de la patología logra controlar la proliferación del parasitario y resolver los signos y síntomas clínicos de la etapa aguda de la enfermedad, estableciéndose un equilibrio con el parásito que conduce a la cronicidad de la infección.

En esta fase de la patología, ha sido sugerido que la sintomatología clínica observada, está vinculada de una manera directa a la eficiencia de la respuesta desencadenada. Así, una mayor severidad clínica ha sido descrita en pacientes con una baja frecuencia de células T CD8⁺ específicas de *T. cruzi* productoras de INF- γ , en relación a pacientes asintomáticos y con sintomatología leve (Laucella, Postan et al. 2004; Albareda, Olivera et al. 2009). Así mismo, en estos ensayos fue observada una baja respuesta antígeno-específica productora de IL-4. Este patrón de respuesta fue observado utilizando diversos estímulos antigénicos tales como: preparados de amastigotes de *T. cruzi*, células dendríticas autólogas infectadas con *T. cruzi*, o péptidos derivados de la superfamilia de las trans-sialidasas con alta afinidad de unión a HLA-A*02:01 (Albareda, Laucella et al. 2006; Alvarez, Postan et al. 2008). La caracterización fenotípica de la población total de linfocitos T en estos pacientes ensayados, muestra una disminución de la población de linfocitos TCD8⁺ vírgenes y un incremento en la frecuencia de células T CD8⁺ de memoria altamente diferenciados (CD45RA⁺CD27⁻CD28⁻) directamente proporcional al grado de patología (Albareda, Laucella et al. 2006). Un patrón similar fue observado en la población total de linfocitos T CD4⁺ de estos pacientes, evidenciando una activación crónica del sistema inmunológico del hospedador, vinculada a la exposición prolongada al parásito (Albareda, Olivera et al. 2009). Así, la pérdida de clones parásito-específicos capaces de inducir una respuesta protectora, el sustancial impacto sobre la población total de linfocitos T y rasgos de senescencia tanto en linfocitos T CD8⁺ como CD4⁺, evidencian un proceso de agotamiento funcional derivado de la infección crónica.

Sin embargo, otros estudios han mostrado resultados contradictorios observándose en PBMC de pacientes estimulados con epimastigotes o tripomastigotes de *T. cruzi*, una mayor frecuencia de linfocitos T parásito-específicos productores de INF- γ y TNF- α en pacientes con manifestaciones cardíacas severas con respecto a

pacientes asintomáticos. Así mismo, se observó una elevada secreción de IL-10 y una mayor frecuencia de linfocitos T reguladores en pacientes en fase asintomática (Souza, Rocha et al. 2004; Vitelli-Avelar, Sathler-Avelar et al. 2005; Araujo, Gomes et al. 2007; Vitelli-Avelar, Sathler-Avelar et al. 2008). Estos resultados sostienen que la producción de IFN- γ y TNF- α en respuesta al parásito estaría implicada en el desarrollo del daño cardíaco, mientras que la capacidad de los pacientes asintomáticos de modular la respuesta parásito-específica a través de la producción de IL-10 y la acción de linfocitos T reguladores, permitiría prevenir el desarrollo de daño cardíaco (Dutra and Gollob 2008; Fiuza, Fujiwara et al. 2009; de Araujo, da Silveira et al. 2011).

En este sentido, son muchos los parámetros implicados en la determinación de cuáles proteínas del parásito son inductoras de una respuesta de células T: la naturaleza del alelo restringido a MHC, la eficiencia del procesamiento del epítipo, la traslocación dentro del retículo endoplasmático, afinidad al TCR del linfocito T así como el grado de variabilidad del epítipo derivado de un patógeno altamente variable (Alvarez, Postan et al. 2008).

1.2.3.- Generación de linfocitos T de memoria

Generalidades

La respuesta inmunológica se desarrolla en cuatro fases principales: fase de iniciación, fase de expansión clonal, fase de contracción y finalmente generación de células T de memoria (figura I9). Tras el encuentro y reconocimiento antigénico, las células T proliferan y se diferencian en células efectoras y de memoria (Dutton, Bradley et al. 1998). Seguidamente a la activación, se presenta una fase de eliminación o contracción de la gran mayoría de las células T específicas. Las células sobrevivientes son células de memoria, las cuales son capaces de persistir estables por largos periodos de tiempo, mediante el mantenimiento de una actividad proliferativa lenta equivalente a la tasa de muerte celular (Kurtz 2004). Así, nuevos encuentros con el antígeno inducen una respuesta efectora más rápida y eficiente capaz de controlar la infección. Sin embargo, repetidos contactos con una persistente fuente de antígenos conduce a una rápida expansión seguida por una fase de muerte celular inducida por la activación, lo cual no favorece el desarrollo de células de memoria (Jones, Chin et al. 1990)

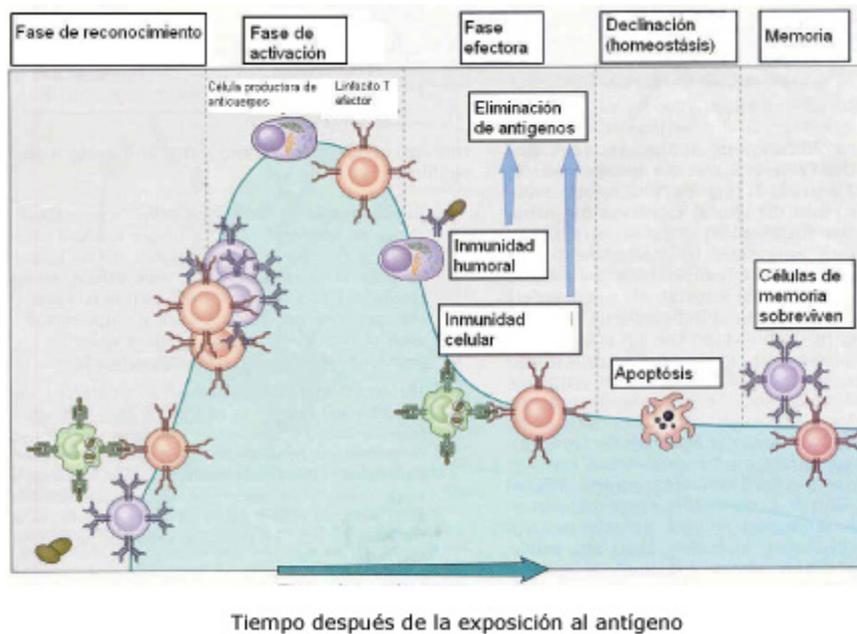


Figura 19.- Fase de la respuesta inmunológica adaptativa. Linfocitos específicos del antígeno sufren un proceso de expansión clonal en presencia del antígeno. Al producirse la eliminación del agente patógeno, la población celular expandida se contrae disminuyendo el número de linfocitos específicos los cuales son eliminados por mecanismos de muerte celular programada (apoptosis). Tras la fase de contracción, el número de linfocitos antígeno-específicos se estabiliza manteniéndose estos por un largo período de tiempo (memoria).

Las poblaciones de linfocitos T vírgenes, efectoras y de memoria pueden ser diferenciadas determinando la expresión de marcadores de superficie que permitan caracterizar estas células según su localización anatómica, su potencial de proliferación, su función efectora y sus requerimientos para su mantenimiento (Harari, Vallelian et al. 2004) (Appay, van Lier et al. 2008) (Seder, Darrah et al. 2008).

Así, los linfocitos T vírgenes humanos se caracterizan por expresar los marcadores de superficie CD45RA, CD62L, CCR7, CD27 y CD28. La activación linfocitaria conlleva la pérdida del marcador CD45RA para expresar la isoforma CD45RO⁺. En las etapas finales de diferenciación, estas células reexpresan el marcador CD45RA⁺, y pierden los marcadores CD27, CD28, CCR7 y CD62L, constituyendo la población de células totalmente diferenciadas o terminales (T_{EMRA}). Esta subpoblación se califica como efectora dada su alta capacidad citolítica con elevados niveles de expresión de la molécula perforina. Sin embargo, ha sido demostrado que no hay diferencias en la actividad citolítica entre esta subpoblación y la subpoblación de células con fenotipo de memoria menos diferenciado (CD27⁺CD28⁺), que también pueden expresar perforina (Hislop, Gudgeon et al. 2001; Mueller, De Rosa et al. 2001). Por ello, estudios proponen que dicha subpoblación de células totalmente diferenciadas

representan células senescentes, con reducida capacidad proliferativa, telómeros cortos y expresión del marcador de senescencia CD57 (Sadat-Sowti, Debre et al. 1994; Effros 2003) (Wherry and Ahmed 2004) (Akbar and Henson 2011).

Por otro lado, la expresión de receptores como la molécula de adhesión CD62L o el receptor de quimiocina CCR7 (Bjorkdahl, Barber et al. 2003), los cuales son mediadores del tráfico celular a tejidos linfoides, permite la clasificación fenotípica de los linfocitos de memoria en dos subpoblaciones: linfocitos T de memoria central (T_{CM} ; $CD62^+CCR7^+$) que tienen la capacidad de migrar a órganos linfoides secundarios y recircular; observándose tras su estimulación antigénica secreción de IL-2 y muy bajos niveles de IFN- γ , IL-4 e IL-5. Por otro lado los linfocitos T de memoria efectora (T_{EM} ; $CD62^-CCR7^-$) que migran a órganos periféricos no linfáticos y al ser estimulados producen rápidamente citoquinas efectoras como IFN- γ e IL-4, pero no IL-2. Así las células efectoras constituyen una primera línea de defensa pudiendo controlar al agente patógeno montando una rápida respuesta efectora, mientras que, los linfocitos T_{CM} migran preferentemente a los órganos linfáticos secundarios donde estimularían células dendríticas, células B y/o generarían una segunda respuesta de linfocitos T efectores (Woodland and Kohlmeier 2009; Sallusto, Lanzavecchia et al. 2010). Los linfocitos T de memoria central y memoria efectora igualmente difieren con respecto a su capacidad de sobrevivir en ausencia de estímulo antigénico. La población de linfocitos T_{CM} se mantiene relativamente constante a través de una proliferación homeostática controlada por las citoquinas IL-7 e IL-15 (Surh and Sprent 2008) a través de sus receptores de membrana (CD127 y CD122). IL-7 media señales de supervivencia que previenen la apoptosis, mientras que la IL-15 promueve una baja tasa de proliferación permitiendo que la población de linfocitos T de memoria central mantenga un número constante de células en ausencia del patógeno. A pesar de expresar niveles variables del receptor de IL-7 que previene la apoptosis y aumentan la supervivencia, los linfocitos T de memoria efectora no presentan capacidad de proliferación homeostática (Wherry, Blattman et al. 2003) dependiendo su mantenimiento en altas proporciones estrictamente de la presencia del antígeno. Así, esta población es mantenida en número constante gracias a una baja tasa de diferenciación de linfocitos T_{CM} a linfocitos T_{EM} (Sallusto, Geginat et al. 2004). En infecciones en las que el patógeno es totalmente eliminado predominan linfocitos T de memoria central, mientras que en infecciones persistentes se observará mayoritariamente células de memoria efectoras.

Si bien la expresión de CD45 combinado con moléculas envueltas en la migración linfocitaria difiere entre células T de memoria y vírgenes. Debe tenerse en cuenta que la identificación de las células T de memoria, puede ser compleja debido a: I) el fenotipo de la célula T de memoria es completamente heterogéneo, II) este fenotipo de memoria es diferente entre células T CD4 y CD8, III) algunos de estos cambios pueden ser reversibles (Zimmerman, Brduscha-Riem et al. 1996; Rogers, Dubey et al. 2000); IV) la proliferación homeostática puede inducir a células T vírgenes a la adquisición del fenotipo memoria/efector en la ausencia de antígenos y V) el inmunofenotipo de la célula T no siempre se correlaciona con la función (Murali-Krishna and Ahmed 2000). A pesar de todas estas dificultades, las numerosas diferencias fenotípicas entre las células T vírgenes y de memoria se producen durante la activación inicial de las células T y parecen persistir en las células de memoria. De este modo, ha sido descrito que en comparación a las células vírgenes y aunado a los marcadores ya descritos se pueden observar diferencia especialmente en la expresión diferencial de moléculas de adhesión en la superficie celular entre ambos tipos de células expresándose en las células de memoria altos niveles de las integrinas b1 (CD29, CD49d y CD49e) y b2 (CD11a, CD11b y CD18), CD2, CD44, CD54 y CD58 (Hamann, Baars et al. 1997). El aumento en la expresión de moléculas de adhesión en células T recientemente activadas, refleja el requerimiento de las células T efectoras para entrar a los sitios de inflamación de los tejidos periféricos e interactuar con las células dianas.

Así mismo, en células T CD8 la expresión de las moléculas coestimuladoras CD27 y CD28 combinadas con la expresión de CD45RA y CCR7 igualmente puede ser usada para discriminar entre células T vírgenes y células de memoria (Tomiya, Matsuda et al. 2002).

Estudios realizados en *Trypanosoma cruzi*, evidencian que el tratamiento farmacológico con benzonidazol, conlleva a cambios fenotípicos en el perfil de linfocitos TCD8⁺ observando predominantemente células de memoria central, contrario a lo observado en condiciones sin tratamiento en las cuales se observa un fenotipo de memoria efectora. Así, el aclaramiento antigénico aún después de una prolongada exposición al parásito genera en las células TCD8⁺ cambios fenotípicos dando como resultado el desarrollo y mantenimiento de una población de células T_{CM}, que persiste por un largo periodo de tiempo sin la presencia del antígeno y que son capaces de inducir una función efectora y generar inmunidad protectora tras un reencuentro

antigénico (Bustamante, Bixby et al. 2008). Similar a estos resultados, en modelos murinos en la fase crónica de la infección con *T. cruzi*, se observa que, en contraste a la mayoritaria población de células T CD8⁺ antígeno-específicas que expresan un fenotipo de memoria efectora hay una población de células TCD8⁺CD127^{alto} que expresan un fenotipo de memoria central. Esta población expresa los marcadores CD62L, CCR7 y CD122 sin embargo muestran baja expresión del marcador de superficie KLRG1 lo que indica que no ha habido estimulaciones antigénicas repetitivas, manteniéndose esta población independiente del antígeno a pesar de la persistencia del antígeno. La capacidad de supervivencia de estas células durante el aclaramiento antigénico está vinculada a la expresión de altos niveles de CD127 y CD122 lo cual permite su auto renovación en respuesta a las citoquinas IL-7 e IL-15 (Bixby and Tarleton 2008). Estos datos demuestran en modelos murinos, la presencia de una población estable de células TCD8⁺ parasito-específicas que son capaces de mantenerse en ausencia antigénica a pesar de la presencia del antígeno. Estos datos contrastan con lo observado en muchas infecciones persistentes en la que se ve la pérdida progresiva de la capacidad funcional de las células TCD8⁺ consecuencia de la constante exposición al antígeno dándose deficientes procesos de diferenciación, que no permiten adquirir propiedades de memoria tales como la capacidad de proliferación y persistencia en ausencia antigénica. Observándose una pobre respuesta a IL-7 e IL-15 debido a la reducida expresión de los receptores para estas citoquinas (CD122 y CD127), afectando su capacidad de proliferación y supervivencia (Shin, Blackburn et al. 2007).

Estos datos sugieren que, las células T en presencia de microorganismo persistentes sufren alteraciones que disminuyen su capacidad de supervivencia y conllevan a fenómenos de agotamiento clonal que implica la pérdida progresiva de funciones efectoras tales como potencial de proliferación y producción de citoquinas (IL-2, TNF- α e INF- γ).

1.3.- Proteínas antigénicas de T. cruzi

1.2.1.- Generalidades de los antígenos de T cruzi

T. cruzi presenta una elevada complejidad antigénica, existiendo una gran heterogeneidad a nivel de antígenos entre las formas evolutivas (epimastigote,

tripomastigotes y amastigotes), las cepas y los clones de este parásito (Alves, Abuin et al. 1987) (Rangel-Aldao, Comach et al. 1986).

Este parásito intracelular obligado, tiene capacidad de invadir todos los tipos de células de mamíferos, *in vivo* e *in vitro*, incluyendo fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales y neuronas. El proceso de entrada a la célula hospedadora consta de dos fases: una primera fase de adhesión y otra posterior de internalización activa en el interior de la célula parasitada (Van Voorhis and Eisen 1989). Si bien estos mecanismos moleculares responsables de la invasión de la célula del hospedador no han sido completamente dilucidados. Hay evidencias de la existencia de receptores específicos para moléculas del parásito en la membrana de la célula diana (de Araujo-Jorge 1989). Las glicoproteínas de superficie juegan un papel relevante en los procesos infectivos (Gazzinelli, Leme et al. 1990), pero se desconoce en gran medida la regulación de su expresión génica, así como los mecanismos de respuesta inmunológica a las mismas. En este sentido, la existencia de actividad neuroaminidasa en la superficie del parásito (Melo Coutinho, Cavalcanti et al. 1998; Villalta, Zhang et al. 1999) y la presencia en la membrana del macrófago de proteínas de unión a azúcares (lectinas) (Soeiro Mde, Paiva et al. 2000), que podrían ser receptores para glicoproteínas (Galactosamina, N-acetilgalactosamina) de membrana de *T. cruzi*, hacen pensar en un mecanismo de infección parecido al propuesto para el virus Influenza (Prioli, Mejia et al. 1991).

La actividad neuraminidasa se localiza en el dominio N-terminal de un antígeno denominado SAPA (Shed acute phase antigen). Este antígeno se caracteriza por poseer en su secuencia de aminoácidos un extremo carboxilo terminal con un número variable de unidades de repetición de 12 residuos. Esta proteína, además de presentar actividad sialidasa, posee también actividad trans-sialidasa que parece ser la responsable de la sialidación de Ssp-3, una estructura que es requerida por *T. cruzi* para el anclaje de los tripomastigotes a la célula hospedadora (Souto-Padron, Reyes et al. 1989). Durante la infección natural y experimental por *T. cruzi* ha sido descrita una fuerte respuesta inmune frente a este antígeno de la superficie de los tripomastigotes (Fouts y col., 1991).

En el parásito se expresan simultáneamente diferentes miembros de la superfamilia de trans-sialidasas las cuales han demostrado ser reconocidas por linfocitos T CD8 citotóxicos antígeno-específicos en modelos murinos (Low y Tarleton, 1997). Así mismo, la inmunización con plásmidos DNA que contienen el gen que codifica esta proteína TSA, induce protección frente a la infección letal murina por *T. cruzi* (Wizel y col., 1998b). Por otro lado, en pacientes con enfermedad de Chagas ha sido demostrado que péptidos

inmunodominantes contenidos en esta proteína, son capaces de inducir la activación de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de IFN- γ y citotóxicos que confieren protección frente a la infección (Wizel, Nunes et al. 1997; Martin, Weatherly et al. 2006; Alvarez, Postan et al. 2008). Así, se sugiere que durante la infección por *T. cruzi* la respuesta frente a la superfamilia de las proteínas trans-sialidasas podría ser crítica para la inducción de una respuesta protectora (Millar and Kahn 2000).

Por otro lado, la proteína reguladora del complemento o CRP es una glicoproteína, que se expresa en la diferenciación de formas epimastigotes (sensibles a la lisis por el sistema del complemento) a tripomastigote (resistente a esta lisis) y que se une de forma no covalente a las proteínas C3b y C4b de las rutas clásicas y alternativa del sistema del complemento siendo descrita como factor de virulencia, ya que permite al parásito escapar a la lisis por el sistema del complemento de su hospedador (Norris 1998). En modelos murinos se observó protección en un 100% de los animales inmunizados con esta proteína en forma de vacuna genética (Sepulveda, Hontebeyrie et al. 2000). Así mismo en sueros de pacientes chagásicos se han detectado anticuerpos que bloquean la actividad de dicha proteína (Norris 1998).

Otra de las proteínas relevantes de *T. cruzi* es la cruzipaina la cual es una cistein-proteasa, exhibida tanto en la superficie del parásito como en los lisosomas ubicados cerca del bolsillo flagelar, que parece tener un rol importante en el proceso de internalización del parásito. Así mismo, estudios han mostrado el reconocimiento de epítopes restringidos a HLA-A*02:01 tanto para esta proteína como para la proteína FL-160, la cual está igualmente asociada a la cavidad flagelar (Cazorla, Becker et al. 2008).

Así mismo, la glicoproteína de la membrana de kinetoplastos de 11 kDa (KMP11) ha mostrado ser un antígeno relevante de *T. cruzi*. Esta proteína, específica de tripanosomátidos mantiene un alto grado de homología y conservación, no encontrándose en eucariotas superiores. Su expresión es abundante en todos los estadios del ciclo de vida del parásito y se encuentra asociada a la membrana del parásito, al citoesqueleto y al flagelo (Thomas, Garcia-Perez et al. 2000; Thomas, Longobardo et al. 2001). KMP11 ha mostrado ser altamente inmunodominante observándose, estimulación de células B específicas, inducción de proliferación celular, respuesta de linfocitos T citotóxicos e inmunoprotección en modelos murinos (Planelles, Thomas et al. 2002) (Maranon, Thomas et al. 2001; Thomas, Longobardo et al. 2001; Lasso, Mesa et al. 2010). En este sentido, se ha descrito una respuesta humoral generada frente a la

proteína KMP11 en pacientes de Chagas (Flechas, Cuellar et al. 2009), generándose anticuerpos principalmente de isotipo IgG 1.

En esta proteína ha sido caracterizado, un epítoto inmunodominante (K1) localizado en su extremo amino-terminal₄₋₁₂ (Maranon, Thomas et al. 2001), capaz de estimular linfocitos T CD8⁺ secretores de IFN- γ con actividad citotóxica en individuos infectados con enfermedad de Chagas (Diez, Lopez et al. 2006), evidenciando que este es eficientemente procesado y presentado en el contexto de HLA de clase I y reconocido por linfocitos T CD8⁺ en el curso natural de la enfermedad de Chagas. Así mismo, ha sido mostrado que dicho péptido es un epítoto promiscuo que puede ser presentado en el contexto de diferentes moléculas del HLA-A*02. Así, análisis fenotípicos y de funcionalidad de las células T CD8⁺ específicas de K1 han mostrado que éstas tienen un fenotipo predominante de memoria efectora (CCR7⁻, CD62L⁻) capaces de secretar IL-2, IFN- γ y perforina (Lasso, Mesa et al. 2010). Así mismo, existen resultados que indican que anticuerpos anti-K1 inhiben la infección *in vitro* de astrocitos hasta en aproximadamente un 30% a la vez que disminuyen la velocidad de los parásitos (Finkelsztejn et al, sometido).

1.2.1.- Proteínas a estudio

HSP70 (heat Shock protein 70 kDa).

Esta proteína de choque térmico de 70 kDa presente en todo tipo de organismos, pertenece a la familia de proteínas más conservadas evolutivamente, tanto en estructura como en función. Estas proteínas de gran importancia como “chaperonas moleculares” están implicadas en muchos procesos esenciales para la célula, como el plegamiento de proteínas recién sintetizadas, unión a proteínas para evitar la formación de agregados, translocación de proteínas a través de membrana, degradación de proteínas inestables y control de la actividad de otras proteínas reguladoras (Mayer and Bukau 2005).

En tripanosomátidos, esta proteína se localiza en citoplasma y mitocondria. Bajo condiciones de choque térmico se observa su migración masiva de citoplasma al núcleo (Martin, Requena et al. 1993) o a la membrana celular (Giambiagi-deMarval, Souto-Padron et al. 1996), mientras que la proteína localizada en la mitocondria queda confinada en el kinetoplasto (Olson, Nadeau et al. 1994). Así mismo ha sido descrito en

T. cruzi que esta proteína participa en procesos de tolerancia celular a choques térmicos y químicos.

HSP70, está entre los antígenos inmunodominantes reconocidos por el sistema inmune en un amplio espectro de parasitosis (Young 1990). Esta capacidad inmunomoduladora de la HSP70 es vinculada con su capacidad de interacción con células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas) (Singh-Jasuja, Hilf et al. 2001).

En ensayos *in vitro* ha sido demostrado que la proteína HSP70 de *T. cruzi* tiene per se un efecto estimulador sobre células de bazo y ganglio de ratones naive. Esta respuesta se caracteriza por una rápida e intensa estimulación de células T CD4⁺, seguida de un proceso de internalización de los receptores CD3⁺ y TCRαβ y un proceso de apoptosis no dependiente de Fas^{-/-}L (Maranon, Planelles et al. 2000). Así mismo, se evidencia que la inmunización de ratones de distinto haplotipo con un vector vacuna que porta el gen KMP11 de *T. cruzi* (Thomas, Garcia-Perez et al. 2000) fusionado al gen codificante para la proteína HSP70 induce, un descenso en la parasitemia y confiere protección frente a la infección experimental con *T. cruzi*. Así, se observa la producción de anticuerpos IgG2a de larga duración contra la proteína KMP11, y la activación de los linfocitos T-CD8⁺ citotóxicos específicos frente dos péptidos A2 contenidos en el antígeno. Interessantemente, los ratones inmunizados con el gen quimérico se protegen en un 50% frente a la infección experimental tardía, tres meses post-última inmunización, con formas infectivas de *T. cruzi* (Planelles, Thomas et al. 2001).

Igualmente, en ratones transgénicos C57BL/6-A2 inmunizados con la proteína de fusión KMP11-HSP70, y no en los inmunizados con la proteína KMP11 sola, se induce una respuesta CTL frente a células Jurkat-A2/Kb que expresan la proteína KMP11 así como frente a dichas células cargadas con distintos péptidos de KMP11 (Maranon, Thomas et al. 2001). Por otra parte, se ha demostrado que la proteína HSP70 de *T. cruzi*, tanto sola como fusionada a la KMP11, induce la maduración de células dendríticas murinas, y humanas estimulando la producción de las citoquinas IL-12, TNF-α y la expresión de marcadores de activación como CD25 y, CD40, y moléculas de coestimulación CD80 y CD86 (Planelles, Thomas et al. 2002).

Así mismo, ha sido descrito una fuerte capacidad de inducción de una respuesta humoral antígeno específica para la proteína HSP70 de *T. cruzi*. Interessantemente, no existe reconocimiento cruzado con la proteína homóloga humana a pesar que la

homología entre ambas proteínas de choque térmico de 75% (Requena, Jimenez-Ruiz et al. 1992).

La modulación inmunológica inducida por HSP70 se basa en la capacidad de estas proteínas para unirse a péptidos antigénicos y a la existencia de receptores en la superficie de las células presentadoras de antígenos que permiten la rápida introducción de los complejos HSP-péptido desde la matriz extracelular, así como a la capacidad de las HSP de activar las células presentadoras de antígeno, estimulándolas a producir una respuesta T-citotóxica contra los péptidos asociados a ellas. Estos factores hacen de la Hsp70 una molécula muy prometedora para la generación de respuestas protectoras frente a la enfermedad, inmunoterapia, e incluso su combinación con la quimioterapia convencional.

Proteínas paraflagelares.

Estas proteínas están localizadas a lo largo del flagelo y en el bolsillo flagelar en una estructura formada por un complejo entramado de filamentos de 150 nm que discurre paralelo al axonema (Maga and LeBowitz 1999) única de Kinetoplastidios, Euglenoides y Dinoflagelados. En ella se encuentran las proteínas PFR1 y PFR2 que tienen un peso molecular entre 70-80 y 68-72 kDa respectivamente, y que pueden ser encontradas en diversas especies de tripanosomátidos manteniendo un alto grado de conservación entre especies. En *T. cruzi* adicionalmente fueron descritas las proteínas, PFR3 y PFR4. Estas aunque tienen menos de 15% de homología con las proteínas PFR1 y PFR2 comparten características químicas y estructurales, como peso molecular, punto isoeléctrico y estructura secundaria con un alto porcentaje en α -hélice y motivos lazo-hélice (Fouts, Stryker et al. 1998; Maga and LeBowitz 1999).

El importante papel del flagelo para la movilidad e infección, resalta la importancia en el desarrollo de posibles estrategias que interfieran con las funciones de estas proteínas en estos organismos, pudiendo suponer una alternativa quimioterapéutica frente a un amplio rango de tripanosomátidos capaces de inducir patologías en el hombre. En este sentido se ha comprobado que estas proteínas resultan esenciales en la viabilidad de *T. brucei* (Bastin, Sherwin et al. 1998).

Así, ha sido descrito que las PFRs son altamente inmunogénicas jugando un papel crítico en la inducción de una respuesta celular protectora (Miller, Wrightsman et al. 1997; Wrightsman, Luhrs et al. 2002; Morell, Thomas et al. 2006). La inmunización

de ratones con las proteínas recombinantes PFR3 y PFR2 de *T. cruzi* induce inmunidad protectora frente a la infección. (Wrightsmann and Manning 2000). Así mismo, se observa que en ratones infectados se generan linfocitos T CD8⁺ frente a epítopes presentes en la proteína PFR2 siendo protectora la inmunización con vacunas que portan el gen codificante de PFR2 (Morell, Thomas et al. 2006). Igualmente, la inmunización de ratones con el vector que porta los genes *PFR2-HSP70* fusionados induce una clara respuesta celular Th1 antígeno-específica, detectándose un alto nivel de anticuerpos anti-PFR2 de isotipo IgG2a, un significativo aumento de la expresión de las citoquinas IL-2, IL12, TNF α e IFN γ y una fuerte activación de linfocitos T citotóxicos. Interesantemente, la inmunización con éste gen quimérico *PFR2-HSP70* estimula una respuesta protectora frente al daño miocárdico crónico inducido por la infección experimental con *T. cruzi* (Morell, Thomas et al. 2006).

TcCA-2

Esta proteína de membrana de 85 kDa que se expresa en las formas tripomastigote y epimastigotes de *T. cruzi*, se caracteriza por presentar en su extremo C-terminal, secuencias peptídicas de 12 aminoácidos organizadas en tándem. Así, en diversos patógenos protozoarios (*Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii* y *Leishmania* spp.) han sido descritas proteínas inmunodominantes que contienen secuencias de aminoácidos repetidas organizadas en tándem (Ibanez, Affranchino et al. 1988; Buscaglia, Alfonso et al. 1999), sugiriéndose que estas secuencias están involucradas en la unión a estructuras repetitivas en receptores de la célula hospedadora. En este sentido en la proteína TcCA-2 de *T. cruzi* ha sido descrito un epítipo (TcMe) implicado en la internalización del parásito en la célula hospedadora (Martin, Puertas et al. 1997), observándose en ensayos *in vitro*, con anticuerpos frente a dicho epítipo, la inhibición de la infección del parásito en fibroblastos LLC-MK2, debido a un bloqueo en el mecanismo de entrada a la célula (Martin, Puertas et al. 1997).

Por otro lado, la proteína B13 homóloga de TcC-A2, ha mostrado ser reconocida con alta sensibilidad (93%) por anticuerpos IgG de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica indeterminada y cardíaca (Buscaglia, Alfonso et al. 1999). Así mismo, ha sido descrito que tanto la proteína recombinante, como péptidos contenidos en su región repetida son reconocidos por linfocitos T en el contexto de la molécula HLA de clase II, observándose proliferación en PBMC provenientes de

pacientes con enfermedad de Chagas (IND y CCC) restringidos al haplotipo HLA-DQ7 (Abel, Iwai et al. 2005).

2.-Objetivos

La evolución de la enfermedad de Chagas puede conducir a una disfunción de la respuesta inmunológica del hospedador frente al parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la infección, que a medio y/o largo plazo conlleva a un agotamiento de la capacidad de respuesta del hospedador. Los datos actuales aportan relevante información sobre el crucial papel que los linfocitos T CD8⁺ juegan en el control de la infección experimental por *T. cruzi*. Sin embargo, son escasos los epítopes T CD8⁺ citotóxicos identificados en antígenos del parásito e insuficiente el conocimiento de las bases celulares que permitan entender la dinámica de la respuesta inmune antiparasitaria durante la evolución de la enfermedad de Chagas y el control de la infección.

Sobre esta base, entendemos que la identificación de nuevos epítopes T CD8⁺, especialmente en antígenos específicos de *T. cruzi*, así como el estudio funcional y fenotípico de las mencionadas células T en pacientes con enfermedad de Chagas crónica en diferente estadio de progresión de la enfermedad y/o tras el tratamiento, permitirá establecer útiles marcadores de patología de la enfermedad de Chagas, eficacia terapéutica y moléculas potencialmente útiles en inmunoterapia frente a dicha enfermedad. Por tanto, los objetivos de este trabajo son:

1.- Identificar epítopes T CD8⁺ restringidos a la molécula HLA-A*0201 contenidos en las proteínas HSP70, PFR2, PFR3 y TcCA-2 de *T. cruzi*.

2.- Caracterizar a nivel funcional, en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica indeterminada y cardíaca, linfocitos T CD8⁺ específicos de epítopes contenidos en las mencionadas proteínas HSP70, PFR2, PFR3 y TcCA-2 de *T. cruzi*.

3.- Evaluar diferencias derivadas del grado de patología en el fenotipo de memoria, diferenciación y senescencia de los linfocitos T CD8⁺ específicos de los epítopes identificados.

4.- Identificar moléculas marcadoras de mecanismos implicados en la capacidad del sistema inmune para modificar su potencial respuesta frente a la infección por *T. cruzi*.

5. Evaluar en pacientes con enfermedad de Chagas tras el tratamiento farmacológico con benznidazol modificaciones fenotípicas y funcionales de las células T CD8⁺ -específicas de los epítopes inmunodominantes identificados en los antígenos de *T. cruzi* a estudio.

3.-Materiales y métodos

3.1- Materiales

3.1.1.- Productos químicos

En el desarrollo de esta tesis se emplearon reactivos procedentes de las firmas Mabtech, Becton-Dickinson, Immudex, Bio-Rad, Sigma-Aldrich, Promega, Gibco e Invitrogen. Las membranas empleadas para la inmovilización de macromoléculas (transferencia de proteínas) y las películas autoradiográficas utilizadas proceden de las casas comerciales Thermo Fisher scientific y Agfa respectivamente.

3.1.2.- Tampones

- Tampón de lisis de eritrocitos: NH_4Cl 0,15 M, KHCO_3 1 mM, EDTA 0,1 mM. (pH 7,4).
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0,13 M, $\text{Na}_2\text{HP0}_4$ 70 mM, $\text{NaH}_2\text{P0}_4$ 3 mM (pH 7,2).
- Tampón de electroforesis de proteínas 10x: Tris-base 30,3 g/L, glicina 144,2 g/L, SDS 10 g/L. (pH 8,3).
- Tampón de transferencia de proteínas 1x: Tris base 25 Mm, glicina 14,4 mM, metanol 15% (pH 8,3).
- Tampón TBS 1x: Tris-HCL 10 mM, NaCl 150 mM (pH 7,5).
- Tampón TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8).
- Tampón de lisis de células: 0,1 M Tris-HCl, Triton X-100 0,1% (pH 8).
- Laemmli: Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), DTT 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10% (Laemmli 1975).

3.1.3.- Anticuerpos.

- Anti-rabbit IgG acoplado a peroxidasa (Boehringer).
- Anti-rabbit IgG acoplado a Alexa Fluor[®] 594 (Invitrogen).
- Anti-human HLA-A2 acoplado a PE (clon BB7.2, BD Biosciences).
- Anti-human class I (clon W6/32, Sigma).
- Anticuerpo policlonal obtenido en conejo frente a la proteína recombinante PFR2 de *T. cruzi*. (Morell, Thomas et al. 2006).
- Anticuerpo policlonal obtenido en conejo frente a las proteína recombinante, PFR3 de *T. cruzi* (Morell, Thomas et al. 2006).
- Anticuerpo policlonal obtenido en conejo frente a las proteína recombinante, KMP11 de *T. cruzi* (Thomas, Garcia-Perez et al. 2000).
- Anti-human CD8 acoplado a V500 (clon RPA-T8, isotipo human IgG1 κ , BD Horizon[™]).
- Anti-human CD8 acoplado a PerCp-Cy 5.5 (clon RPA-T8, isotipo human IgG1 κ , BD Pharmingen[™]).
- Anti-human CD45RA acoplado a APC-H7, (clon HI100, isotipo human IgG2b κ , BD Pharmingen[™]).
- Anti-human CD197 (CCR7) acoplado a V450 (clon 150503, isotipo human IgG2a, BD Horizon[™]).
- Anti-human CD27 acoplado a FITC, (clon M-T271, isotipo human IgG1 κ , BD Pharmingen[™]).
- Anti-human CD127 acoplado a PerCp-Cy 5.5 (clon HIL-7R-M21, isotipo human IgG1 κ , BD Pharmingen[™]).
- Anti-human CD44 acoplado a APC-H7 (clon G44-26, isotipo human IgG2b κ , BD Pharmingen[™]).

- Anti-human CD57 acoplado a FITC (clon NK-1, isotipo human IgM κ , BD Pharmigen™).

Isotipos Control:

- Anti-human IgG1 κ , acoplado a V500 (clon X40, BD Horizon™).
- Anti-human IgG1 κ , acoplado a PerCP-Cy5.5 (clon MOPC-21, BD Pharmigen™).
- Anti-human IgG2b κ , acoplado a APC-H7 (clon 27-35, BD Pharmigen™).
- Anti-human IgG2a acoplado a V450 (clon G155-178 BD Horizon™).
- Anti-human IgG1 κ , acoplado a FITC (clon MOPC-21, BD Pharmigen™).
- Anti-human IgM κ , acoplado a FITC (clon G155-228, BD Pharmigen™).

Dextrámeros:

- Dextrámero HLA-A*02:01 acoplado a APC y unido al péptido 12772 (TLLTIDGGI) contenido en la proteína HSP70 de *T. cruzi* (Immudex).
- Dextrámero HLA-A*02:01 acoplado a PE y unido al péptido 18415 (FVSCCGELTV) contenido en la proteína PFR3 de *T. cruzi* (Immudex).
- Dextrámero HLA-A*02:01 acoplado a PE y unido al péptido 12807 (RLYKTLGQL) contenido en la proteína PFR2 de *T. cruzi* (Immudex).
- Dextrámero HLA-A*02:01 acoplado a APC y unido al péptido 12827 (ALRNLRVFL) contenido en la proteína TcCA-2 de *T. cruzi* (Immudex).
- Dextrámero HLA-A*02:01 acoplado a APC y unido al péptido 12822 (TVFDASRSTV) contenido en la proteína TcCA-2 de *T. cruzi* (Immudex).

- Dextrámero HLA-A*02:01 acoplado a PE y unido al péptido K1 (TLEEFSAKL) contenido en la proteína KMP-11 de *T. cruzi* (Immudex).

3.1.4.- Medios de cultivo

- Medio RPMI 1640 con L Glutamina (GIBCO), suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBI) y gentamicina 50 µg/mL.
- Medio LIT: NaCl 4g, KCl 0,4 g, Na₂HPO₄·7H₂O 15 g, glucosa 2 g, infusión de hígado 3 g, tripsina 5 g, hemoglobina 2 g y agua destilada hasta 1L (pH 7).

3.1.5.- Patrones de peso molecular

Electroforesis de proteínas y western-blot:

- Prestained SDS-PAGE Standars (Bio-Rad): Tamaño aproximado de las bandas 206911, 118961, 98540, 56695, 37544, 29494, 20265 y 6880 Da.
- Precision Plus Protein “All blue” (Bio-Rad): Tamaño aproximado de las bandas: 250000, 150000, 100000, 75000, 50000, 37000, 25000, 20000, 15000 y 10000Da.

3.1.6.- Cepas de *T. cruzi*

Cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (Silva 1953) en sus formas epimastigote, amastigote y tripomastigote.

3.1.7.- Cepas de Ratones

Se emplearon ratones transgénicos C57BL/6-A2.1/K^b (B6-A2/K^b) (Vitiello, Marchesini et al. 1991). Estos ratones expresan el producto del gen quimérico HLA-A2.1/K^b, donde los dominios α 1 y α 2 son iguales a los de la molécula HLA-A*02:01 humana y los dominios α 3 transmembrana y citoplasmático corresponden a la molécula murina H-2K^b (Fig M1). Dicha cepa fue proporcionada por el Dr. L. Sherman (Scripps Laboratories, San Diego, Ca) a través del Dr. P. Romero (Ludwing Institute for Cancer

Research, Lausanne, Switzerland). En cada uno de los grupos ensayados siempre se emplearon ratones del mismo sexo y dentro del mismo rango de edad.

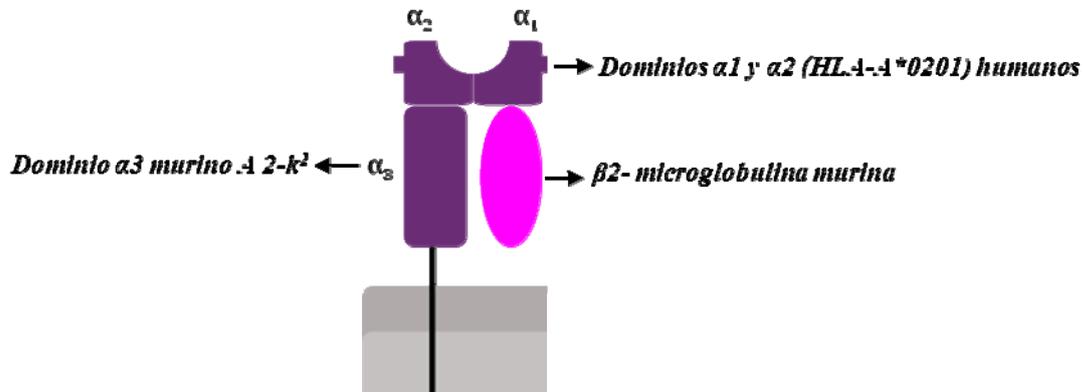


Figura M1. Ratones transgénicos C57BL/6-A2-K^b. Contienen las hélices α_1 y α_2 correspondiente a la molécula HLA-A*02:01 humana y la hélice α_3 murina.

3.1.8.- Líneas celulares

- LLC-MK2: línea fibroblastoide procedentes de riñón de mono.
- T2: línea linfoblastoide humana deficiente en la función transportadora TAP (transportador asociado al procesamiento de antígenos). Esta línea celular expresa bajos niveles de moléculas de histocompatibilidad de clase I, excepto de HLA-A*02:01.
- K562: línea celular humana procedente de un paciente con leucemia mieloide crónica. Esta línea no expresa moléculas HLA de clase I ni de clase II.
- K562/A*02:01: línea K562 transfectada establemente con el gen HLA-A*02:01. Esta línea es cultivada en presencia de G-418 0,5 mg/mL (Britten, Meyer et al. 2002).
- THP-1: línea celular humana procedente de un paciente con leucemia monocítica aguda.

3.1.9.- Cohorte de pacientes estudiada.

Los individuos ensayados en este estudio son provenientes de zonas endémicas para la enfermedad de Chagas y residentes en España. Las muestras se obtuvieron en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia y en el Hospital Clínic de Barcelona. Los participantes en el estudio lo hicieron de manera voluntaria y tras firmar un formulario de consentimiento informado. Así mismo, se disponen de los correspondientes certificados de los Comité éticos de ambos Hospitales participantes, así como del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Todos los individuos evaluados son positivos para HLA-A*02:01 por genotipado, y clasificados en los siguientes grupos:

- *Controles sanos*: serología negativa frente a antígenos de *T. cruzi*.
- *Chagas crónico asintomático (fase indeterminada)*: serología positiva frente a antígenos de *T. cruzi*, sin evidencias de cardiopatía chagásica o alteraciones digestivas.
- *Chagas crónico sintomático*: serología positiva frente a antígenos de *T. cruzi* y evidencias de alteraciones a nivel digestivo o cardiaco. Los pacientes con alteraciones cardiacas se clasificaron según la escala de Kuschnir (Kuschnir, Sgammini et al. 1985), que va de I (alteraciones electrocardiográficas sin patología evidente) a III (alteración de la silueta cardiaca y evidencias de cardiopatía).

Tabla M1. Cohorte de pacientes ensayados en estudios de funcionalidad linfocitaria frente a péptidos contenidos en proteínas de *T. cruzi*.

| Individuos | Rango de edad | Sexo | Origen |
|---|---------------|-----------------------|---------|
| Donantes sanos (HD) (n=9) | 26-57 | 7 Mujeres / 2 Hombres | Bolivia |
| Chagas en fase Indeterminada (IND) (n=11) | 22-40 | 5 Mujeres/6 Hombres | Bolivia |
| Chagas en fase Cardiaca (CCC) (n=10) | 22-40 | 2 Mujeres/8 Hombres | Bolivia |

Tabla M2. Cohorte de pacientes empleados para la evaluación de la respuesta linfocitaria restringida a la molécula HLA-A*02:01 e inducida por péptidos de *T. cruzi*.

| Individuos | Rango de edad | Sexo | Origen |
|---|---------------|-----------------------|---------|
| Pacientes con enfermedad de Chagas (n=11) | 29-53 | 8 Mujeres / 3 Hombres | Bolivia |

Tabla M3. Cohorte de pacientes ensayados pre y post tratamiento con Beznidazol en ensayos de caracterización fenotípica de linfocitos T CD8⁺ específicos de epítopes de *T. cruzi*.

| Individuos | Rango de edad | Sexo | Origen |
|---|---------------|-----------------------|---------|
| Donantes sanos (HD) (n=6) | 31-43 | 3 Mujeres / 3 Hombre | Bolivia |
| Chagas en fase Indeterminada (IND) (n=9) | 24-46 | 4 Mujeres / 5 Hombres | Bolivia |
| Chagas en fase Cardiaca. Estadio Kuschnir grado I (CCC I) (n=6) | 29-41 | 3 Mujeres / 3 Hombres | Bolivia |
| Chagas en fase Cardiaca. Estadio Kuschnir grado III (CCC III) (n=6) | 30-62 | 3 Mujeres / 3 Hombres | Bolivia |

Tabla M4. Cohorte de pacientes empleados para la evaluación de la actividad Indolamil-deoxigenasa (IDO).

| Individuos | Rango de edad | Sexo |
|---|---------------|-------------------------|
| Donantes sanos (HD) (n=13) | 25-56 | 10 Mujeres / 3 Hombre |
| Chagas en fase Indeterminada (IND) (n=43) | 18-61 | 27 Mujeres / 16 Hombres |
| Chagas en fase Cardiaca (CCC) (n=99) | 19-58 | 60 Mujeres / 33 Hombres |
| Chagas en fase digestiva (n=8) | 26-54 | 7 Mujeres / 1 Hombres |
| Chagas en fase cardiaca/digestiva (n=18) | 24-54 | 11 Mujeres / 7 Hombres |

3.1.10.- Mitógenos

Como control positivo para evaluar la activación linfocitaria (secreción de Granzima B y secreción de citocinas) se emplearon los siguientes compuestos capaces de inducir actividad mitótica.

- Forbol 12-miristato-13-acetato 0,5 µg/mL (PMA) más ionomicina 0,5 µg/mL (PMA-I) (Sigma).
- Fitohemaglutinina o Lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) 10µg/mL (Sigma).

3.1.11.- Proteínas recombinantes

Como control interno en ensayos de inmunodetección de proteínas fijadas en membranas, se emplearon las siguientes proteínas recombinantes previamente purificadas en el laboratorio (Maranon, Planelles et al. 2000; Thomas, Garcia-Perez et al. 2000; Morell, Thomas et al. 2006).

- KMP11 (Kinetoplastid Membrane Protein 11kDa)
- HSP70 (Heat Shock Protein 70kDa)
- PFR2 (Paraflagellar rod 68kDa)
- PFR3 (Paraflagellar rod 72kDa)

3.1.12.- Péptidos sintéticos

Los péptidos ensayados están contenidos en las proteínas TcCA-2, PFR2, PFR3 y HSP70 de *T. cruzi* (tabla M.6).

Como control interno positivo en los ensayos de unión y estabilidad a la molécula HLA-A*02:01 se emplearon péptidos contenidos en la proteína de la matriz del virus de la influenza y de la envuelta del virus de la Hepatitis B, mientras que en los ensayos de funcionalidad linfocitaria se empleó como control negativo interno un péptido proveniente de la proteína gag del virus del SIDA, todos ellos con alta afinidad a la molécula presentadora (tabla M.5).

Tabla M.5. Péptido usados como control interno en los ensayo de unión y respuesta a antígenos de *T. cruzi*.

| <i>Origen</i> | <i>Péptido</i> | <i>Posición en la</i> | <i>Secuencia</i> | <i>Peso Molecular</i> |
|---|----------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
| Proteína de la matriz del virus de la influenza | FLU-MA | 51-66 | GILGFVFTL | 966 |
| Envoltura del virus de la hepatitis | HB-ENV | 334-342 | WLSLLVPFV | 1073 |
| Proteína de la matriz del virus del Sida (VIH) | Gag 77-85 | 77-85 | SLYNTVATL | 981 |

Tabla M.6. Péptidos contenidos en las proteínas HSP70 y TcCA-2.

| <i>Proteína</i> | <i>Péptido</i> | <i>Posición en la proteína</i> | <i>Secuencia</i> | <i>Peso Molecular</i> |
|-----------------|----------------|--------------------------------|------------------|-----------------------|
| HsP70 | 12759 | 41-50 | YVAFTDTERL | 1214 |
| | 12760 | 58-67 | QVAMNPINTV | 1074 |
| | 12761 | 73-82 | LIGRKFSDPV | 1131 |
| | 12762 | 86-95 | DMKHWPFKVI | 1301 |
| | 12763 | 94-103 | VITKGDDKPV | 1071 |
| | 12764 | 122-131 | SMVLSKMKEI | 1166 |
| | 12765 | 127-136 | KMKEIAESYL | 1212 |
| | 12766 | 135-144 | YLGKQVKKAV | 1133 |
| | 12767 | 164-173 | TIAGMEVLRI | 1102 |
| | 12768 | 173-182 | IINEPTAAAI | 1012 |
| | 12769 | 181-189 | AIAYGLDKV | 949 |
| | 12770 | 188-197 | KVADGKERNV | 1115 |
| | 12771 | 201-209 | DLGGGTFDV | 880 |
| | 12772 | 210-218 | TLLTIDGGI | 902 |
| | 12773 | 255-263 | DSLTLNLRAL | 1002 |
| | 12774 | 276-284 | TSSAAQATI | 849 |
| | 12775 | 311-320 | ELFRGTLQPV | 1159 |
| | 12776 | 316-324 | TLQPVERVL | 1054 |
| | 12777 | 328-337 | KMDKRAVHDV | 1198 |
| | 12778 | 337-346 | VVLVGGSTRI | 1000 |
| 12779 | 345-353 | RIPKVMQLV | 1083 | |
| 12780 | 395-404 | LLLDVTPRTL | 1097 | |
| 12781 | 422-430 | TIPTKKSQI | 1015 | |
| 12782 | 458-467 | LLGTFELSGI | 1049 | |
| 12783 | 466-474 | GIPPPRGV | 889 | |
| 12785 | 504-513 | IVLTNDKGRL | 1128 | |
| 12786 | 564-573 | KIEEADKKTII | 1174 | |
| 12787 | 572-581 | TITSAVEEAL | 1033 | |
| 12788 | 612-620 | KMYQGMAGA | 956 | |
| 12789 | 626-635 | GMPGGMPPGGM | 891 | |
| TcCA-2 | 12828 | 817-843 | AAAGDKLSL | 845 |
| | 12819 | 1204-1233 | ALQVTNHRYL | 1214 |
| | 12822 | 1891-1920 | TVFDASRTV | 995 |
| | 12823 | 1921-1950 | FANAPGVAQV | 973 |
| | 12824 | 2032-2061 | SILQNVHATL | 1095 |
| | 12825 | 2158-2187 | AIGGGKLPAL | 896 |
| | 12826 | 2215-2244 | SAFGNHASTV | 990 |
| | 12827 | 2386-2412 | ALRNLRVFL | 1001 |

Tabla M.6. Péptidos contenidos en las proteínas paraflagelares PFR2 y PFR 3.

| <i>Proteína</i> | <i>Péptido</i> | <i>Posición en la proteína</i> | <i>Secuencia</i> | <i>Peso Molecular</i> |
|-----------------|----------------|--------------------------------|------------------|-----------------------|
| PFR2 | 12790 | 19-28 | AVPEVIDVIL | 1043 |
| | 12791 | 90-99 | LTEAYDIKKL | 1193 |
| | 12792 | 99-107 | LMRVCGLQL | 1032 |
| | 12793 | 123-131 | EVVALKKTL | 1000 |
| | 12794 | 126-134 | ALKKTLNEL | 1029 |
| | 12795 | 148-157 | GTIDNAIAKL | 1015 |
| | 12796 | 156-163 | KLEKIEDEL | 1116 |
| | 12797 | 176-185 | QVPVAVLKNL | 1080 |
| | 12798 | 184-193 | NLEECMNVTV | 1151 |
| | 12799 | 190-199 | NVTVVQTALL | 1057 |
| | 12800 | 236-245 | YIKAQLLEHL | 1228 |
| | 12801 | 300-308 | NLHDAIQKA | 1009 |
| | 12802 | 346-355 | ELERVLQRL | 1155 |
| | 12803 | 376-385 | KVEYQQFLDV | 1269 |
| | 12804 | 413-421 | LVAEGCSAI | 862 |
| | 12805 | 427-435 | KTNEELGDL | 1018 |
| | 12806 | 436-444 | RLQVHQEYL | 1185 |
| | 12807 | 449-457 | RLYKTLGQL | 1091 |
| | 12808 | 456-465 | QLVYKKEKRL | 1305 |
| | 12809 | 464-472 | RLEEIDRNI | 1157 |
| | 12810 | 499-507 | ELYKLRAQV | 1119 |
| 12811 | 506-514 | QVEEELEML | 1119 | |
| 12812 | 513-522 | MLKDKMAQAL | 1149 | |
| 12813 | 556-565 | KMVEYRAHL | 1146 | |
| 12814 | 563-572 | HIAKQEEVKJ | 1081 | |
| 12815 | 38-46 | NLKLKTSCL | 1019 | |
| PFR3 | 18396 | 28-37 | ALAALYELV | 962 |
| | 18397 | 30-40 | ALYELVENAI | 1134 |
| | 18398 | 38-46 | AIATAENYV | 951 |
| | 18399 | 46-55 | VYAYTEGRLV | 1170 |
| | 18400 | 143-152 | ALKPHQPPDL | 1115 |
| | 18401 | 155-163 | ALARDLSDV | 959 |
| | 18402 | 159-167 | DLSDVCGAL | 892 |
| | 18403 | 174-184 | DLMAELRAEL | 1160 |
| | 18404 | 178-186 | ELRAELSEL | 1059 |
| | 18405 | 186-193 | ELDGERDKV | 1060 |
| | 18406 | 265-273 | SISRFAEAL | 993 |
| | 18407 | 283-290 | DLHNCCKKR | 1128 |
| | 18408 | 316-324 | QIVEQKKKL | 1113 |
| | 18409 | 317-334 | ELRQKAREL | 1142 |
| | 18410 | 337-345 | DITLKQKEMV | 1205 |
| | 18411 | 399-407 | MVTRIPQQNL | 1200 |
| | 18412 | 402-408 | RIPQQNLRQV | 1250 |
| | 18413 | 410-416 | QVLDQLNDI | 1057 |
| | 18414 | 413-420 | QLNDIEAEV | 1030 |
| | 18415 | 428-436 | FVSCCGELTV | 1057 |
| | 18416 | 433-437 | ELTVKKMHR | 1141 |
| | 18417 | 466-473 | NMSNYRLEL | 1139 |
| | 18418 | 475-482 | DIIEQMKGV | 1032 |
| | 18419 | 479-486 | QMKFVSGVI | 1008 |
| | 18420 | 481-489 | GVSGVINAL | 829 |
| 18421 | 498-506 | QLFQSVEKGV | 1134 | |
| 18422 | 520-529 | PLQEYGIKSV | 1133 | |
| 18423 | 535-543 | FVDRSMHYV | 1153 | |
| 18424 | 542-550 | YVENEERKV | 1165 | |
| 18425 | 548-556 | KVLEKRNVL | 1098 | |

3.2.- Métodos

3.2.1.- Cultivo *in vitro* de *Trypanosoma cruzi*.

Cultivo de formas tripomastigotes y amastigotes:

Las formas tripomastigotes son obtenidas a partir de la infección *in vitro* de células epiteliales LLC-MK₂ (Andrews and Colli 1982).

Cultivos en monocapa (semiconfluentes) de células LLC-MK₂, mantenidas en medio RPMI suplementado con un 10% de SFBI, e incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) en una proporción de 5:1 tripomastigotes:célula durante tres horas. Tras el cuarto día post-infección se observan en el sobrenadante las formas tripomastigotes del parásito. Dicho sobrenadante es retirado y centrifugado a 240 x g durante 5 minutos para eliminar los restos celulares del sobrenadante del cultivo de la monocapa infectada. El sobrenadante es retirado, centrifugado durante 35 minutos a 1800 x g e incubado a 37°C durante 2 horas. Este periodo de incubación permite que los tripomastigotes suban a la superficie separándose de los amastigotes que se depositan en el fondo. Transcurrido el tiempo de incubación se recoge el sobrenadante donde se encuentran las formas tripomastigotes del parásito, seguidamente se realizan 3 lavados con PBS, tras el último lavado es descartado el sobrenadante almacenándose a -80°C los tripomastigotes obtenidos.

Las formas amastigotas extracelulares se obtuvieron del pellet obtenido tras las 2 horas de incubación previamente descritas. Así mismo tripomastigotes recién extraídos son incubados en medio LIT a 37°C y 5% de CO₂. Tras 36 horas de incubación se observa la transformación de formas tripomastigotas a formas amastigotas, redondeadas y con capacidad de división.

Cultivo de formas epimastigotes:

Las formas epimastigotes fueron cultivadas en medio líquido LIT, suplementado con 10% de SFBI. El cultivo celular partió de una concentración inicial de 1×10^6 células/mL y fue mantenido en frascos estériles no ventilados de 25 cm² con 10 mL de medio en agitación suave a 28°C. Los parásitos fueron recogidos en fase logarítmica de crecimiento (2×10^7 parásitos/mL).

3.2.2.- Extracción de proteínas totales de *T.cruzi*

La obtención de antígenos solubles se llevó a cabo en las formas tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*.

Para cada una de las formas parasitarias se realizaron dos lavados con PBS centrifugando a 2500 x g durante 30 min. El pellet obtenido es resuspendido en buffer de lisis (Tris-HCl 50mM (pH 7,4), NP-40 0,05%, NaCl 50mM, PMSF 1mM y leupeptina 1µg/ml) manteniendo una relación de 10⁹ parásitos/mL. Cada muestra es sometida a 3 ciclos de sonicación de 40 seg a una frecuencia de 50-62 KHz con intervalos de 20 seg entre cada una. El extracto fue centrifugado a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C, finalmente el sobrenadante es conservado en alícuotas a -80°C hasta su uso.

3.2.3.- Purificación de las proteínas recombinantes a ensayo y cuantificación de proteínas.

Proteína recombinante KMP11

La purificación se realizó a partir de células M15 de *E. coli* transformadas con el plásmido pQE₃₀-KMP11, disponible en el laboratorio (Thomas, Garcia-Perez et al. 2000). La inducción de la proteína recombinante se llevó a cabo mediante la adición al cultivo de 0,1 mM de IPTG durante 3 horas a 37°C. La masa bacteriana se recogió mediante centrifugación. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento bacteriano se resuspendió en proporción 50:1 en tampón fosfato a pH 8 (Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 0,3 M, PMSF 100 mM y lisozima 1mg/ml). Después de agitar durante 1 hora a 4°C, se sonicó 8 minutos a intervalos del 50% y se centrifugó. El extracto de proteínas solubilizadas se incubó con la resina Ni²⁺ NTA equilibrada en tampón fosfato a pH 8 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras empaquetar la resina en columna, esta se lavó con tampón de lavado (ClNa 0,3 M, NaH₂PO₄ 50 mM, PMSF 1 mM y βME 10 mM) a pH 8, pH 7,5, pH 6 y 5,5. La proteína se eluyó en este mismo tampón a pH 4. Las distintas fracciones se visualizaron en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE al 16%.

Proteína recombinante HSP70

Se realiza la purificación a partir de células M15 de *E. coli* transformadas con el plásmido pQE70, disponible en el laboratorio (Maranon, Planelles et al. 2000). La inducción de la proteína recombinante se realizó mediante la adición al cultivo de 0,1 mM de IPTG durante 3 horas a 37°C. La masa bacteriana se recogió mediante centrifugación. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento bacteriano se resuspendió en proporción 50:1 de tampón fosfato a pH 8 (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 0,3 M, PMSF 100 mM y lisozima 1mg/ml). Después de agitar durante 1 hora a 4°C, se sonicó durante 8 minutos y se centrifugó. En el sobrenadante quedan las proteínas solubles, y la proteína HSP70 queda en la fase insoluble, en forma de cuerpos de inclusión.

Esta fracción insoluble se extrajo resuspendiéndola en tampón de sonicación (Tampón fosfato 50mM, NaCl 60mM, SDS 0,025%, pH 8) y agitándola en frío durante al menos 2 horas. Después de sonicación, las fases soluble e insoluble se separaron mediante centrifugación en frío.

Para la unión de la proteína a la resina Ni^{2+} NTA, el extracto soluble se llevó a concentraciones finales de NaCl 0,3M, MgCl_2 5mM, Glicerol 10%, β -mercaptoetanol 10mM, PMSF 1mM.

La resina se equilibró con la misma solución (tampón de purificación). La unión HSP70-resina se realizó durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación. La resina se empaquetó en una columna, y el eluido se volvió a pasar varias veces por la misma. La resina se lavó con tampón de purificación pH 6 sin β -mercaptoetanol, y la resina se lavó con el mismo tampón a pH 4. Las distintas fracciones se visualizan en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE al 12%.

Proteína recombinante PFR2

Se realizó a partir de bacterias *E. coli* BL21 transformadas, con el plásmido pCAL-n-EK-PFR2 disponible en el laboratorio (Morell, Thomas et al. 2006). La inducción de la proteína recombinante se realizó mediante la adición al cultivo de 0,1 mM de IPTG durante 5 horas a 28°C. La masa bacteriana se recogió mediante centrifugación. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento bacteriano se resuspendió en proporción 20:1 en un tampón con la siguiente composición: Tris 50mM, NaCl 150mM, β -mercaptoetanol 10mM, $\text{Mg}(\text{AcO})_2$, Imidazol 1mM, CaCl_2

2mM, pH 8). Se procedió a la sonicación en dos ciclos de 8 minutos con un intervalo de reposo de unos 10 minutos y se centrifugó.

El extracto de proteínas solubilizadas se incubó con la resina calmodulina durante toda la noche a 4°C y durante 3 horas más a temperatura ambiente.

Se comenzó la elución utilizando un tampón que contiene Tris 50mM, β -ME 10mM, EGTA 2mM, pH 8. En este proceso de elución se incubó la resina con 3mL del tampón en agitación durante 1 hora con el fin de separar la mayor cantidad de proteína de la resina. Las distintas fracciones se visualizan en geles desnaturizantes de SDS-PAGE al 10%. Esta proteína purificada fue dializada frente a tampón fosfato salino durante toda la noche (12-16 h).

Proteína recombinante PFR3

La purificación se realizó a partir de células M15 de *E. coli* transformadas con el plásmido pQE32, disponible en el laboratorio (Morell, Thomas et al. 2006). La inducción de la proteína recombinante se llevó a cabo mediante la adición al cultivo de 1 mM de IPTG durante 1 hora. La masa bacteriana se recogió mediante centrifugación. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento bacteriano se resuspendió en proporción 40:1 en tampón fosfato a pH 8 (NaHPO_4 100 mM, NaCl 50 mM). Se procedió a la sonicación 3 minutos y se centrifugó. El extracto de proteínas se solubilizó dos veces en un tampón urea 8M (urea 8M, Tris 0,01 M, NaHPO_4 0,1 M y NaCl 1M). El extracto de proteínas solubilizadas se incubó con la resina Ni^{2+} NTA equilibrada en tampón urea a pH 8 durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras empaquetar la resina en columna, esta se lavó con tampón urea a pH 8 y a pH 7. La proteína se eluyó en este mismo tampón a pH 6,5, 5 y 4. Las distintas fracciones se visualizaron en geles desnaturizantes de SDS-PAGE al 10%.

Cuantificación de proteínas

La concentración de las proteínas recombinantes a ensayo, así como las proteínas totales extraídas de cada una de las formas parasitarias de *T. cruzi*, fue determinada empleando el método de Bradford (Bradford 1976). Para ello, utilizamos una curva patrón construida a partir de cantidades conocidas de albúmina bovina (BSA).

3.2.4.- Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida: SDS-PAGE

La electroforesis se llevó a cabo en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12% (Laemmli (1970), *Nature*, 277, p. 680), usando el sistema Mini-Protean III Cell (Bio-Rad). Antes de cargar las muestras en el gel, estas fueron mezcladas con 1 volumen de tampón de Laemmli y posteriormente desnaturizadas a 95°C durante 5 minutos. Una vez concluida la electroforesis se procedió a la correspondiente tinción del gel siguiendo una adaptación del método Fairbanks de tinción rápida (Sambrook, Maniatis et al. 1989). Este método se basa en la utilización de 4 diferentes soluciones. Así, el gel inicialmente se introduce en un recipiente ventilado al cual se le agrega una primera solución que contiene isopropanol al 25%, ácido acético al 10% y azul Coomassie 0,05% (solución A). El gel introducido en esta solución es calentado en microondas a máxima potencia durante 2 minutos y seguidamente mantenido en agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Retirada la solución A, este proceso de calentamiento y agitación a temperatura ambiente se repite sucesivamente añadiendo al gel una solución de isopropanol 10%, ácido acético 10% y azul Coomassie 0,005% (solución B); solución de ácido acético 10% y azul Coomassie 0,002% (solución C) y solución de ácido acético 10% (solución D).

En aquellos casos en los que las proteínas deben ser transferidas e inmovilizadas a membranas, se obvió el proceso de fijación y tinción, realizando directamente la transferencia una vez concluida la electroforesis.

3.2.5.- Inmunodetección de proteínas fijadas en membranas “Western blot”.

Las proteínas fueron transferidas desde geles de acrilamida a membranas de PVDF (Thermo Fisher Scientific), utilizando el sistema de transferencia semi-seca Fast Blot B33 (Biometra). Previa la transferencia la membrana de PVDF fue pre-humedecida 2 minutos en metanol para su activación. Seguidamente esta fue equilibrada en tampón de transferencia 1x. La transferencia fue realizada a 15V (45-50 minutos) en presencia de tampón de transferencia 1x.

Una vez concluida la transferencia, la membrana de PVDF es lavada en TBS 1x y posteriormente en solución de bloqueo (leche desnatada 5% y Tween-20 0,1% en TBS 1x) al menos una hora). Seguidamente se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo

primario en solución de bloqueo, a una dilución de 1/16000 para anti-PFR2 y 1/8000 para anti-PFR3, durante 3 horas (temperatura ambiente) o toda la noche (4°C). Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos en solución de lavado (Tween-20 0,1% en TBS 1x), seguido de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón o conejo) conjugado a peroxidasa en solución de bloqueo a una dilución 1/20000. Finalmente se realizaron tres sucesivas incubaciones en la mencionada solución de lavado y se procedió al revelado del filtro empleando el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante, y utilizando placas de autoradiografía.

3.2.6.- Inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre formas Epimastigotes, amastigotes y Tripomastigotes de *T. cruzi*.

Este ensayo fue realizado sobre todas las formas de *T. cruzi* (tripomastigotes, epimastigotes y amastigotes). 20×10^6 parásitos fueron permeabilizados con una solución de Triton X-100 al 5% durante 1 minuto y fijada su membrana con paraformaldehído al 4%. Posteriormente las células fueron lavadas en solución de Tween 20 al 0,2% en PBS (solución de lavado) y bloqueadas durante 1 hora en solución de BSA al 5% en PBS. Seguidamente las células son incubadas durante 1 hora con el anticuerpo primario (dilución 1/7000 para anti-PFR2 y 1/5000 para anti-PFR3), lavadas 3 veces con solución de lavado e incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado con Alexa Fluor 594 (Invitrogen) a una dilución 1/20000 durante 1 hora. Tras tres nuevos lavados finalmente los parásitos son fijados al porta con metanol durante 1 minuto para su posterior visualización. Se secó la muestra al aire y se añadió el colorante Vecta-Dapi. Se selló el cubre-objeto y se conservó a 4°C en oscuridad hasta su observación en el microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan.

3.2.7.- Péptidos

Selección péptidos candidatos

Los péptidos contenidos en las proteínas TcCA-2, PFR2, PFR3 y HSP70 de *T. cruzi* con motivos de unión a la molécula HLA-A*02:01 fueron seleccionados empleando programas bio-informáticos que permiten la predicción teórica de unión a la

molécula HLA-A*02:01. Los programas utilizados fueron SYFPEITHI, RANKPEP y BIMAS. Los dos primeros ordenan los péptidos según su afinidad teórica a la molécula HLA-A*02:01, y dan una puntuación para cada uno. En cuanto al programa BIMAS, este calcula la vida media teórica del complejo HLA-péptido.

Síntesis de péptidos candidatos

La síntesis peptídica fue llevada a cabo en los laboratorios del Dr. M. E. Patarroyo (Instituto de Inmunología en Bogotá), así como en los laboratorios del Dr. O. Noya (Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas) empleando la metodología de fase sólida (Woolley and Merrifield 1963) con las variaciones del sistema de síntesis múltiple en fase sólida (Houghten 1985). Todos los péptidos fueron purificados con éter etílico. El grado de pureza de estos péptidos fue determinado en una columna semi-preparativa C18 en fase reversa con un gradiente de acetonitrilo de 10-40% mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La verificación del proceso de síntesis se llevó a cabo determinando el tiempo de retención de cada péptido mediante HPLC utilizando como control un péptido de secuencia conocida, mientras que la correcta síntesis de los péptidos se verificó mediante secuenciación automática utilizando un secuenciador en fase líquida Beckman 890M.

3.2.8.- Unión y estabilidad de péptidos A2.

La afinidad y estabilidad de unión de cada uno de los péptidos candidatos a la molécula presentadora HLA-A*02:01 fue determinada mediante ensayos de estabilización de dicha molécula en células T2 (Valmori, Fonteneau et al. 1998; Valmori, Gervois et al. 1998). Para ello en una placa de 96 pocillos fondo en U 2-4 x10⁵ células T2 por pocillo fueron incubadas con cantidades variables (75, 37,5 y 18,75 µM) de cada uno de los péptidos a ensayar en un volumen final de 200 µL de medio RPMI 1640 sin suero en duplicado. Como control positivo se utilizó un péptido derivado de la envoltura del virus de la hepatitis B HB-ENV₃₃₄₋₃₄₂, descrito como un péptido de alta afinidad a HLA-A*02:01 (Sette, Sidney et al. 1994), mientras que, como control negativo, se utilizaron las células incubadas con medio RPMI 1640 (sin péptido). Tras incubación toda la noche a temperatura ambiente las células fueron lavadas con 200 µL/pocillo de PBS 1x. Para determinar la estabilidad de unión de estos péptidos, tras la incubación las células son lavadas con PBS 1x, tomando alícuotas de los cultivos a

distintos tiempos de incubación (1, 2, 5 y 8 horas). Finalmente las células son teñidas con un anticuerpo específico de moléculas HLA-A2 (BB7.2 acoplado a PE) a una dilución 1/25, y lavadas nuevamente con PBS 1x para eliminar el exceso del anticuerpo. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Se adquirieron al menos 10000 células viables utilizando parámetros morfológicos (tamaño y granularidad celular). Los datos obtenidos fueron analizados empleando el programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson) y los valores de índice de fluorescencia (IF) se calcularon usando la fórmula:

$$\%IF = \frac{\text{Intensidad media de fluorescencia (MIF) muestra problema} - \text{MIF de C- (sin péptido)}}{\text{MIF de C- (sin péptido)}} \times 100$$

3.2.9.- Infección de ratones con *T. cruzi*

Infección experimental

Ratones transgénicos A2/K^b se infectaron por vía intraperitoneal con 2×10^4 tripomastigotes de la cepa Y provenientes de monocapas de células LLC-MK2 infectadas. Para comprobar la correcta infección de los ratones se monitorizó la parasitemia durante las tres semanas siguientes a la infección como en (Planelles, Thomas et al. 2003).

Aislamiento de esplenocitos

Tras la extracción estéril, el bazo de cada uno de los ratones previamente infectados, fue homogenizado en PBS al 1% SBF1 en una placa de Petri y empleando el émbolo de una jeringa estéril. Las células se disociaron mediante paso por una aguja hipodérmica de 20G. Seguidamente las células son lavadas y resuspendidas en 5 mL de tampón de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 1 mM, Na₂EDTA 0,1 mM pH7,4) durante 3 min. Transcurrido este tiempo fue añadido PBS con 1% SBF1 para detener la reacción y eliminados los agregados pasando la suspensión por un filtro de nylon (Falcon). Tras nuevamente lavar la células estas se resuspenden en medio RPMI1640-10% SFBI y se procede al recuento de las células viables por tinción con el colorante azul Trypan.

3.2.10.- Determinación de citoquinas por ELISA

2×10^5 esplenocitos se estimularon con diferentes péptidos a una concentración de $1 \mu\text{M}$ durante 30 h en un volumen final de $200 \mu\text{l}$ de RPMI-10% SFBI con $50 \mu\text{M}$ de β -mercaptoetanol (β -ME). Como controles se incluyeron células sin estimular y células estimuladas con un activador policlonal (PMA-ionomicina $0,5 \mu\text{g/mL}$). El sobrenadante de estos cultivos se utilizó para la determinación de INF- γ y TNF- α utilizando los kits Human INF- γ y TNF- α ELISA Set (BD OptEIA) respectivamente, siguiendo las indicaciones del fabricante. Así, en una placa de 96 pocillos se añadieron $100 \mu\text{L}$ del anticuerpo de captura a una dilución de 1/500 en PBS-10% SFBI. Se incubó toda la noche y posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS-0,05% Tween-20. La placa fue bloqueada añadiendo $200 \mu\text{L/pocillo}$ de PBS-10% SFBI durante 1h. Se repitieron nuevamente los lavados y se agregaron $100 \mu\text{L}$ tanto del estándar como del sobrenadante de las células post estimulación péptidica, procediéndose a incubar las muestras a evaluar durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras 5 lavados se añadieron $100 \mu\text{L/pocillo}$ del reactivo de detección (anticuerpo de detección biotinilado + conjugado enzimático avidina-HRP), se incubó una hora y tras el lavado se añadieron $100 \mu\text{L/pocillo}$ de solución de sustrato durante 30 min a temperatura ambiente. Deteniéndose la reacción con $25 \mu\text{L}$ de H_2SO_4 8N por pocillo. Los resultados obtenidos son leídos a 450 nm en un lector de placas.

3.2.11.- Obtención muestras biológicas

Procesamiento de la sangre

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de cada uno de los pacientes fueron obtenidas a partir de 30 mL de sangre extraída por punción venosa y con anticoagulante (EDTA-K3). Estas muestras fueron recolectadas al inicio del tratamiento (T0) y a intervalos regulares de tiempo post-inicio del tratamiento (T1, tres meses; T2, seis meses; T3, nueve meses; T4, doce meses; T5, quince meses; T6, veinte y cuatro meses; T7, treinta meses; y T8 treinta y seis meses).

La sangre extraída se vertió suavemente sobre un volumen de Lymphoprep (Axis-Shield), teniéndose 2 fases claramente diferenciadas. Se centrifugó 35 minutos a $800 \times g$ a temperatura ambiente, manteniendo la aceleración y freno de la centrifuga

desactivados. Las PBMC se obtuvieron de la interfase y seguidamente se lavaron dos veces en PBS 1X. Las células mononucleares obtenidas fueron criopreservadas en nitrógeno líquido en SFBI con 10% de DMSO. Por cuestiones técnicas no todos los ensayos se realizaron sobre todas las muestras.

Aislamiento y purificación de DNA genómico

La purificación del DNA genómico se realizó usando el kit de extracción QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi (Qiagen), siguiendo los pasos y recomendaciones del fabricante. Brevemente 1 mL de sangre periférica de cada uno de los pacientes e individuos sanos a evaluar es incubado con 200 μ L de proteasa (Qiagen), se mezcla por agitación y se lisan las células agregando 1,2 mL de tampón de lisis e incubando 10 minutos a 70°C. Seguidamente se agregó 1 mL de etanol absoluto y se transfirió la mezcla a una columna QIAamp Midi colum (Qiagen), se centrifugó a 1850 x g por 3 minutos y se descartó el filtrado. La desnaturalización de las proteínas en la muestra se realizó tras un lavado con tampón de lavado (clorhidrato de guanidina en 96% de etanol) mediante centrifugación a 4500 x g durante 2 minutos y un lavado con 70% de etanol mediante centrifugación a 4500 x g durante 18 minutos. El sobrenadante obtenido es descartado y seguidamente se agregan 200 μ L de tampón de elución (Tris-Cl 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 9) a la columna dejando en incubación 5 minutos a temperatura ambiente, finalmente el DNA es recuperado por centrifugación 4500 x g rpm durante 2 minutos.

La cuantificación del DNA extraído en cada una de las muestras se realizó directamente en 1 μ l de muestra empleando el equipo NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer. Este sistema cuantifica directamente la concentración de ácidos nucleicos mediante medida de absorbancia a 260nm y tomando como coeficiente de extinción 50 (μ g/ml)-1cm-1 para DNA de cadena doble. Así mismo se determinó tanto la contaminación de proteínas en la muestra según la relación A260:A280 como de azúcares según la relación A260:A230. Se considera puro un DNA cuando la relación A260:A280 está en torno a 1,8-2.

Identificación del haplotipo HLA de clase

La presencia del alelo HLA-A*02:01 en los pacientes ensayados fue determinado empleando un anticuerpo monoclonal (BB7-2-PE) que reconoce el dominio $\alpha 2$ de la molécula de clase I HLA-A2. Igualmente para cada individuo fue determinado la presencia del alelo HLA-A*02:01 empleando el kit comercial LABType®SSO Typing Tests (One Lambda, INC). Estos análisis fueron realizados en colaboración con el Dr. Miguel Ángel López Nevot en el Servicio de Análisis Clínico, Hospital Universitario "Virgen de las Nieves" en Granada.

3.2.12.- Detección de linfocitos T citotóxicos (ensayos ELISPOT).

La frecuencia de linfocitos T CD8⁺ péptido-específicos secretores de IFN γ y granzima B (GzB) fué determinada mediante el sistema ELISPOT sobre las células mononucleares criopreservadas, empleando anticuerpos de la casa comercial MABTECH y siguiendo el siguiente protocolo:

La placa de PVDF fue pre-humedecida con 15 μ L/pocillo de etanol 35% durante 1 min, seguido de tres lavados con 200 μ L/pocillo de agua estéril. Añadiéndose finalmente 100 μ L/pocillo del anticuerpo de captura a una concentración final de 2 μ g/mL para IFN γ y 5 μ g/mL para Granzima B en PBS. Tras una incubación toda la noche a 4°C la placa se lavó 5 veces con 200 μ L/pocillo de PBS y se procede al bloqueo de la placa por incubación con 200 μ L/pocillo de medio RPMI 1640-10% SFBI durante 30 min. Posteriormente el medio es descartado, procediendo a la adición de $5 \cdot 10^4$ células (PBMC) por pocillo en presencia de cada uno de los péptidos a ensayar, a concentración final de 1 μ M y por triplicado.

Como control negativo, se incluyeron células en ausencia de péptido, mientras que como control positivo las células fueron estimuladas con 0,5 μ g/mL PMA-ionomicina en el caso de la detección de IFN γ y con PHA (10 μ g/mL) para la determinación de Granzima B. En ambos casos las placas fueron incubadas 30 horas a 37°C con 5% CO₂, permitiendo que la citoquina o Granzima presente en la muestra se una al anticuerpo de captura. Tras el periodo de incubación el sobrenadante de cada uno de los pocillos fue recogido, alicuoteado y congelado a -20°C para la posterior determinación del perfil de citoquinas en dichas muestras. Seguidamente, las células son nuevamente lavados 5 veces con PBS 1X, agregando posteriormente 100 μ L/pocillo del anticuerpo de detección biotinilado a una concentración de 1 μ g/mL e incubándolas

durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras 5 nuevos lavados con PBS 1x, se agregó 100 μL /pocillo del conjugado enzimático estreptavidina-ALP (Sigma) a una dilución 1/6000. Tras 1 hora a temperatura ambiente, el exceso del conjugado fue removido mediante lavados, agregándose finalmente 50 μL /pocillo de la solución del sustrato (BCIP/NBT liquid, Sigma), deteniéndose la reacción una vez se establezca la coloración adecuada de los puntos control. La cuantificación de las células productoras de IFN γ o Granzima B se determinó en un microscopio AXIO PLAN 2 Imagine, empleando el programa KS ELISPOT (Zeiss) para el análisis de los resultados.

La respuesta se consideró positiva cuando el número de spots $\cdot 10^6$ células fue igual o mayor de 35 y al menos dos veces mayor al número de spots obtenidos en el control negativo que solo contiene medio de cultivo. El número de linfocitos T péptido-específicos fue determinado restando el número de linfocitos T obtenidos sin estimulación al número de linfocitos T obtenidos frente a cada uno de los péptidos ensayados.

3.2.13.- Determinación de citoquinas mediante ensayos Bio-plex

El nivel de citoquinas secretadas por las células mononucleares frente a cada uno de los péptidos ensayados fue determinado empleando el kit comercial BIO-PLEX Cytokine Assay (Bio-Rad). Las muestras evaluadas corresponden al sobrenadante de las células mononucleares estimuladas con cada uno de los péptidos en ensayos ELISPOT.

Para la realización de estos ensayos se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente, la placa de 96 pocillos se cubrió con la mezcla de esferas (25 μL /pocillo en PBS). Se realizaron 2 lavados con PBS-0.05% Tween-20. Se añadieron los estándares y las muestras (25 μL /pocillo en PBS) y se incubaron en agitación durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Tras 3 lavados, se añadió el anticuerpo de detección conjugado con biotina (25 μL /pocillo), se incubó con agitación durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados y se agregaron 25 μL /pocillo de la solución de revelado Streptavidina-PE (SAPE) incubando durante 10 minutos. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS, añadiendo posteriormente 125 μL de Assay Buffer, procediendo tras agitación a la lectura de resultados,

empleando el equipo BIO PLEX 200 System y adquiriendo al menos 100 esferas por analito y pocillo. La cuantificación de las citoquinas secretadas en cada una de las muestras se realizó empleando el programa Bio-Plex Manager 4.11 (Bio-Rad).

Como control positivo se emplearon células estimuladas con 0,5 µg/mL PMA+ionomicina mientras que como control negativo, se incluyeron células en ausencia de péptido. La respuesta se consideró positiva cuando los niveles de secreción (pg/mL) de cada una de las citoquinas evaluadas fue al menos tres veces mayor a los niveles obtenidos en el control con medio de cultivo (control blanco) y al menos de un valor de 5pg/mL para INFγ y TNFα, 15 pg/mL para IL6, 2 pg/mL para IL10, 5 pg/mL para IL17 y 2 pg/mL para IL2. La concentración expresada para cada una de las citoquinas se corresponde con los niveles de las mismas observados tras estimulación con el correspondiente péptido, menos los valores obtenidos en los pocillos sin estimulación.

3.2.14.- Caracterización fenotípica de linfocitos T CD8⁺ péptidos-específicos circulantes, mediante citometría de flujo.

Con el fin de analizar la presencia y frecuencia de linfocitos T CD8⁺ específicos para los péptidos más relevantes se emplearon dextrámeros acoplados a PE y APC de la casa comercial Immudex para los péptidos 12772; 12807; 18415; 12822, 12827; y K1, los cuales se corresponden con los péptidos más inmunogénicos contenidos en las proteínas HSP70, PFR2, PFR3, TcCA-2 y KMP11, respectivamente.

En una placa de 96 pocillos y fondo en U se añaden 1.10⁶ células/pocillo (PBMC) de cada uno de los individuos a evaluar (pacientes con enfermedad de Chagas y controles sanos), las células son lavadas con PBS-5% SFBI e incubadas con 10 µL de cada dextramero durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Seguidamente las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4°C en oscuridad con marcadores de superficie previamente titulados CD8-V500 (dilución 1/10), CD45RA-APCH7 (dilución 1/50), CCR7-V450 (dilución 1/10), CD27-FITC (dilución 1/25), CD127-PerCP-Cy5.5 (dilución 1/10) para determinar el fenotipo naive/efector de las subpoblaciones T circulantes, mientras que para determinar el estado de senescencia de los linfocitos T CD8⁺ de memoria péptido específicos se emplearon los siguientes marcadores de superficie CD8-PerCP-Cy5.5 (dilución 1/50), CD57-FITC (dilución 1/50) y CD44-

APCH7 (dilución 1/50). A continuación, las células se lavan dos veces PBS-5% SFBI, se resuspenden en 400 μ L de PBS y se analizan en un citometro de flujo FACSaria III cell sorter (BD biocienses). El análisis posterior de los datos adquiridos se realiza utilizando el programa FlowJo 7.6.5 (BD Biosciences).

3.2.15.-Determinación de la actividad Indolamil-2,3 deoxigenasa (IDO).

La actividad IDO fue determinada en células mononucleares provenientes de controles sanos y pacientes en diferentes fases de la enfermedad de Chagas. Para ello $5 \cdot 10^5$ PBMC fueron resuspendidas en 500 μ L de tampón Hanks (HBSS) al cual se agregó L-triptofano 100 μ M (Sigma-Aldrich). Transcurridas 24 horas de incubación a 37°C y 5% CO₂ se retiró el sobrenadante en el cual se determinará la concentración de kinurenina. Como control interno células THP-I y PBMC de donantes sanos fueron evaluadas en condiciones sin estimulación; estimuladas con un inductor de la actividad IDO (500 U/mL IFN γ , Miltenyi Biotec); o tratadas con un inhibidor de la actividad IDO 1-metil-triptófano (LM-T) de la casa Sigma-Aldrich a una concentración final de 100 μ M.

Para la determinación del nivel de kinurenina colocamos, sobre placas de 96 pocillos de fondo en U y por duplicado, 125 μ L del sobrenadante obtenido para cada uno de los individuos a evaluar, adicionando 25 μ L de ácido tricloroacético al 50% a cada pocillo. Seguidamente, cada una de las placas es incubada 1 hora a 4°C, seguido de 15 minutos a 65°C, y centrifugada a 1250 x g durante 10 minutos. Finalmente, 125 μ L del nuevo sobrenadante se transfiere a una placa de 96 pocillos de fondo plano que contiene un volumen de reactivo de Ehrlich (20 mg/ml p-dimetilbenzaldehido en ácido acético glacial, Sigma Aldrich), incubándose 2 horas a 4°C y determinando la densidad óptica a la longitud de onda de 492 nm. Como estándar se incluyó una curva patrón de L-kinurenina (Sigma)

3.2.16- Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo empleando el programa informático SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois, Estados Unidos). Las diferencias significativas entre los grupos de pacientes indeterminados,

cardiacos y controles sanos frente a cada una de las variables evaluadas fue determinada empleando el test no paramétrico de Mann Whitney. Las diferencias longitudinales post-tratamiento se evaluaron empleando el análisis no paramétrico de Wilcoxon. El test de tendencia Jonckheere-Terpstra, fue utilizado para correlacionar la actividad IDO y la severidad de la enfermedad de Chagas. Finalmente el análisis de correlación de Spearman fue empleado para evaluar la correlación entre la actividad IDO y la reactividad del suero parásito-específico medida por ELISA

Se consideró que las diferencias observadas son estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

4.-Resultados

4.1.- Identificación de epítopes CD8⁺ restringidos a la molécula HLA-A*02:01 contenidos en las proteínas HSP70, PFR2, PFR3 y TcCA-2 de T. cruzi.

4.1.1.- Identification of HLA-A*02:01-restricted CTL epitopes in Trypanosoma cruzi heat shock protein-70 recognized by Chagas disease patients.

Marañón, C; Egui, A; Carrilero, B; Thomas, MC; Pinazo, MJ; Gascón, J.; Segovia, M; López, MC.

Microbes and Infections, 2011; 13 (12-13): 1025-1032.

Impact Factor: 2.92 (26/70 Q2).

PMID: 21704723.



Original article

Identification of HLA-A*02:01-restricted CTL epitopes in *Trypanosoma cruzi* heat shock protein-70 recognized by Chagas disease patients

Concepción Marañoñ^{a,*}, Adriana Egui^a, Bartolomé Carrilero^b, M Carmen Thomas^a,
M Jesús Pinazo^c, Joaquim Gascón^c, Manuel Segovia^b, Manuel Carlos López^{a,**}

^a Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC), Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento S/N, 18100 Armilla, Spain

^b Hospital Virgen de la Arrixaca, Cra a Cartagena s/n, El Palmar, Murcia, Spain

^c Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic of Barcelona, Rosselló, 132, 4^a, 08036 Barcelona, Spain

Received 22 March 2011; accepted 24 May 2011

Available online 12 June 2011

Abstract

CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte (CTL) response is critical for controlling the infection of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. Since only a few CD8 antigens have been described in Chagas disease patients, the identification of new class I-restricted epitopes is urgently needed for the development of immunotherapies against *T. cruzi* infection. In this study, bioinformatic methods were used to predict HLA-A*02:01-binders, and 30 peptides were selected, synthesized and tested for HLA-A*02:01 binding. Among them, sixteen peptides with medium-to-high affinity were assayed for their recognition by CTL from HSP70-immunized or *T. cruzi*-infected transgenic B6-A2/K^b mice. Our results show that four immunodominant epitopes (HSP70_{210–8}, HSP70_{255–63}, HSP70_{316–24} and HSP70_{345–53}) are contained in the *T. cruzi* HSP70 antigen. Indeed two of them (HSP70_{210–8} and HSP70_{316–24}) were also recognized by CTL of HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients, indicating that these peptides are processed and displayed as MHC class I epitopes during the natural history of *T. cruzi* infection. The HLA-A*02:01 restriction was evidenced using peptide-pulsed K562-A2 cells as antigen-presenting cells. Both cytotoxic and cytokine-secreting activities were detected in response to the former two peptides and, moreover, 10/12 patients (83%) recognized at least one of these two HSP70-derived CD8⁺ epitopes.

© 2011 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Cytotoxic T lymphocytes; *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; Heat shock protein; CD8 antigen

1. Introduction

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) is the etiological agent of Chagas disease, a parasitic disease endemic of Latin America, where almost 8 million people are infected [1]. Current anti-parasitary chemotherapies are rather toxic, and their efficacy is not well established for those patients at the chronic phase of the disease. Thus, a protective immunoprophylaxis is needed to achieve the disease control. Studies performed in animal

models have established that parasite-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses are crucial to achieve immune protection against *T. cruzi* [2,3]. However, it is evident that natural immune responses are not strong enough to reach sterility, since parasites persist in tissues for decades, inducing cardiac and digestive-related pathologies. Several class I-restricted parasite antigens have been recently characterized [4–7], but data concerning CD8⁺ cell responses in Chagas patients are still scarce, and restricted to a few epitopes. Hence, for the development of an efficacious vaccine it is crucial to characterize new parasite antigens recognized by CD8⁺ T cell from Chagas disease patients.

During the last years, tumoral and microbial HSP70 proteins have been involved in a great number of immune-related

* Corresponding author. Tel.: +34 958715500; fax: +34 958637071.

** Corresponding author. Tel.: +34 958181661; fax: +34 958181632.

E-mail addresses: concepcion.maranon@genyo.es (C. Marañoñ), mclopez@ipb.csic.es (M.C. López).

processes, being considered as immunomodulators [8,9], as well as immunodominant B antigens [10,11]. Several microbial and tumoral HSP70-derived epitopes are recognized by CD8⁺ T lymphocytes of patients [12,13]. In particular, *T. cruzi* HSP70 protein has been characterized as an immunomodulatory protein [14,15], with adjuvant properties [16,17]. Since *T. cruzi* HSP70 is naturally well recognized by sera of Chagas disease patients (Fernández-Villegas et al. (unpublished) and [18–20]), we wondered whether this protein contains immunodominant MHC class I-restricted epitopes. Since HLA-A*02:01 allele is the most prevalent class I molecule in the Latin American population, we search for potential HLA-A*02:01-binding peptides in *T. cruzi* HSP70 using bioinformatic methods. Sixteen peptides were identified by their medium-to-high affinity to the HLA-A*02:01 molecule. Afterward, using B6-A2/K^b transgenic mice we found that four of these HSP70-derived peptides were recognized by cells from HSP70-immunized or infected animals. From these, two peptides were recognized by CTL of HLA-A*02:01-bearing Chagas disease patients, proving that HSP70-derived peptides are *in vivo* targets of naturally-occurring responses against *T. cruzi*. The cytotoxic and cytokine-secreting activities in response to these two peptides were also analyzed.

2. Materials and methods

2.1. Animals and parasites

Six- to eight-weeks old B6-A2/K^b [21] female mice were bred in the animal facilities of the Institute of Parasitology and Biomedicine López-Neyra CSIC. The Y strain of *T. cruzi* was used for experimental infection. Trypomastigotes were kept infectious by successive infections of BALB/c mice.

2.2. Study population

Blood samples from 12 adult HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients were collected in EDTA at Hospital Clínic in Barcelona and Hospital Virgen de la Arrixaca in Murcia, both in Spain. All patients were Spain-residents coming from endemic areas and were diagnosed by two conventional serological tests. Complementary tests were carried out to determine the clinical status of the patients. Accordingly, patients were diagnosed as indeterminate (IND, *n* = 6) or cardiac (CARD, *n* = 6). They had never received benznidazole/nifurtimox treatment. The protocols were approved by the Ethical Committees of Hospital Clínic, Hospital Virgen de la Arrixaca and Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Spain). A signed informed consent was obtained from all individuals prior to their inclusion in the study.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were purified by Ficoll density gradient, and were cryopreserved in inactivated fetal calf serum (FCS)-10% dimethyl sulfoxide in liquid nitrogen until tested. HLA-A genotyping was carried out using the RELI™ SSO HLA-A Typing Kit (Invitrogen).

2.3. Cell lines

Class I-negative K562 cells and TAP-deficient T2 cells were cultured in complete RPMI medium supplemented with 10% of inactivated Fetal Calf Serum (iFCS), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin. K562-A2 cells, expressing HLA-A*02:01 molecule, were kindly provided by Dr Peter Ponsaerts (University of Antwerp), with the permission of Dr. Cedrik Britten (Johanes Gutenberg-University Mainz), and cultured in the presence of 0.5 µg/ml of G-418 as described [22]. The murine EL-4 line line stably transfected with A2/K^b transgene was maintained in complete RPMI medium supplemented with 0.6 mg/ml G-418. The TAP-deficient line T2 line [23] was maintained in complete DMEM medium containing 10% of iFCS.

2.4. Prediction of HSP70-derived HLA-A*02:01 peptides

The prediction of potential HLA-A*02:01 ligands contained in *T. cruzi* HSP70 protein was carried out through the screening of the deduced amino acid sequence of *hsp70* gene (GenBank accession number: X13690) using two HLA-A2-binding affinity algorithms: SYPFEITHI (<http://www.syfpeithi.de> [24]) and RANK-PEP (<http://immunax.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html> [25]).

2.5. Synthetic peptides

Peptides bearing HLA-A*02:01-binding motifs were synthesized by simultaneous multiple peptide solid-phase method. Peptides were assembled using the standard t-Boc solid-phase peptide synthesis (SPPS) strategy on a p-methyl-benahydramine (MBHA) resin. Purity was checked by HPLC, and correct composition verified by mass spectrometry. Peptides were dissolved to 1 mM final concentration in water containing 10% DMSO and stored at –20 °C.

2.6. HLA-A*02:01-binding assay

HLA-A*02:01 surface stabilization tests were carried out as described in [16]. Briefly, TAP-deficient T2 cells were loaded with different quantities of peptide in duplicates in serum-free RPMI medium, and incubated overnight at room temperature. After incubation, cells were stained for conformationally correct HLA-A*02:01 surface expression by flow cytometry with an HLA-A2-specific antibody (BB7.2 clone, BD biosciences). At least 10,000 live cells were gated according to FSC and SSC parameters in a BD-FACScan device, and analyzed using CellQuest software.

The high-affinity HLA-A*02:01-binding peptide FLU-MA_{58–66} was included as internal standard [26]. Affinity data were calculated as percentage of maximum complex stabilization as described [27] using the formula: % of maximal stabilization = 100 × [(mean fluorescence with peptide) – (background mean fluorescence)] / [(mean fluorescence with 100 µM of FLU-MA peptide) – (background mean fluorescence)], where background fluorescence means the fluorescence value obtained with T2 cells incubated at the same conditions without peptide.

2.7. Induction of HSP70-specific CTL responses in mice

HSP70 recombinant protein was overexpressed in *E. coli* and purified as described in Ref. [14]. For HSP70 immunization the protocol described in Ref. [16] was used with modifications. Briefly, mice received subcutaneously in the tail base 100 µg of tetanus toxoid p30 peptide in incomplete Freund adjuvant (IFA), followed by 100 µg of tetanus toxoid p30 peptide and 10 µg of recombinant *T. cruzi* HSP70 protein in IFA three weeks later. Ten days after HSP70 immunization, animals were sacrificed by CO₂ anoxia and inguinal lymph nodes were extracted and homogenized in sterile conditions.

For experimental *T. cruzi* infection, B6/A2-K^b mice were intraperitoneally infected with 1000 trypomastigotes of Y strain obtained from the plasma of an infected mouse. Six weeks later, mice were boosted through the inoculation of 10⁵ trypomastigotes. The animals were sacrificed eight weeks after the second infection, and spleens were extracted and homogenized. Splenocytes were washed twice with RPMI-1640 medium (RPMI), and incubated 3 min at room temperature in ACK buffer (0.15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) and washed with RPMI.

Splenocytes or lymph node cells were tested for cytotoxic T Lymphocyte (CTL) activity using a 4 h chromium-release assay as described [16] at a killer-to-target ratio of 30:1 in the presence of the antigenic peptide (1 µM), and using EL4-A2/K^b cells as antigen presenting cells (APC). Samples were assayed in duplicates. Controls were tested in tetraplicates: spontaneous release (target cells alone) and total release (target cells treated with 2% Triton X-100). Results were expressed as percentage of specific lysis using the formula: % of specific lysis = 100 × (experimental release – spontaneous release)/(total release – spontaneous release). Responses were considered significant if i) a minimum of 10% of specific lysis was measured; ii) this value was at least twofold that obtained with the negative control without peptide and iii) standard deviation was less than 10% of the measured value.

2.8. ELISPOT

To determine the frequency of granzyme B (GzB)-producing cells, an ELISPOT assay was used as described [28]. Briefly, 50,000 PBMC were incubated for 30 h with 1 µM of each peptide in triplicates at 37 °C in 96-well PVDF membrane-bottom plates (Millipore), coated with an anti-GzB monoclonal antibody (Mabtech). After washing with PBS, a biotinylated GzB-specific antibody was added in 0.5% iFCS in PBS O/N at 4 °C. Afterward, wells were extensively washed and incubated with stravidin-alkaline phosphatase (Sigma). After 1 h of incubation at 37 °C, plates were washed and incubated with NBT-BCIP substrate (Sigma). The positive control consisted of 10 µg/ml PHA (Sigma). Spots were visualized using a KS ELISPOT device (Zeiss). Only large spots with fuzzy borders were scored as spot-forming cells (SFC). Responses were considered significant if (i) a minimum of 30 SFC/10⁶ PBMC were detected after subtraction of the negative control

(PBMC without peptide), and additionally, (ii) the response was at least over twofold the negative control.

2.9. Cytokine-secretion tests

In order to evaluate the cytokine-secretion potential of peptide-specific T lymphocytes, 50,000 PBMC were incubated in triplicates with 1 µM of each peptide at 37 °C in a 96-well plate. The positive control consisted of 50 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 500 ng/ml ionomycin (Sigma). After 30 h, supernatants were removed, and stored in aliquots at –80 °C until use. IFNγ and TNFα were tested in these supernatants using bioplex kits (Bio-rad), following the recommendations of the manufacturer. Responses were considered significant if (i) a minimum concentration of 5 pg/ml was measured, and additionally, (ii) this concentration was at least three times that obtained with the negative control (PBMC without peptide).

In some experiments (three patients), peptide-pulsed K562-A2 cells were used as APC. Briefly, plates were seeded with 20,000 peptide-pulsed K562-A2 [22] or K562 cells as a negative control. APC were incubated with 60,000 effector cells/well and cytokine-secretion tests were performed as before.

2.10. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS statistical package version 15.0 (Spss Inc., Chicago Illinois). Pearson correlation analysis was used to evaluate the correlation between theoretical HLA-A*02:01-binding affinities and experimental binding values. Significant correlation was assigned at a value of $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Selection of HLA-A*02:01-binding peptides within *T. cruzi* HSP70 protein

The deduced amino acid sequence of *T. cruzi* HSP70 was screened for peptides containing potential HLA-A*02:01-binding sites, combining prediction algorithms for HLA binding (SYFPEITHI: www.syfpeithi.de [24] and RANKPEP: <http://immunax.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html> [25]). Thus, 30 peptides which showed mid-to-high scores in any of these algorithms were synthesized and tested for HLA-A*02:01 binding in T2-binding assays (Table 1). In this test, the measured accumulation of HLA-A*02:01 molecules on the surface of T2 cells reflects the capacity of each exogenous peptide to bind and stabilize this class I molecule [27]. The experimental results were normalized with the fluorescence index values obtained with the FLU-MA_{58–66} peptide, as shown in Table 1, (relative FI). Since a positive correlation between HLA-binding affinity and immunogenicity has been described [16,29], 16 peptides with medium-high affinity (relative FI > 30) were selected for further tests.

Table 1
Sequences of HSP70-derived HLA-A*0201-binding peptides.

| Peptide | Position | Sequence | SYFPEITHI score | RANKPEP score ^a | Relative FI ^b |
|---------------|----------------|-------------------|-----------------|----------------------------|--------------------------|
| <i>FLU-MA</i> | 58–66 | GILGFVFTL | 30 | 95 | 100 |
| 12759 | 41–50 | YVAFTDTERL | 17 | 59 | 12 |
| 12760 | 58–67 | QVAMNPTNTV | 19 | 63 | 29 |
| 12761 | 73–82 | LIGRKFSDPV | 20 | 49 | 9 |
| 12762 | 86–95 | DMKHWPFKVI | 13 | 27 | 57 |
| 12763 | 94–103 | VITKGDDKPV | 20 | 54 | 21 |
| 12764 | 122–31 | SMVLSKMKEI | 19 | 69 | 53 |
| 12765 | 127–36 | KMKEIAESYL | 20 | 67 | 53 |
| 12766 | 135–44 | YLGKQVKKAV | 22 | 78 | 6 |
| 12767 | 164–73 | TIAGMEVLRI | 25 | 71 | 12 |
| 12768 | 173–82 | IINEPTAAAI | 24 | 76 | 12 |
| 12769 | 181–9 | AIAYGLDKV | 29 | 76 | 58 |
| 12770 | 188–97 | KVADGKERNV | 18 | 52 | 5 |
| 12771 | 201–9 | DLGGGTFDV | 25 | 70 | 7 |
| 12772 | 210–8 | TLITIDGGI | 21 | 61 | 100 |
| 12773 | 255–263 | DSLTLNLRAL | 16 | 49 | 73 |
| 12774 | 276–84 | TSSAAQATI | 12 | 56 | 78 |
| 12775 | 311–320 | ELFRGTLQPV | 22 | 62 | 5 |
| 12776 | 316–24 | TLQPVERVL | 22 | 65 | 47 |
| 12777 | 328–37 | KMDKRAVHDV | 24 | 52 | 146 |
| 12778 | 337–46 | VVLVGGSTRI | 15 | 61 | 23 |
| 12779 | 345–53 | RIPKVMQLV | 18 | 61 | 64 |
| 12780 | 395–404 | LLLDVTPRTL | 28 | 89 | 151 |
| 12781 | 422–30 | TIPTKKSQI | 17 | 65 | 21 |
| 12782 | 458–67 | LLGTFELSGI | 25 | 68 | 120 |
| 12783 | 466–74 | GIPPPRGV | 23 | 47 | 135 |
| 12785 | 504–13 | IVLTNDKGRL | 18 | 72 | 15 |
| 12786 | 564–73 | KIEEADKKT | 19 | 62 | 43 |
| 12787 | 572–81 | TITSAVEEAL | 18 | 78 | 14 |
| 12788 | 612–20 | KMYQGMAGA | 19 | 64 | 99 |
| 12789 | 626–35 | GMPGGMPGGM | 16 | 12 | 53 |

^a 9-mer threshold 60; optimal 149. 10-mer threshold 43; optimal 118.

^b Peptides with relative FI > 30 are in bold.

3.2. Characterization of HSP70-derived epitopes recognized by CTL of transgenic B6-A2/K^b mice

HSP70 proteins from several pathogens have been described as targets of CD8⁺ T lymphocytes [12,30]. Although the *T. cruzi* HSP70 protein has been reported to be a strong B antigen in natural infection [18,19], its potential to induce a cytotoxic response has not been still described. In order to determine whether any of the selected HLA-A*02:01-binding peptides is recognized as a CTL epitope, we took advantage of B6-A2/K^b transgenic mice. Animals were immunized with recombinant *T. cruzi* HSP70 protein as described above. Ten days after immunization, mice were sacrificed and lymph node cells were used as effectors in cytotoxic tests *ex vivo*, using EL-4-A2/K^b cells pulsed with the candidate peptides as target cells. As shown in Fig. 1A, although the detected responses were in general moderate, three peptides (HSP70_{210–8}, HSP70_{255–63}, HSP70_{345–53}) were recognized by lymph node cells from immunized mice, providing evidence of the existence of immunodominant cytotoxic epitopes in the *T. cruzi* HSP70 protein. These three epitopes are located in the amino half of the protein and none of them were recognized by the lymph node cells of PBS-inoculated control mice (data not shown).

In order to determine which of the 16 identified peptides with medium-high affinity by HLA-A*02:01 molecule are

natural antigens in *T. cruzi* experimental infection, B6-A2/K^b mice were infected with blood trypanosomes and, once they entered in the chronic phase of the infection, were reinfected in order to boost *in vivo* the parasite-specific response. Then, the splenocytes of these reinfected mice were tested for cytotoxic activity using HLA-A*02:01-binding peptides. The HSP70_{210–8} and HSP70_{316–24} peptides were recognized by the splenocytes of infected mice with lysis values of 13.1% and 13%, respectively (Fig. 1B). Remarkably, HSP70_{210–8} peptide had previously been identified as an immunodominant epitope in the experiments carried out with HSP70-immunized mice (Fig. 1A). None of the tested peptides were recognized by the splenocytes of non-infected mice as before (data not shown). Thus, both HSP70 immunization and *T. cruzi* infection induce HSP70-specific CTL responses in B6-A2/K^b transgenic mice.

3.3. Naturally-occurring CTL responses against HSP70 epitopes in Chagas disease patients

Since in B6-A2/K^b mice and human CD8⁺ T cell repertoires against HLA-A*02:01-restricted epitopes are almost wholly overlapping [31], it was interesting to analyze whether cells from *T. cruzi*-infected transgenic mice and HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients could recognize the same

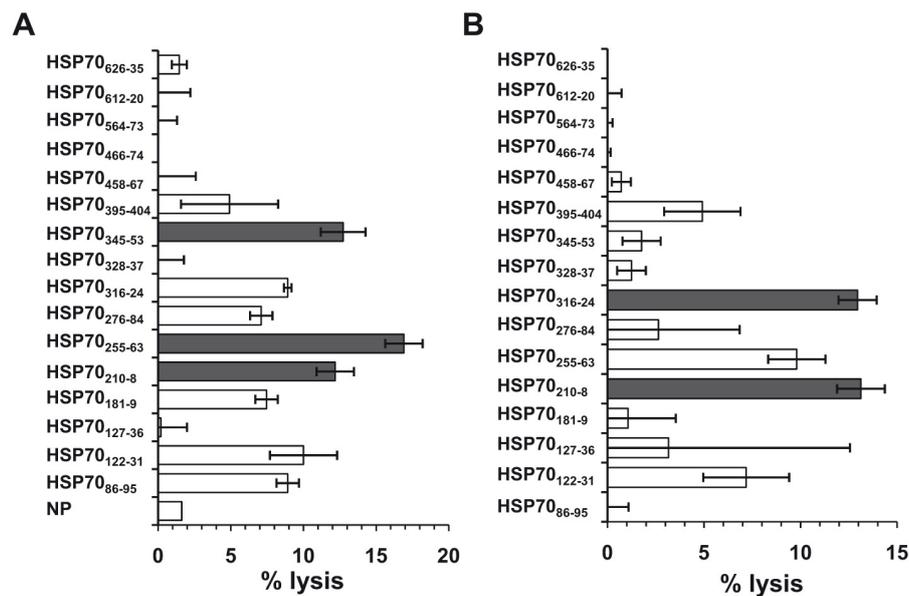


Fig. 1. Detection of CTL activity specific for *T. cruzi* HSP70-derived HLA-A*02:01-binding peptides in B6-A2/K^b mice. (A) B6-A2/K^b mice were immunized with HSP70 recombinant protein and their lymph node cells were tested for peptide-specific cytotoxic activity by a chromium-release test. NP: no peptide. (B) B6-A2/K^b mice were infected intraperitoneally with *T. cruzi* trypomastigotes and their splenocytes were tested for peptide-specific cytotoxic activity as before. Mean values and standard deviations of at least three animals are represented. Data shown as solid bars correspond to positive responses, as defined in Materials and Methods section.

HSP70 epitopes. Thus, we studied the presence of CTL capable of recognizing *T. cruzi* HSP70-derived epitopes among the PBMC of Chagas disease patients. The HSP70₂₁₀₋₈ and HSP70₃₁₆₋₂₄ peptides were chosen as they were recognized by *T. cruzi*-infected B6-A2/K^b mice. Hence, PBMC were purified from blood samples of 12 HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients who came from endemic areas and were currently Spanish-resident. A GzB ELISPOT test was used for the measurement of cytotoxic activity ex vivo. As shown in Table 2 a positive GzB response was detected in 6 out of 12 patients in response to HSP70₂₁₀₋₈ epitope. Interestingly, four of these patients did also recognize the

HSP70₃₁₆₋₂₄ epitope by means of a positive GzB response (Table 2). When the cytokine secretory function was investigated, positive responses were detected for IFN γ production in 6 (50%) and 5 (42%) patients, for HSP70₂₁₀₋₈ and HSP70₃₁₆₋₂₄ epitopes, respectively (Table 2). As also shown in Table 2, TNF α secretion was detected in 4 (33%) and 5 (42%) patients for HSP70₂₁₀₋₈ and HSP70₃₁₆₋₂₄ peptides, respectively. It is noteworthy that 10 out of 12 patients (83%) recognized at least one of the two HSP70-derived epitopes, since only two patients (#2 and #10) did not show any HSP70-specific response in terms of either GzB- or cytokine-secretion. However, there no correlation was found between

Table 2
Granzyme B- and cytokine-secreting responses in HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients.

| Patient ^a | Clinical form ^b | GzB (SCF/106 PBMC) ^c | | | IFN γ (pg/ml) ^d | | | TNF α (pg/ml) ^d | | |
|----------------------|----------------------------|---------------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|
| | | NP ^e | HSP70 ₂₁₀₋₈ | HSP70 ₃₁₆₋₂₄ | NP | HSP70 ₂₁₀₋₈ | HSP70 ₃₁₆₋₂₄ | NP | HSP70 ₂₁₀₋₈ | HSP70 ₃₁₆₋₂₄ |
| #1 | CARD | 13 | 13 | 33 | 2 | 5 | 22 | 0.5 | 13 | 44 |
| #2 | CARD | 7 | 0 | 13 | 10 | 10 | 10 | 3 | 8 | 7 |
| #3 | CARD | 373 | 327 | 300 | 0.8 | 11 | 16 | 0.4 | 11 | 6 |
| #4 | CARD | 13 | 60 | 73 | 5 | 5 | 11 | 25 | 7 | 4 |
| #5 | IND | 40 | 87 | 93 | 2 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 |
| #6 | CARD | 73 | 327 | 407 | 0.8 | 6 | 21 | 0.3 | 2 | 8 |
| #7 | IND | 233 | 213 | 227 | 5 | 199 | 193 | 0.5 | 83 | 104 |
| #8 | CARD | 53 | 173 | 106 | 5 | 28 | 22 | 1 | 19 | 27 |
| #9 | IND | 67 | 133 | 127 | 0.6 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| #10 | IND | 7 | 27 | 13 | 4 | 7 | 3 | 18 | 29 | 28 |
| #11 | IND | 0 | 0 | 0 | 3 | 13 | 5 | 16 | 16 | 7 |
| #12 | IND | 33 | 68 | 33 | 2 | 6 | 4 | 8 | 15 | 12 |

^a Chagas disease patients bearing HLA-A*02:01 molecule.

^b IND: indeterminate; CARD: cardiac forms of Chagas disease

^c positive responses (≥ 35 SFC/106 PBMC superior to NP, and at least twofold NP) are in bold.

^d positive responses (≥ 5 pg/ml, and at least three times NP) are in bold.

^e NP, no peptide.

HSP70-specific responses (GzB- or cytokine-secretion) and the clinical form of the Chagas disease (data not shown). Neither a positive cytotoxic activity nor cytokine secretion was detected in any of the 8 healthy donors which were tested (data not shown).

In order to assess that the epitopes under study are restricted to the HLA class I molecule HLA-A*02:01, K562-A2 cells were used as APCs in IFN γ secretion tests. As shown in Fig. 2, PBMC of HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients recognized HSP70_{210–8} and HSP70_{316–24} epitopes when they were presented at the surface of K562-A2 cells, but not that of K562 cells, which do not express Class I molecules. These data provide evidence that both HSP70-derived epitopes are restricted to HLA-A*02:01.

4. Discussion

In this study, we have identified two *T. cruzi* HSP70 CD8⁺ epitopes, restricted to HLA-A*02:01 molecule, which are processed and presented during natural infection by the *T. cruzi* parasite. CD8⁺ T cell responses are required to achieve immune protection against several pathogens including *T. cruzi* [3], where both CTL and cytokine-secreting activities (mainly IFN γ and TNF α) seem to be involved. Until now, only a few class I-restricted antigens have been described to be recognized by Chagas disease patients and indeed, the functionality of the CD8⁺ T lymphocytes specific for most of them have not been fully characterized. Transialidase (Ts) family members constitutes the best-characterized *T. cruzi* CD8 antigens recognized by Chagas disease patients. However, it seems that Ts-specific CD8⁺ responses are not mediating immune protection, and consequently their potential for immunoprophylaxis is limited [32]. Thus, in order to have a deeper knowledge of the immune-related mechanisms leading to protection against *T. cruzi* infection, new CD8⁺ targets derived from *T. cruzi* proteins have to be identified and characterized.

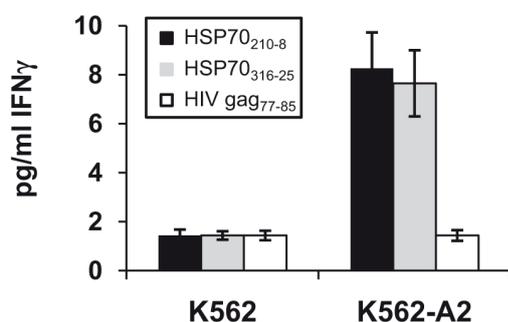


Fig. 2. Recognition of HSP70_{210–8} and HSP70_{316–24} epitopes is restricted to HLA-A*02:01. K562 or K562-A2 cells were pulsed with 1 μ M of the indicated peptide for 1 h. After extensive washing, they were cocultured with PBMC of an HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patient in an IFN γ secretion test. IFN γ was measured in the supernatants after 30 h of culture. HIV gag_{77–85} peptide was included as a negative control. IFN γ secretion data of a representative patient is shown. Error bars correspond to standard deviations of three independent assays.

In this study, we have combined two independent bioinformatic algorithms for the prediction of HLA-A*02:01-binding peptides followed by an in vitro binding assay and an in vivo immunogenicity evaluation using transgenic B6-A2/K^b mice. Although a good correlation was found between the two binding affinity prediction algorithms ($r = 0.531$, $p = 0.002$), several peptides had discordant scores (Table 1). In general a poor correlation was found between predicted and experimental HLA-binding data, whereas SYFPEITHI algorithm gave better correlation with the experimental binding data ($r^2 = 0.124$, $p = 0.049$) than RANKPEP ($r^2 = 0.004$, $p = 0.731$). Accordingly, poor correlation coefficients have recently been described between experimental and theoretical HLA-A*02:01-binding data for both algorithms [33].

The immunogenicity of candidate peptides were evaluated in HSP70-immunized and *T. cruzi*-infected B6-A2/K^b transgenic mice. In this study, HSP70_{210–8} was recognized by both immunized and infected animals, indicating that this is a highly immunodominant peptide, and that it could be involved in immune protection. In agreement with this, immune protection mediated by HSP70-containing vaccine formulations had already been described [17,34]. On the other hand, HSP70_{345–53} and HSP70_{255–63} epitopes were only recognized by immunized mice, while HSP70_{316–24} was exclusively recognized by infected animals. These data suggest that the context of antigen presentation may be conditioning the efficiency of presentation of the different epitopes.

In our system, we found an excellent correlation between B6-A2/K^b mice and human immunogenicity, as the two peptides which were selected using infected B6-A2/K^b mice were also well recognized by Chagas disease patients. The humanized transgenic B6-A2/K^b mice have already been successfully used as a model in order to predict HLA-A*02:01-restricted epitopes in tumors [35] and pathogens [36,37]. Moreover, we [16,17] and others [5] have also taken advantage of this model to identify *T. cruzi* CD8⁺ epitopes, finding a good correspondence between the *in vivo* immunogenicity and the *ex vivo* recognition by CD8⁺ T cells of Chagas disease patients [4]. Taken together, all these data indicate that this model constitutes an invaluable tool for the characterization of new *T. cruzi*-derived CD8⁺ epitopes.

Using this approach, we have proven the recognition of HSP70_{210–8} and HSP70_{316–24} epitopes by PBMC of HLA-A2⁺ Chagas disease patients, as an indication of the efficient processing of this protein for class I-restricted presentation during natural infection. It has been reported that *T. cruzi* membrane-associated and secreted proteins are preferentially processed for class I-restricted presentation [38]. HSP70 is a cytosolic protein, but it is likely that this protein is also secreted in high quantities, as it has been described for prokaryote [39], mammalian HSP70 [40], and also in *Leishmania braziliensis* HSP70 [41]. Moreover, it has been reported that HSP70 can be found associated to *T. cruzi* trypomastigote cell membrane [42]. Thus, class I-restricted presentation of HSP70 antigen is favored by its cellular location.

It is noteworthy that HSP70-specific responses are multifunctional, as both cytotoxic activity and pro-inflammatory

cytokine secretion were detected. It has been described that CD8⁺-mediated immunoprotection against *T. cruzi* is mediated not only by GzB-mediated cytotoxicity [43], but also by their cytokine-secretion potential, mainly IFN γ and TNF α [3]. Consequently, HSP70-specific CD8⁺ T cell share the functional characteristics required to participate in immune protection. In our hands 10 out of 12 patients (83%) recognized at least one of the two HSP70-derived epitopes (Table 2). This frequency of recognition is strikingly high compared with those reported for other *T. cruzi*-derived antigens: 2/12 (17%) for KMP11 [4], 4/37 (11%) for CaBP ([44], 4/8 (50%) for cruzipain, 5/8 (63%) for FL-160 [6], and 18/45 (40%) for trans-sialidases (Ts) [45]. Thus, HSP70_{210–8} and HSP70_{316–24} peptides are broadly recognized epitopes, and can constitute a strong tool for the monitoring the characteristic of *T. cruzi*-specific CD8⁺ responses in Chagas disease patients. The HSP70_{210–8} and HSP70_{316–24} epitopes share 69% identity with the equivalent counterparts in the human HSP70. Moreover, differences in the response against these peptides are not observed between symptomatic and indeterminate patients. The determination of the prevalence of HSP70-specific CD8 responses as well as the potential cross-reactivity of the homologous peptides from the human protein using a larger amount of patients with Chagas disease will be addressed in the near future. Since HLA-A*02:01 is the most prevalent human Class I allele [46], the identification of epitopes restricted to this presenting molecule is of a high value for vaccine and immunomonitoring purposes. Furthermore, it has been described that class I-restricted peptides can frequently bind several HLA alleles [47,48], and can thus be presented and recognized by a larger population. The possibility of these two characterized HSP70 epitopes binding to other HLA class I molecules, and being recognized by HLA-A*02:01-negative Chagas disease patients, will be shortly explored.

The data of the present manuscript highlight the validity of the B6-A2/K^b for the identification of class I-restricted immunodominant parasite antigens. Thus, we have identified two novel HLA-A*02:01-restricted *T. cruzi* epitopes in Chagas disease patients, contained in the immunodominant antigen HSP70. Furthermore, these newly-described epitopes will be useful to clarify the immune responses generated against *T. cruzi*, and will help to develop a Chagas disease vaccine.

Acknowledgments

We thank J. Muñoz and A. Iborra for collecting biological samples, L. Montosa and A.I. Fernández for their technical assistance in the purification of peripheral mononuclear cells from blood samples, M.A. López-Nevot, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, for HLA-A typing, P. Ponsaerts, Antwerp University and C. Britten, Johannes Gutenberg-University, for the K562-A2 cell line, and M.E. Patarroyo and O. Noya for the synthetic peptides. This work was supported by Grants P08-CVI-04037 from PAI (Junta de Andalucía), BFU2010-1670 from Plan Nacional I + D + i (MICINN) and RD06/0021/0014 from ISCIII-RETIC (MICINN Spain and FEDER).

References

- [1] A. Rassi Jr., A. Rassi, J.A. Marin-Neto, Chagas disease, *Lancet* 375 (2010) 1388–1402.
- [2] J.M. Bustamante, L.M. Bixby, R.L. Tarleton, Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8⁺ T central memory response in chronic Chagas disease, *Nat. Med.* 14 (2008) 542–550.
- [3] A.M. Padilla, J.M. Bustamante, R.L. Tarleton, CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection, *Curr. Opin. Immunol.* 21 (2009) 385–390.
- [4] H. Diez, M.C. Lopez, M. Del Carmen Thomas, F. Guzman, F. Rosas, V. Velazco, J.M. Gonzalez, C. Puerta, Evaluation of IFN-gamma production by CD8 T lymphocytes in response to the K1 peptide from KMP-11 protein in patients infected with *Trypanosoma cruzi*, *Parasite Immunol.* 28 (2006) 101–105.
- [5] D.L. Martin, D.B. Weatherly, S.A. Laucella, M.A. Cabinian, M.T. Crim, S. Sullivan, M. Heiges, S.H. Craven, C.S. Rosenberg, M.H. Collins, A. Sette, M. Postan, R.L. Tarleton, CD8⁺ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes, *PLoS Pathog.* 2 (2006) e77.
- [6] S.G. Fonseca, H. Moins-Teisserenc, E. Clave, B. Ianni, V.L. Nunes, C. Mady, L.K. Iwai, A. Sette, J. Sidney, M.L. Marin, A.C. Goldberg, L. Guilherme, D. Charron, A. Toubert, J. Kalil, E. Cunha-Neto, Identification of multiple HLA-A*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8⁺ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients, *Microbes Infect.* 7 (2005) 688–697.
- [7] F. Garcia, P. Sepulveda, P. Liegeard, J. Gregoire, E. Hermann, F. Lemonnier, P. Langlade-Demoyen, M. Hontebeyrie, Y.C. Lone, Identification of HLA-A*0201-restricted cytotoxic T-cell epitopes of *Trypanosoma cruzi* TcP2beta protein in HLA-transgenic mice and patients, *Microbes Infect.* 5 (2003) 351–359.
- [8] B. Henderson, Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators, *Cell Biochem. Funct.* 28 (2010) 1–14.
- [9] M.F. Tsan, B. Gao, Heat shock proteins and immune system, *J. Leukoc. Biol.* 85 (2009) 905–910.
- [10] C. Bonorino, N.B. Nardi, X. Zhang, L.J. Wysocki, Characteristics of the strong antibody response to mycobacterial Hsp70: a primary, T cell-dependent IgG response with no evidence of natural priming or gamma delta T cell involvement, *J. Immunol.* 161 (1998) 5210–5216.
- [11] J. Greiner, M. Ringhoffer, M. Taniguchi, T. Hauser, A. Schmitt, H. Dohner, M. Schmitt, Characterization of several leukemia-associated antigens inducing humoral immune responses in acute and chronic myeloid leukemia, *Int. J. Cancer* 106 (2003) 224–231.
- [12] J.P. Carralot, C. Dumrese, R. Wessel, R. Riessen, I. Autenrieth, S. Walter, O. Schoor, S. Stevanovic, H.G. Rammensee, S. Pascolo, CD8⁺ T cells specific for a potential HLA-A*0201 epitope from *Chlamydomonas pneumoniae* are present in the PBMCs from infected patients, *Int. Immunol.* 17 (2005) 591–597.
- [13] O. Faure, S. Graff-Dubois, L. Bretaudeau, L. Derre, D.A. Gross, P.M. Alves, S. Cornet, M.T. Duffour, S. Chouaib, I. Miconnet, M. Gregoire, F. Jotereau, F.A. Lemonnier, J.P. Abastado, K. Kosmatopoulos, Inducible Hsp70 as target of anticancer immunotherapy: identification of HLA-A*0201-restricted epitopes, *Int. J. Cancer* 108 (2004) 863–870.
- [14] C. Maranon, L. Planelles, C. Alonso, M.C. Lopez, HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis, *Int. Immunol.* 12 (2000) 1685–1693.
- [15] K.R. Qazi, W. Oehlmann, M. Singh, M.C. Lopez, C. Fernandez, Microbial heat shock protein 70 stimulatory properties have different TLR requirements, *Vaccine* 25 (2007) 1096–1103.
- [16] C. Maranon, M.C. Thomas, L. Planelles, M.C. Lopez, The immunization of A2/K(b) 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.* 38 (2001) 279–287.
- [17] L. Planelles, M.C. Thomas, C. Alonso, M.C. Lopez, DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection, *Infect. Immun.* 69 (2001) 6558–6563.

- [18] J.M. Requena, M. Soto, F. Guzman, A. Maekelt, O. Noya, M.E. Patarroyo, C. Alonso, Mapping of antigenic determinants of the *T. cruzi* hsp70 in chagasic and healthy individuals, *Mol. Immunol.* 30 (1993) 1115–1121.
- [19] G.M. Krautz, J.D. Peterson, L.M. Godsel, A.U. Krettli, D.M. Engman, Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58 (1998) 137–143.
- [20] I.D. Flechas, A. Cuellar, Z.M. Cucunuba, F. Rosas, V. Velasco, M. Steindel, C. Thomas Mdel, M.C. Lopez, J.M. Gonzalez, C.J. Puerta, Characterising the KMP-11 and HSP-70 recombinant antigens' humoral immune response profile in chagasic patients, *BMC Infect. Dis.* 9 (2009) 186.
- [21] A. Vitiello, D. Marchesini, J. Furze, L.A. Sherman, R.W. Chesnut, Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex, *J. Exp. Med.* 173 (1991) 1007–1015.
- [22] C.M. Britten, R.G. Meyer, T. Kreer, I. Drexler, T. Wolfel, W. Herr, The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays, *J. Immunol. Methods* 259 (2002) 95–110.
- [23] H.J. Zwecrink, M.C. Gammon, U. Utz, S.Y. Sauma, T. Harrer, J.C. Hawkins, R.P. Johnson, A. Sirotina, J.D. Hermes, B.D. Walker, W.E. Biddison, Presentation of endogenous peptides to MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in transport deletion mutant T2 cells, *J. Immunol.* 150 (1993) 1763–1771.
- [24] H. Rammensee, J. Bachmann, N.P. Emmerich, O.A. Bachor, S. Stevanovic, SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs, *Immunogenetics* 50 (1999) 213–219.
- [25] P.A. Reche, J.P. Glutting, H. Zhang, E.L. Reinherz, Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles, *Immunogenetics* 56 (2004) 405–419.
- [26] F. Gotch, J. Rothbard, K. Howland, A. Townsend, A. McMichael, Cytotoxic T lymphocytes recognize a fragment of influenza virus matrix protein in association with HLA-A2, *Nature* 326 (1987) 881–882.
- [27] R.R. Pogue, J. Eron, J.A. Frelinger, M. Matsui, Amino-terminal alteration of the HLA-A*0201-restricted human immunodeficiency virus pol peptide increases complex stability and in vitro immunogenicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92 (1995) 8166–8170.
- [28] G. Hoeffel, A.C. Ripoché, D. Matheoud, M. Nascimbeni, N. Esciou, P. Lebon, F. Heshmati, J.G. Guillet, M. Gannage, S. Caillat-Zucman, N. Casartelli, O. Schwartz, H. De la Salle, D. Hanau, A. Hosmalin, C. Maranon, Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells, *Immunity* 27 (2007) 481–492.
- [29] E. Keogh, J. Fikes, S. Southwood, E. Celis, R. Chesnut, A. Sette, Identification of new epitopes from four different tumor-associated antigens: recognition of naturally processed epitopes correlates with HLA-A*0201-binding affinity, *J. Immunol.* 167 (2001) 787–796.
- [30] C. Gaudin, F. Kremer, E. Angevin, V. Scott, F. Triebel, A hsp70-2 mutation recognized by CTL on a human renal cell carcinoma, *J. Immunol.* 162 (1999) 1730–1738.
- [31] P.A. Wentworth, A. Vitiello, J. Sidney, E. Keogh, R.W. Chesnut, H. Grey, A. Sette, Differences and similarities in the A2.1-restricted cytotoxic T cell repertoire in humans and human leukocyte antigen-transgenic mice, *Eur. J. Immunol.* 26 (1996) 97–101.
- [32] C.S. Rosenberg, D.L. Martin, R.L. Tarleton, CD8+ T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of *Trypanosoma cruzi* infection but are not required for resistance, *J. Immunol.* 185 (2010) 560–568.
- [33] U. Gowthaman, S.B. Chodiseti, P. Parihar, J.N. Agrewala, Evaluation of different generic in silico methods for predicting HLA class I binding peptide vaccine candidates using a reverse approach, *Amino Acids* 39 (2010) 1333–1342.
- [34] M. Morell, M.C. Thomas, T. Caballero, C. Alonso, M.C. Lopez, The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection, *Vaccine* 24 (2006) 7046–7055.
- [35] J.A. Guevara-Patino, M.E. Engelhorn, M.J. Turk, C. Liu, F. Duan, G. Rizzuto, A.D. Cohen, T. Merghoub, J.D. Wolchok, A.N. Houghton, Optimization of a self antigen for presentation of multiple epitopes in cancer immunity, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 1382–1390.
- [36] M.F. Kotturi, J. Botten, J. Sidney, H.H. Bui, L. Giancola, M. Maybeno, J. Babin, C. Oseroff, V. Pasquetto, J.A. Greenbaum, B. Peters, J. Ting, D. Do, L. Vang, J. Alexander, H. Grey, M.J. Buchmeier, A. Sette, A multivalent and cross-protective vaccine strategy against arenaviruses associated with human disease, *PLoS Pathog.* 5 (2009) e1000695.
- [37] Y.J. Guo, K.Y. Wang, S.H. Sun, Identification of an HLA-A*0201-restricted CD8(+) T-cell epitope encoded within Leptospiral immunoglobulin-like protein A, *Microbes Infect.* 12 (2010) 364–373.
- [38] N. Garg, M.P. Nunes, R.L. Tarleton, Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway, *J. Immunol.* 158 (1997) 3293–3302.
- [39] P.A. Lund, Microbial molecular chaperones, *Adv. Microb. Physiol.* 44 (2001) 93–140.
- [40] S.K. Calderwood, S.S. Mambula, P.J. Gray Jr., J.R. Theriault, Extracellular heat shock proteins in cell signaling, *FEBS Lett.* 581 (2007) 3689–3694.
- [41] P. Cuervo, J.B. De Jesus, L. Saboia-Vahia, L. Mendonca-Lima, G.B. Domont, E. Cupolillo, Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* promastigotes, *J. Proteomics* 73 (2009) 79–92.
- [42] M. Giambiagi-deMarval, T. Souto-Padron, E. Rondinelli, Characterization and cellular distribution of heat-shock proteins HSP70 and HSP60 in *Trypanosoma cruzi*, *Exp. Parasitol.* 83 (1996) 335–345.
- [43] U. Muller, V. Sobek, S. Balkow, C. Holscher, A. Mullbacher, C. Museteanu, H. Mossmann, M.M. Simon, Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 70–78.
- [44] S.A. Laucella, M. Postan, D. Martin, B. Hubby Fralish, M.C. Albareda, M.G. Alvarez, B. Lococo, G. Barbieri, R.J. Viotti, R.L. Tarleton, Frequency of interferon-gamma-producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease, *J. Infect. Dis.* 189 (2004) 909–918.
- [45] M.G. Alvarez, M. Postan, D.B. Weatherly, M.C. Albareda, J. Sidney, A. Sette, C. Olivera, A.H. Armenti, R.L. Tarleton, S.A. Laucella, HLA class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8 T cells in chronic Chagas disease, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2 (2008) e288.
- [46] P. Krausa, M. Brywka 3rd, D. Savage, K.M. Hui, M. Bunce, J.L. Ngai, D. L. Teo, Y.W. Ong, D. Barouch, C.E. Allsop, A.V.S. Hill, A.J. McMichael, J.G. Bodmer, M.J. Browning, Genetic polymorphism within HLA-A*02: significant allelic variation revealed in different populations, *Tissue Antigens* 45 (1995) 223–231.
- [47] J. Choppin, W. Cohen, A. Bianco, J.P. Briand, F. Connan, M. Dalod, J.G. Guillet, Characteristics of HIV-1 Nef regions containing multiple CD8+ T cell epitopes: wealth of HLA-binding motifs and sensitivity to proteasome degradation, *J. Immunol.* 166 (2001) 6164–6169.
- [48] P. Lasso, D. Mesa, A. Cuellar, F. Guzman, N. Bolanos, F. Rosas, V. Velasco, C. Thomas Mdel, M.C. Lopez, J.M. Gonzalez, C.J. Puerta, Frequency of specific CD8+ T cells for a promiscuous epitope derived from *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein in chagasic patients, *Parasite Immunol.* 32 (2010) 494–502.

4.1.2.- Trypanosoma cruzi paraflagellar rod proteins 2 and 3 contain immunodominant CD8⁺ T-cell epitopes that are recognized by cytotoxic T cells from Chagas disease patients.

Egui, A; Thomas, MC; Morell, M; Marañón, C; Carrilero, B; Segovia, M; Puerta, C; Pinazo, MJ; Rosas, F; Gascón, J; López, MC.

Molecular Immunology, 2012; 52(3-4):289-98.

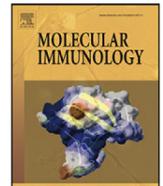
Impact Factor: 2.645 (81/137 Q3).

PMID: 22750229.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm

Trypanosoma cruzi paraflagellar rod proteins 2 and 3 contain immunodominant CD8⁺ T-cell epitopes that are recognized by cytotoxic T cells from Chagas disease patients

Adriana Egui^{a,1}, M. Carmen Thomas^{a,1}, María Morell^a, Concepción Marañón^a, Bartolomé Carrilero^b, Manuel Segovia^b, Concepción J. Puerta^c, María Jesús Pinazo^d, Fernando Rosas^e, Joaquim Gascón^d, Manuel Carlos López^{a,*}

^a Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPBLN-CSIC), Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento S/N, 18100-Granada, Spain

^b Unidad Regional de Medicina Tropical, Hospital Virgen de la Arrixaca, Cra. Cartagena s/n, El Palmar, 30120-Murcia, Spain

^c Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 No. 43-82, Edificio 50, Laboratorio 113, Bogotá, Colombia

^d Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic of Barcelona, Rosselló, 132, 4^a. 08036-Barcelona, Spain

^e Fundación Clínica Abood Shaio, Dg115 Avenida 70-C-75, Bogotá, Colombia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2012

Received in revised form 24 May 2012

Accepted 31 May 2012

Available online 29 June 2012

Keywords:

Trypanosoma cruzi

Chagas disease

CD8⁺ T epitope

Paraflagellar rod proteins (PFRs)

Cytotoxic T lymphocytes

ABSTRACT

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease. To date, no vaccine is available for protection against *T. cruzi* infection. The CD8⁺ T cells immune response against specific antigens has shown to efficiently control the spread of the parasite in murine experimental infection. However, data concerning CD8⁺ response in Chagas patients are still restricted to a few epitopes. We have studied the existence of immunodominant CD8⁺ T cell epitopes in the paraflagellar rod proteins 2 and 3 (PFR2 and PFR3) from *T. cruzi* in a mouse model, and analyzed their recognition by cytotoxic T lymphocytes from Chagas disease patients. Immunization of C57BL/6-A2/K^b transgenic mice with plasmids coding for the fusion proteins PFR2-HSP70 and PFR3-HSP70 induced a specific CTL response against two PFRs epitopes (PFR2_{449–457} and PFR3_{481–489}), and showed specific lysis percentages of 24 and 12, respectively. Moreover, the PFR2_{19–28}, PFR2_{156–163}, PFR2_{449–457}, PFR3_{428–436}, PFR3_{475–482} and PFR3_{481–489} peptides were observed to have a high binding affinity to the HLA-A*02:01 molecule. Remarkably, these HLA-A*02:01-binding peptides are successfully processed and presented during natural infection by *T. cruzi* in the context of MHC class I as evidenced by using peptide-pulsed K562-A2 cells as antigen presenting cells. The T cells from Chagas disease chronic patients specific for PFR2/PFR3 selected CD8⁺ epitopes showed a pro-inflammatory cytokine secretion profile (IFN- γ , TNF- α and IL-6). A positive Granzyme B secretion was observed in three out of 16 patients in response to PFR2_{156–163} and PFR2_{449–457} peptides, two out of 11 patients in response to PFR2_{19–28} peptide and one out of 14 and 11 patients in response to PFR3_{428–436} and PFR3_{481–489} peptides, respectively. The PFRs-specific cytotoxic activity in purified PBMC was only detected in patients in the indeterminate phase of the disease.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: PFR, paraflagellar rod protein; HSP, heat shock protein; KMP, kinetoplastid membrane protein; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; TAP, transporters associated with antigen-processing; APC, antigen-presenting cell; SFC, spot forming cell; CTL, cytotoxic T lymphocytes; K562, human immortalised myelogenous leukemia line; MHC, major histocompatibility complex; HLA, human leukocyte antigen; IFI, immunofluorescence indirect; DMSO, dimethyl sulfoxide; FSCi, inactivated fetal calf serum; SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrilamide gel electrophoresis; PHA, phytohaemagglutinin; HEPES, N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'[2-ethane-sulfonic acid]; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SPPS, standard t-Boc solid-phase-peptide synthesis; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; IFA, incomplete Freud adjuvant; BSA, bovine serum albumin; PBS, phosphate-buffered saline; DMEN, Dulbecco's modified eagle medium; GzB, granzyme B.

* Corresponding author. Tel.: +34 958 181661; fax: +34 958 181632.

E-mail address: mclopez@ipb.csic.es (M.C. López).

¹ The authors equally contributed to this work.

1. Introduction

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease which affects almost 10 million people in Latin America with 75–90 million exposed to this infection (Coura and Dias, 2009). The disease courses with different clinical stages. The acute phase appears shortly after infection and in most cases presents unspecific symptoms that makes its diagnosis to be extremely difficult. In the absence of treatment, the acute phase is followed by a chronic indeterminate stage in which the parasites persist into specific tissues (Prata, 2001). In about one third of these patients the infection leads to a symptomatic chronic phase, characterized by cardiac and/or digestive implications, and less often alterations in the central nervous system (Matsuda et al., 2009; Tanowitz et al., 2009; Rassi and Rassi, 2010). Clinical manifestations are associated to morbidity and cardiac involvement is the main cause of death in the chronic stage of the disease (Prata, 2001; Dutra et al., 2005; Punukollu et al., 2007). To date, a protective vaccine against this infection is inexistent and the efficacy of the current and rather toxic anti-parasitic chemotherapy is under consideration in patients in the chronic phase of the disease (Marin-Neto et al., 2009). Given the importance of the disease, finding accurate and safe methods to control the infection is extremely urgent.

Previous studies have shown that the immune control of *T. cruzi* requires the activation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Cazorla et al., 2009). It is clear that natural immune response is not strong enough to reach sterility and consequently, the parasites persist into the patient's tissues. Several parasite class I-restricted antigens have been characterized in murine experimental models where it has been reported that the CD8⁺ T cell immune response against *T. cruzi* specific antigens is sufficient to control the spread of the parasite (Miyahira, 2008). However, data concerning CD8⁺ response in Chagas patients are still restricted to a few epitopes (Diez et al., 2006; Wizel et al., 1997; Fonseca et al., 2004; Maranon et al., 2011).

Two of the antigens reported as vaccine candidates are the paraflagellar rod proteins (PFRs) which are located at the *T. cruzi* flagellum and specific to the kinetoplastids (Wrightsmann et al., 2002; Morell et al., 2006; Vazquez-Chagoyan et al., 2011). Four different paraflagellar rod proteins (named PFR1–4) have been described in *T. cruzi* (Fouts et al., 1998; Maga et al., 1999). Mice immunization with a mixture of these PFRs as recombinant proteins has been shown to induce an immune response capable of reducing the level of circulating parasites, and to provide survival rates of 83–100% against a lethal *T. cruzi* challenge (Wrightsmann et al., 2002). Furthermore, it was reported that immunization with the PFR2-HSP70 fused genes as DNA vaccine provides a protective response against a *T. cruzi* experimental infection by inducing an increase in the expression of IL-2 and IFN- γ in spleen cells, and generating antigen-specific CD8⁺ T cells (Morell et al., 2006). In the present paper we describe the identification of two immunodominant cytotoxic T cell epitopes restricted to the HLA-A*02:01 molecule in the PFR2 and PFR3 proteins (PFR2_{449–457} and PFR3_{481–489}), respectively, in an experimental infection model. We also describe the identification of three epitopes contained in PFR2 (PFR2_{19–28}, PFR2_{156–163} and PFR2_{449–457}) and three in PFR3 (PFR3_{428–436}, PFR3_{475–482} and PFR3_{481–489}) which are successfully processed and presented during natural human infection with *T. cruzi* in the context of class I MHC.

2. Materials and methods

2.1. Mice, immunization and organ extraction

Six to eight weeks old C57BL/6-A2K^b female mice (Vitiello et al., 1991) were bred in the animal facilities of the Institute of

Parasitology and Biomedicine López-Neyra CSIC. The said transgenic mice express the product of the HLA-A*02:01 chimeric gene (α 1 and α 2 domains of human HLA-A*02:01 molecule and α 3 domain of murine H-2Kb) (Vitiello et al., 1991). Groups of four mice were intramuscularly immunized with 100 μ g of DNA of each one of the two constructs (PFR2-HSP70 and PFR3-HSP70) (Morell et al., 2006) four times at 3-week intervals. As control two groups of mice were employed, one immunized with the empty pCMV4 vector and another with sterile saline solution (0.9% sodium chloride solution; Sigma). Six weeks after the last inoculation, mice were sacrificed by CO₂ anoxia. Spleens from four mice per group were removed and homogenized in sterile conditions. The extracts were washed twice in PBS + 10% iFCS (inactivated Fetal Calf Serum; Life Technologies) and incubated for 3 min with erythrocyte ACK lysis buffer (150 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA, pH 7.4). Cells were then washed again with Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco BRL), re-suspended and cultured in DMEM complete medium (DMEM supplemented with 10% iFCS, 2 mM L-glutamine; Gibco RBL), 50 μ M 2-mercaptoethanol (Sigma), 100 μ g/mL streptomycin (Sigma), 25 mM HEPES and 1 mM sodium pyruvate.

2.2. Study population

For the HLA-A*02:01 restriction assay, eight adult patients were tested from Fundación Clínica Abood Shaia (Bogotá-Colombia). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were purified as described in Maranon et al., 2011, stored in iFCS with 10% DMSO and cryopreserved in liquid nitrogen until use. HLA-A genotyping was carried out using the RELI™ SSO HLA-A Typing kit (Invitrogen). For cytotoxicity and functional activity determinations, 30 mL of blood samples from 18 adults HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients and nine healthy donors were collected in EDTA at Hospital Virgen de la Arrixaca in Murcia and Hospital Clinic of Barcelona (both in Spain). The clinical status of each patient was diagnosed as indeterminate (IND, $n=8$) or cardiac (CARD, $n=10$) based on Kuschnir classification of Chagas disease (Kuschnir et al., 1985). All selected individuals had never received treatment for the disease.

2.3. Cell lines

For HLA-A*02:01 binding assays the TAP-deficient T2 cell line (HLA-A*02:01⁺) was employed and grown in DMEM complete medium. Murine EL-4 and human Jurkat (HLA-A*02:01) lines stably transfected with the A2/K^b transgene were used and maintained in DMEM complete medium (with FCS, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin) supplemented with 0.6 mg/mL of G418 (Sigma). Transient transfection of EL-4 cells was carried out by electroporation for their use as target cells in chromium release assays.

2.4. Antibody generation

Two anti-PFRs polyclonal antibodies generated in rabbits were obtained by inoculating the PFR2 and PFR3 purified recombinant proteins, respectively, emulsified in incomplete Freund adjuvant (IFA) in two doses (200 μ g each) at 2-week intervals. Sera from both immunized rabbits were analyzed by ELISA and western blot assays showing that both antibodies were able to specifically recognize, respectively, the aforementioned PFR2 and PFR3 recombinant proteins (data not shown).

2.5. Protein purification and western blot

To obtain soluble protein extracts from trypomastigote and amastigote forms, monolayers of monkey LLC-MK2 fibroblasts were infected with *T. cruzi* trypomastigote forms (Y strain) obtained

from *T. cruzi* experimentally infected mice (parasite:cell ratio of 5:1). After 96 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, trypomastigotes and amastigotes were recovered from infected-culture supernatants by centrifugation and subsequently washed with PBS. Epimastigotes grown in LIT medium supplemented with 10% FBS were collected at logarithmic growth phase (2×10^7 parasites/mL). Parasites were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris–HCl at pH 7.4, 0.05% NP-40, 50 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 µg/mL leupeptin) and sonicated three times with pulses of 50–62 KHz for 40 s at time intervals of 20 s. Soluble protein extracts were obtained by centrifugation at 10,000 rpm for 20 min at 4 °C. Protein concentration was measured by the micro BCATM protein assay kit (Thermo Scientific).

20 µg of total soluble proteins extracts were resolved by 12% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane (Millipore) using the Miniprotean system (Bio-Rad). Western blot was performed as described previously (Thomas et al., 2001) incubating the membranes separately with each of the anti PFR-2 and PRF3 polyclonal antibodies (at dilution 1/16,000 and 1/8000, respectively). Anti-rabbit IgG HRP-conjugated (at dilution 1/20,000) (Sigma) was employed as secondary antibody. A polyclonal rabbit anti-KMP11 was used as a positive control at dilution 1:3000 (Thomas et al., 2000). As substrate SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce) was added according to manufacturer protocols. The purified PFR2 and PFR3 recombinant proteins employed to produce the antibodies as well as the TcHSP70 and TcKMP11 recombinant proteins (Maranon et al., 2000; Thomas et al., 2000) were also tested as positive (PFR2 and PFR3), negative (TcHSP70) and total protein loading concentration (TcKMP11) controls.

2.6. Indirect immunofluorescence assays

20×10^6 parasites (trypomastigotes, epimastigotes and amastigotes) were fixed with 4% formaldehyde, washed and permeabilized in PBS/0, 5% Triton X100 for 1 min. Cells were blocked (PBS-5%BSA) for 1 h, and incubated with primary antibody (1:7000 for PFR2 and 1:5000 for PFR3) for 1 h at RT. Cells were washed three times with PBS and incubated with Alexa Fluor[®] 594 goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen) at 1:20,000 dilution for 1 h at RT. Cells were rinsed twice with PBS and mounted on slides with DAPI containing Vectashield media. The immunofluorescence was visualized with the appropriate fluorescent filters on a Leica confocal microscope.

2.7. Synthetic peptides and theoretical prediction of HLA-A*02:01 epitopes

Peptides bearing the described HLA-A*02:01 binding motifs were synthesized by simultaneous multiple-peptide solid-phase methods. The peptides were assembled using the standard t-Boc solid-phase-peptide synthesis (SPPS) strategy on a P-methylbenzhydrylamide (MBHA) resin. Purity was checked by high performance liquid chromatography (HPLC), and correct composition verified by mass spectrometry (Houghten, 1985). Peptides were dissolved to 5 mg/mL in 50% DMSO-PBS and stored at –20 °C. The sequences of the used peptides are listed in Tables 1 and 2. The prediction of potential HLA-A*02:01 ligands contained in *T. cruzi* PFR2 and PFR3 proteins were carried out through the screening of the deduced amino acid sequence of PFR2 and PFR3 gene, using two HLA-A*02:01 binding prediction algorithms, SYFPEITHI for affinity (<http://www.syfpeithi.de/home.htm>) and BIMAS for stability of the complex (www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/).

2.8. HLA-A*02:01 binding affinity assay

TAP-deficient T2 cells were used to evaluate the stability and binding affinity to HLA-A*02:01. These cells were loaded with

different quantities of peptide in serum-free DMEM medium containing 1 µg/mL of human β-2 microglobulin (Sigma) and incubated overnight at RT. Afterwards, the cells were stained in duplicate with the conformational dependent α1/α2-specific W6/32 monoclonal antibody (Sigma), plus a FITC-conjugated antimouse IgG2a (Pharmigen) secondary antibody, and analyzed by flow cytometry scan (FACS). The HB-ENV_{334–342} peptide (WLSLLVPPFV) and the influenza virus matrix_{58–66} peptide (FLU-MA) (GILGFVFTL) were included in the assay as internal standards. Affinity data were calculated as percentage of maximum complex stabilization, as described in Pogue et al., 1995, with the following equation: % of maximal stabilization = $100 \times [(\text{mean fluorescence with peptide}) - (\text{background mean fluorescence})] / [(\text{mean fluorescence with } 100 \mu\text{M HB-ENV peptide}) - (\text{background mean fluorescence})]$; background value was obtained with cells incubated in the same conditions without antigen (Maranon et al., 2001). For stability estimation, T2 cells were incubated with 25 µM of peptides and 1 µg/mL β-2 microglobulin overnight at 37 °C. The level of surface HLA-A*02:01/peptide complexes stained with W6/32 was obtained at the 2, 4 and 6 h of the assay. The results were reported as relative complex stability using the equation: complex stability = $100 \times [(\text{mean fluorescence with peptide} - \text{background mean fluorescence}) / (\text{mean fluorescence with FLU-MA peptide at } t_0 - \text{background fluorescence})]$.

2.9. CTL activity assays in spleens from PFR2-HSP70 and PFR3-HSP70 immunized mice

Spleens from four mice per group were removed 6 weeks post-last immunization, homogenized, pooled and grown in DMEM complete medium supplemented with 10% iFBS in a humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C. Murine EL-4/A2-K^b cells pulsed with 5 µM of each one of the candidate peptides were treated with 50 µg/mL mitomycin C (Sigma) for 1 h at 37 °C and used to weekly stimulate splenocytes. Spleen cell bulk cultures were replenished every three days with fresh complete medium supplemented with 10 U/ml rmlL2 (Roche). Six days post third stimulation CTL activity was monitored by a 4 h ⁵¹Cr release assay as described previously (Maranon et al., 2001) with EL-4/A2-K^b cells pulsed with the synthetic peptides at 20:1 effector:target ratio. The radioactivity liberated by cell lysis was measured in supernatants using a 1450 Microbeta liquid scintillation counter (Wallac). Samples were assayed in duplicate and the standard deviation in all cases was lower than 5%. Specific lysis was calculated as follows: % specific lysis = $100 \times [(\text{experimental release (cpm)} - \text{spontaneous release (cpm)}) / (\text{total release (cpm)} - \text{spontaneous release (cpm)})]$. Spontaneous release represents the number of counts obtained when the target cells were incubated in culture medium absent of effector cells. Maximum total ⁵¹Cr release was measured following addition of 1 M HCl to the target cells. Responses were considered significant if (i) a minimum of 10% of specific lysis was measured; (ii) this value was at least twofold that obtained with the negative control without peptide and (iii) standard deviation was less than 10% of the measured value.

2.10. Granzyme B secretion in peripheral blood mononuclear cells from Chagas disease patients

The frequency of Granzyme B (GzB) producing cells was evaluated in cryopreserved PBMC from Chagas disease patients by ELISPOT assays. This protocol was carried out as described in Maranon et al., 2011. Briefly, 96-well PVDF membrane-bottom plates (Millipore) were pre-wetted with 35% ethanol and washed three times with PBS. Subsequently, plates were coated with 100 µL of anti-GzB monoclonal antibody (Mabtech) at 5 µg/mL and incubated overnight at 4 °C. Plates were washed with PBS and incubated

Table 1
Sequences of the PFR2-derived HLA-A*02:01 binding peptides.

| Peptide | Position | Sequence | SYFPEITHI Score | BIMAS Score | Fluoresce index (FI-%) ^a |
|---------------|-------------------------------|-------------------|-----------------|-------------|-------------------------------------|
| 12,790 | PFR2_{19–28} | AVPEVTDVTL | 22 | 8 | 65 |
| 12,791 | PFR2 _{90–99} | LTEAYDIKKL | 20 | 0 | 24 |
| 12,792 | PFR2 _{99–107} | LMRVCGLQL | 21 | 2 | 33 |
| 12,793 | PFR2 _{123–131} | EVVALKKTL | 13 | 0 | 2 |
| 12,794 | PFR2 _{126–134} | ALKKTLNEL | 28 | 2 | 35 |
| 12,795 | PFR2 _{148–157} | GTIDNAIAKL | 26 | 3 | 24 |
| 12,796 | PFR2_{156–163} | KLEKIEDEL | 22 | 2 | 52 |
| 12,797 | PFR2 _{176–185} | QVPVAVLKNL | 17 | 4 | 7 |
| 12,798 | PFR2 _{184–193} | NLEECMNVTV | 25 | 18 | 2 |
| 12,799 | PFR2 _{190–199} | NVTVVQTALL | 10 | 2 | 7 |
| 12,800 | PFR2 _{236–245} | YIKAQLLEHL | 23 | 1 | 17 |
| 12,801 | PFR2 _{300–308} | NLHDIAIQA | 21 | 47 | 22 |
| 12,802 | PFR2 _{346–355} | ELERVQLRL | 20 | 0 | 1 |
| 12,803 | PFR2 _{376–385} | KVEYQQFLDV | 14 | 3 | 28 |
| 12,804 | PFR2 _{413–421} | LVAEGCSAI | 21 | 6 | 20 |
| 12,805 | PFR2 _{427–435} | KTNEELGDL | 22 | 1 | 7 |
| 12,806 | PFR2 _{436–444} | RLQVHQEYL | 20 | 58 | 35 |
| 12,807 | PFR2_{449–457} | RLYKTLGQL | 25 | 20 | 43 |
| 12,808 | PFR2 _{456–465} | QLVYKKEKRL | 18 | 21 | 13 |
| 12,809 | PFR2 _{464–472} | RLEEIDRNI | 19 | 1 | 17 |
| 12,810 | PFR2 _{499–507} | ELYKLRAQV | 21 | 17 | 33 |
| 12,811 | PFR2 _{506–514} | QVEEELML | 19 | 1 | 26 |
| 12,812 | PFR2 _{513–522} | MLKDKMAQAL | 21 | 5 | 11 |
| 12,813 | PFR2 _{556–565} | KMVEYRAHL | 24 | 221 | 22 |
| 12,814 | PFR2 _{563–572} | HLAKQEEVKJ | 16 | 0 | 30 |
| 12,815 | PFR2 _{38–46} | NLKLKTSCL | 22 | 1 | 35 |

The table shows the theoretical binding score to HLA-A*02:01 calculated by computer algorithms (SYFPEITHI). The half time of disassociation in minutes (BIMAS) and relative fluorescence index were calculated with respect to the control peptide HB- ENV_{335–343}.

^a Peptides with highest relative fluorescence index are in bold.

Table 2
Sequences of the PFR3-derived HLA-A*02:01 binding peptides.

| Peptide | Position | Sequence | SYFPEITHI Score | BIMAS Score | Fluorescence index (FI-%) ^a |
|---------------|-------------------------------|-------------------|-----------------|-------------|--|
| 18,396 | PFR3 _{28–37} | ALAALYELV | 25 | 51 | 11 |
| 18,397 | PFR3 _{30–40} | ALYELVENAI | 25 | 137 | 30 |
| 18,398 | PFR3 _{38–46} | AIATAENYV | 23 | 53 | 45 |
| 18,399 | PFR3 _{46–55} | VYAYTEGLRV | 12 | 0 | 56 |
| 18,400 | PFR3 _{143–152} | ALKPHQPPDL | 24 | 1 | 8 |
| 18,401 | PFR3 _{155–163} | ALARDLSDV | 28 | 160 | 30 |
| 18,402 | PFR3 _{159–167} | DLSDVCGAL | 21 | 1 | 38 |
| 18,403 | PFR3 _{174–184} | DLMAELRAEL | 24 | 6 | 49 |
| 18,404 | PFR3 _{178–186} | ELRAELSEL | 23 | 0 | 11 |
| 18,405 | PFR3 _{186–193} | ELDGERDKV | 21 | 1 | 34 |
| 18,406 | PFR3 _{265–273} | SISRFAEAL | 22 | 5 | 68 |
| 18,407 | PFR3 _{283–290} | DLHNCCKKR | 10 | 0 | 49 |
| 18,408 | PFR3 _{316–324} | QIVEQKKKL | 21 | 12 | 19 |
| 18,409 | PFR3 _{317–334} | ELRQKAREL | 20 | 0 | 15 |
| 18,410 | PFR3 _{337–345} | DITLQKEMV | 16 | 0 | 11 |
| 18,411 | PFR3 _{399–407} | MVTRIPQQLN | 13 | 3 | 49 |
| 18,412 | PFR3 _{402–408} | RIPQQNLRQV | 22 | 4 | 30 |
| 18,413 | PFR3 _{410–416} | QVLDQLNDI | 20 | 32 | 11 |
| 18,414 | PFR3 _{413–420} | QLNDIEAEV | 26 | 285 | 41 |
| 18,415 | PFR3_{428–436} | FVSCCGELTV | 18 | 28 | 75 |
| 18,416 | PFR3 _{433–437} | ELTVKKMHR | 7 | 0 | 45 |
| 18,417 | PFR3 _{466–473} | NMSNYRLEL | 22 | 15 | 30 |
| 18,418 | PFR3_{475–482} | DIIEQMKGV | 21 | 7 | 86 |
| 18,419 | PFR3 _{479–486} | QMKFVSGVI | 14 | 0 | 53 |
| 18,420 | PFR3_{481–489} | GVSGVINAL | 23 | 4 | 90 |
| 18,421 | PFR3 _{498–506} | QLFQSVKEGV | 21 | 257 | 34 |
| 18,422 | PFR3 _{520–529} | PLQEYGIKSV | 24 | 14 | 30 |
| 18,423 | PFR3 _{535–543} | FVDRSMHYV | 16 | 142 | 49 |
| 18,424 | PFR3 _{542–550} | YVENEERKV | 17 | 0 | 15 |
| 18,425 | PFR3 _{548–556} | KVLEKRNVL | 21 | 41 | 41 |

The table shows the theoretical binding score to HLA-A*02:01 calculated by computer algorithms (SYFPEITHI), the half time of disassociation (BIMAS) and relative fluorescence index were calculated with respect to the control peptide HB- ENV_{335–343}.

^a Peptides with highest relative fluorescence index are in bold.

with 200 μL /well of blocking solution (RPMI-1640-10%FCS) at 37 °C for 30 min. Afterwards, 5×10^4 PBMC/well were added and incubated with 1 μM of each peptide for 30 h at 37 °C with 5% CO_2 in triplicates. As a control, the PBMC were stimulated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of phytohaemagglutinin (PHA). Supernatants were removed and aliquots frozen for subsequent quantification and determination of the cytokine secretion profile. After five washes, 100 μL /well of biotinylated GzB-specific antibody at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Mabtech) was added in 0.5% iFCS in PBS and plates incubated for 2 h at RT. Subsequently, wells were extensively washed with PBS and 100 μL /well of streptavidin-alkaline phosphatase at dilution of 1:6000 (Sigma) were added and incubated for 1 h at RT. After three washes with PBS, 50 μL /well of substrate solution (NBT-BCIP substrate, Sigma) were added, and plates dark incubated for 20–30 min at RT. The reaction was stopped by rinsing the plates with cold tap water and the spots were visualized in an AXIO PLAN 2 Imagine microscope and quantified using KS ELISPOT software. The results are expressed as the number of peptide-induced spots forming cell (SFC)/ 10^6 PBMC after subtracting the spot number of unstimulated cells (basal level).

2.11. Cytokine-secretion tests

Cytokine secretion (IL-4, IL-10, IL-6, IFN- γ , TNF- α) was determined in the supernatants of PBMC from Chagas disease patients, after *in vitro* stimulation with 1 μM of each peptide for 30 h at 37 °C in RPMI supplemented with 10% iFBS. Secretion profile was determined by using a bead-based multiplex immunoassay system (Bio-Plex, Bio-Rad), following the manufacturer's instructions. The response was considered positive if an increase in the secretion of cytokines was at least three times higher than the secretion by unstimulated cells (basal secretion level) and at least, 4 pg/mL for IL-4, 2 pg/mL for IL-10, 15 pg/mL for IL-6 and 5 pg/mL for IFN- γ and TNF- α). The positive control consisted of 50 ng/mL Phorbol 12 myristate 13-acetate (PMA) and 500 ng/mL ionomycin (Sigma). Cytokine levels were quantified in each sample using the Bio-Plex Manager software 4.1 (Bio-Rad).

In some experiments, peptide-pulsed K562-A2 cells were used as antigen-presenting cells (APC). Plates were seeded with 20,000 peptide-pulsed K562-A2 (Britten et al., 2002) or K562 cells as a negative control. APC were incubated with 60,000 effector cells per well and IFN- γ secretion test was performed as mentioned above.

3. Results

3.1. Expression and localization of PFR2 and PFR3 proteins in the three forms of the parasite's life cycle

Detection of the PFR2 and PFR3 protein expression in the epimastigote, tripomastigote and amastigote life stages of the parasite was carried out by western blot using soluble total protein extracts from the parasites and two rabbit polyclonal antibodies generated against the *T. cruzi* PFR2 and PFR3 recombinant proteins. The PFR2 and PFR3 purified recombinant proteins were included in these assays as a positive control. The recombinant proteins TcHSP70 and TcKMP11 (Thomas et al., 2000; Maranon et al., 2000) were also included as controls. As shown in Fig. 1, the PFR2 and PFR3 proteins are expressed in the three life stages of the parasite, with a lower level in the intracellular amastigote form. A similar parasite protein fraction was incubated with *T. cruzi* anti-KMP11 antibody to corroborate parasite protein load per lane and the quality of the extracted soluble proteins. *In vivo* detection and localization of PFR2 and PFR3 was assayed by IFI on permeabilized parasites. The results obtained (Fig. 2A and B) showed that both the PFR2 and PFR3

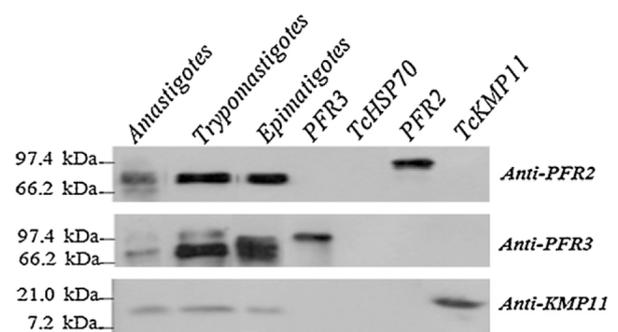


Fig. 1. Detection of PFR2, PFR3 and KMP11 protein expression levels in total protein soluble extracts of the three life stages of the *T. cruzi* parasite by western blot assays. 20 μg of total protein extracts were resolved in 12% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Each triplicate was incubated with a rabbit polyclonal antibody directed against the PFR2, PFR3 and TcKMP11 recombinant proteins. As controls, 5 μg of the recombinant PFR3 and PFR2 (positive controls), TcHSP70 (negative control) and TcKMP11 (protein concentration control) purified proteins were loaded in all the gels.

proteins were distributed along the flagellum in epimastigotes and trypomastigotes, and restricted to the flagellar pocket in the amastigote form.

3.2. Selection of HLA-A*02:01 binding peptides within *T. cruzi* PFR2 and PFR3 proteins

To identify peptides containing potential HLA-A*02:01-binding sites the deduced amino acid sequence of *T. cruzi* PFR2 and PFR3 were analyzed using two different computer algorithms, SYFPEITHI for binding affinity (www.syfpeithi.de/home.htm) and Bimas for stability of the complex (www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/). Twenty-six peptides in the PFR2 (Table 1) and 30 in the PFR3 (Table 2) were shown to have mid-to-high scores of affinity to HLA-A*02:01. The peptides were synthesized (Tables 1 and 2), and their binding capacity *in vitro* assayed using TAP-deficient T2 cells (Pogue et al., 1995) pulsed with 25 μM of the each peptide. Three peptides from each protein were selected for further analyses as they exhibited the highest affinity to HLA-A*02:01 as measured by fluorescence index (PFR2_{19–28}, PFR2_{156–163} and PFR2_{449–457} and PFR3_{428–436}, PFR3_{475–482}, PFR3_{481–489}, bolded in Tables 1 and 2). The maximal binding stabilization of the six PFR peptides was evaluated in a peptide concentration assay where four different amounts of each peptide were tested. The HB-ENV_{335–343} peptide was employed as an internal reference as it has previously shown high affinity to HLA-A*02:01 binder (Sette et al., 1994). The highest percentage of maximal stabilization was detected for five out of the six peptides at a peptide concentration ranging from 25 to 125 μM (Fig. 3A and B). For the PFR2_{19–28} peptide, the maximal stabilization was observed at 50 μM (Fig. 3A).

The HLA-binding stability of the selected peptides was also determined at different points of time (2, 4 and 6 h) with 25 μM of each peptide. For this assay, FLU-MA_{58–66} peptide was considered as the internal reference as its binding to the class I molecule has proved to be highly stable. As shown in Fig. 4, the three peptides from the PFR2 protein form complexes with the HLA-A*02:01 molecule lasting at least 2 h. However, only two of them (PFR2_{19–28} and PFR2_{449–457}) were shown to have a half-life superior to 6 h with values close to 80% of the binding detected for the FLU-MA control peptide at this point of time (Fig. 4A). The three selected peptides from the PFR3 protein showed similar behavior giving a high percentage of stabilization for 2 h which then decreased (Fig. 4B).

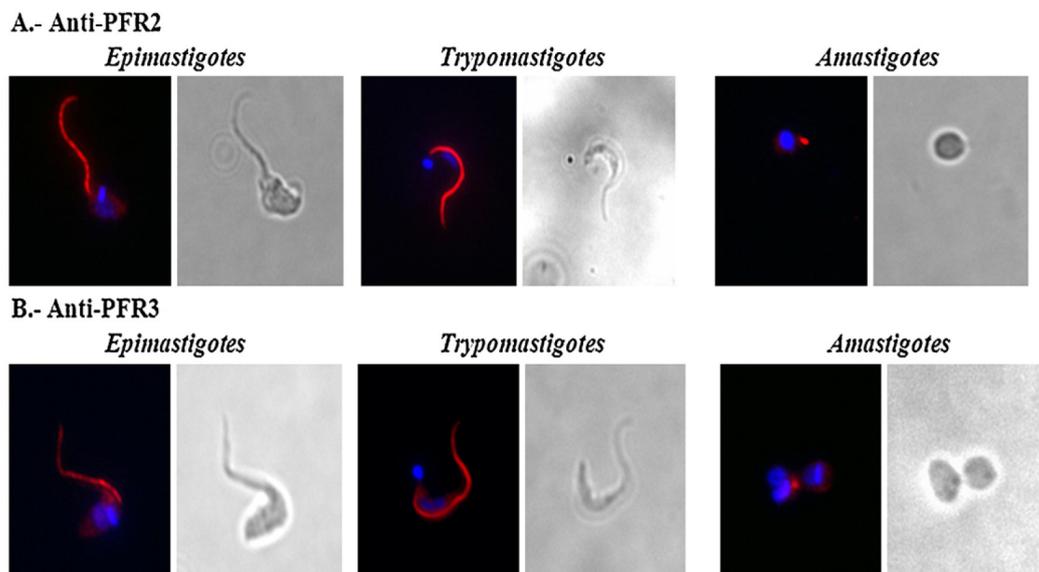


Fig. 2. Localization of the PFR2 and PFR3 proteins in the three forms of parasite life cycle by immunofluorescence. Slides containing permeabilized parasites were incubated with anti-PFR2 and anti-PFR3 polyclonal antibodies for 1 h at RT. Cells were then washed three times with PBS and incubated with Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen) at 1:20,000 dilution for 1 h at RT. The PFR2 and PFR3 proteins located along the flagellum in the epimastigotes and tripomastigotes, and in the flagellum pocket of the amastigote forms are detected in the red channel. Kinetoplasts and nuclei appear in the blue channel as they were DAPI stained.

3.3. Analysis of CTL response against PFR2- and PFR3-derived epitopes in immunized A2/K^b transgenic mice

In order to analyze the capability of the six selected HLA-A*02:01-binding PFRs peptides (three for PFR2 and three for PFR3) to elicit a specific CTL response, C57BL/6-A2/K^b transgenic mice were immunized with plasmids bearing the PFR2-HSP70 or PFR3-HSP70 fused genes. Six weeks after the last immunization,

the mice were sacrificed and the spleen cells purified and used as effector cells in *in vitro* cytotoxic assays after three rounds of stimulation. For this purpose, the EL4-A2/K^b cells pulsed with each one of the peptides (5 μM) were used after three rounds of stimulation as target cells in a classical chromium release assay. The EL4-A2/K^b cells without peptide were employed as a negative control. As shown in Table 3, the three peptides (PFR3_{428–436}, PFR3_{475–482} and PFR3_{481–489}) were recognized by spleen cells from PFR3-HSP70

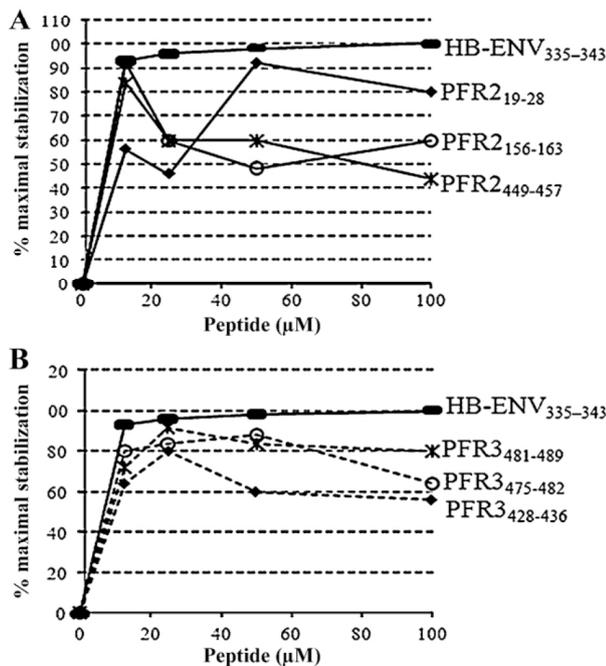


Fig. 3. Binding assay of PFR2-derived peptides (A) and PFR3-derived peptides (B) to TAP-deficient T2 cells of HLA-A*02:01-restricted PFR2 and PFR3-derived peptides. Percentage of maximal complex stabilization was calculated with the HB-ENV_{334–342} peptide fluorescence index as a reference. The binding of each peptide was determined at different concentrations.

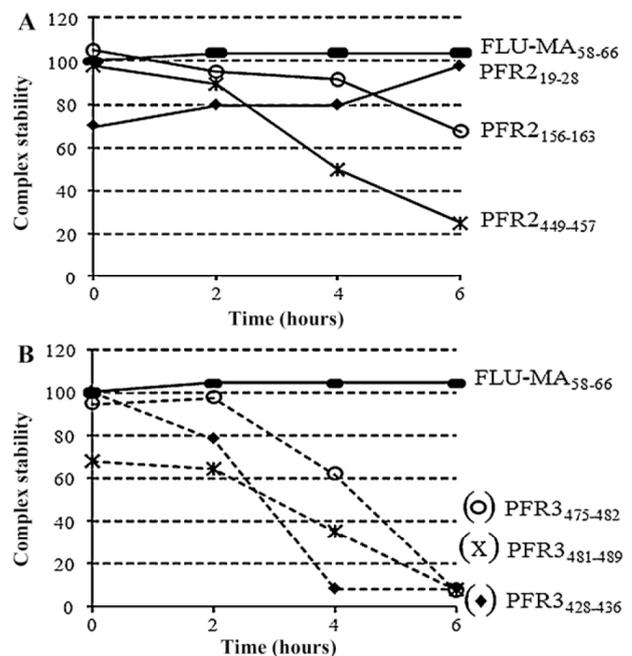


Fig. 4. Binding assay of PFR2-derived peptides (A) and PFR3-derived peptides (B) to TAP-deficient T2 cells of HLA-A*02:01-restricted PFR2 and PFR3-derived peptides. Stability complex was calculated with the FLU-MA_{58–66} peptide fluorescence index as a reference. The binding stability of each peptide was analyzed at different points of time using 5 μM of each peptide.

Table 3

Detection of CTL activity specific to *T. cruzi* PFR2 and PFR3-derived HLA-A*02:01-binding peptides in C57BL/6-A2/K^b mice.

| EL4-A2Kb cells pulsed with peptides | % Specific lysis (EL4-A2K ^b cells pulsed - EL4-A2K ^b unpulsed) ^a | |
|-------------------------------------|---|--------------------------------|
| | Immunized mice with PFR3-HSP70 | Immunized mice with PFR2-HSP70 |
| PFR2 _{19–28} | ND | 0 |
| PFR2 _{156–163} | ND | 0 |
| PFR2 _{449–457} | ND | 24 |
| PFR3 _{428–436} | 7 | ND |
| PFR3 _{475–482} | 7 | ND |
| PFR3 _{481–489} | 12 | ND |

ND: not determined.

^a CTL activity was measured by a chromium-release test against EL4-A2Kb cells and EL4-A2Kb cells pulsed with 5 μM of peptide. Data are representative of four mice per group.

immunized mice although the detected responses were in general moderate and good for PFR3_{481–489}. Remarkably, one of the selected HLA-A*02:01-binding PFR2 peptides (PFR2_{449–457}) showed a high percentage of specific lysis with values of 24% at a 20:1 ratio effector:target cells (Table 3), providing evidence of the existence of an immunodominant cytotoxic epitope in the *T. cruzi* PFR2 protein. None of the six peptides were recognized by the spleen cells from control mice inoculated with PBS or pCMV4 plasmid (data not shown).

3.4. Detection of PFR2 and PFR3 specific CD8⁺ T lymphocytes in HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients

To analyze whether cells from HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients recognized the same PFR2/PFR3 epitopes that were recognized by PFRs immunized C57BL/6 A2/K^b transgenic mice, we studied the presence of PFRs-specific CTLs among the PBMC from Chagas disease patients who were at different stages of the sickness. Restriction of these epitopes to the HLA-A*02:01 molecule was evaluated using peptide-pulsed K562-A2 cells as APCs in IFN-γ secretion tests. As shown in Table 4, PBMC from many Chagas disease patients recognized the PFR2_{19–28}, PFR2_{156–163}, PFR2_{449–457}, PFR3_{428–436}, PFR3_{475–482} and PFR3_{481–489} epitopes when they were presented at the surface of K562-A2 cells but not the K562 cells by themselves as these cells do not express Class I molecules. Thus, three out of eight patients responded to PFR2_{19–28}, one out of eight to PFR2_{156–163}, two out of eight to PFR2_{449–457}, two out of

Table 4

HLA-A*02:01 restriction of the recognition of PFR2 and PFR3 epitopes by Chagas disease patients.

| Peptide ^a | Chagas disease patient ^b | INF-γ secretion range (pg/mL) ^c |
|-------------------------|-------------------------------------|--|
| PFR2 _{19–28} | 3/8 | 2.17–6.28 |
| PFR2 _{156–163} | 1/8 | 5 |
| PFR2 _{449–457} | 2/8 | 2.6–9.9 |
| PFR3 _{428–436} | 2/7 | 5.6–6.2 |
| PFR3 _{475–482} | 2/7 | 6.2–7.9 |
| PFR3 _{481–489} | 3/7 | 3.75–4.9 |

K562-A2 cells were pulsed with 1 mM of the indicated peptide for 1 h, and cocultured with PBMC from HLA-A*02:01 Chagas disease patients. Following 30 h of growth, IFN-γ secretion was measured in the supernatants. IFN-γ secretion level in K562 cells, which do not express the class I molecule, was subtracted from the values obtained in the assays with the K562-A2 cells loaded with the peptides.

^a Selected peptides of the PFR2 and PFR3 proteins. Numbers indicate its position in the protein amino acid sequence.

^b Patients with positive response, relative to the total number of patients per assay.

^c Range of IFN-γ secretion by patients with a positive response to PFR peptides. Response was considered positive when the IFN-γ concentration detected in the supernatants of peptide-stimulated cells were at least two times than that of cells stimulated with an irrelevant peptide (HIV-Gag77.85).

seven to PFR3_{428–436} and PFR3_{475–482} peptides and three out of seven to PFR3_{481–489} peptide. These data provide evidence that the six assayed PFR2 and PFR3-derived epitopes are restricted to HLA-A*02:01. Furthermore, we can conclude that the six HLA-A*02:01-restricted epitopes derived from the *T. cruzi* PFR2 and PFR3 proteins were efficiently processed, presented and recognized by human CD8⁺ T lymphocytes during the natural course of Chagas disease.

The cytotoxic activity of the CD8⁺ T lymphocytes specific for the six selected peptides was evaluated by the secretion of GzB through ELISPOT assays. Thus, PBMC purified from blood samples of HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients, who come from an endemic area and currently reside in Spain ($n = 16$) and healthy donors HLA-A*02:01⁺ ($n = 9$) were tested after incubation of each peptide. As shown in Tables 5 and 6 a positive GzB response was detected in three out of 16 patients in response to PFR2_{156–163} and PFR2_{449–457} peptides, two out 11 patients in response to PFR2_{19–28} peptide and one out 14 and 11 patients in response to PFR3_{428–436} and PFR3_{481–489} peptides, respectively. Interestingly, GzB secretion and the consequent cytotoxic activity were only observed in PBMC from patients that were in the indeterminate phase of the disease. On the contrary, positive cytotoxic activity was detected in one out of nine tested healthy donors for the PFR2_{19–28} peptide.

Functional analysis of the CD8⁺ T cells specific for PFR2- and PFR3-derived epitopes was carried out in peptide-stimulated PBMC from chagasic patients by measuring the pro-inflammatory (IFN-γ, TNF-α and IL-6) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) cytokine secretion profile. The results obtained, presented in Tables 5 and 6, show that the six PFR2 and PFR3 derived peptides do not induce secretion of anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) in PBMC of patients and, interestingly, induce secretion of pro-inflammatory cytokines by the patients' PBMC. Thus, the PFR2_{156–163} and PFR2_{449–457} peptides, as well as the PFR3_{428–436} and PFR3_{481–489} peptides, induced secretion of IFN-γ, TNF-α and IL-6 in 38% (PFR2_{156–163} and PFR2_{449–457}), 43% (PFR3_{428–436}) and 50% (PFR3_{481–489}) of the assayed Chagas' patients, respectively. Moreover, a higher IFN-γ secretion level is observed in the chronic Chagas patients at the IND stage of the disease compared with that detected in patients with cardiac disease. A chronic patient (patient 411,057) with cardiopathy (grade 3 in the Kuschnir scale) (Kuschnir et al., 1985) was observed to have a significantly lower secretion level of IFN-γ and TNF-α when exposed to five out of the six tested PFR-peptides.

4. Discussion

The identification of epitopes that, in the context of MHC class I, are capable of inducing an immune response against a number of protozoan pathogens, including *T. cruzi*, is crucial in the design of vaccines able to induce sterilizing immunity (Padilla et al., 2009). PFR proteins from *T. cruzi* have been successfully used as vaccines against Chagas disease in murine models, showing protection against a lethal challenge of this parasite (Wrightsmann et al., 1995; Luhrs et al., 2003). C57BL/6-A2/K^b transgenic mice immunized with *T. cruzi* PFR2-HSP70 or PFR3-HSP70 fused genes have been described to elicit both a long-lasting IgG2a humoral response against PFR2 or PFR3 proteins and activation of HLA-A2-restricted CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes specific to the PFR antigens (Morell et al., 2006). Moreover, immunization with PFR2-HSP70 fused gene induces protection against a *T. cruzi* challenge (Morell et al., 2006).

Two independent bioinformatic algorithms for the prediction of HLA-A*02:01-binding peptides were used in order to select a battery of 26 and 30 candidate peptides contained in the PFR2 and PFR3 proteins, respectively. All these peptides were subsequently tested by an *in vitro* binding assay to TAP-deficient T2 cells. Three

Table 5
Cytokine-secretion and Granzyme B response to PFR2 epitopes by PBMC from HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients and healthy donors.

| Peptide | Clinical form ^a | Patient ^a | IL-4 | IL-10 | IL-6 | IFN- γ | TNF- α | GzB ^c |
|-------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|-------|------|----------------------------|---------------|------------------|
| | | | (pg/mL) ^b | | | (SCF/10 ⁶ PBMC) | | |
| PFR2 ₁₉₋₂₈ | HD | Gr-006 | 0 | 0 | 35 | -2 | 19 | 100 |
| | HD | Gr-008 | 0 | 0 | 50 | 0 | 0 | -60 |
| | HD | Nor-17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | HD | 499664 | 0 | 0 | 0 | -3 | 0 | 0 |
| | HD | Nor-1 | 0 | 0 | 1 | 3 | -8 | 0 |
| | HD | 411340 | 0 | 0 | 15 | 0 | 2 | 0 |
| | IND | 411535 | 0 | 0 | -4 | -1 | -2 | 113 |
| | IND | 499588 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| | IND | 411388 | 0 | 0 | 5 | 0 | -11 | 27 |
| | IND | 411365 | 0 | 0 | 13 | 4 | 15 | 7 |
| | IND | 411510 | 0 | 0 | 21 | 5 | 7 | 27 |
| | IND | 411119 | 0 | 0 | 3 | 1 | 1 | 107 |
| | IND | 411917 | 0 | 0 | 123 | 21 | 53 | 7 |
| | CCC I | 499998 | 0 | 0 | -7 | 0 | -2 | 0 |
| | CCC I | 411884 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CCC I | 499770 | 0 | 0 | 5 | 0 | -7 | -7 | |
| CCC III | 411057 | 0 | 0 | 7 | -263 | -15 | 0 | |
| PFR2 ₁₅₆₋₁₆₃ | HD | Gr-006 | 0 | 0 | -7 | -1 | 2 | 0 |
| | HD | Gr-008 | 2 | 0 | 31 | 0 | 1 | 40 |
| | HD | 499664 | 0 | 0 | 0 | -3 | 0 | 0 |
| | HD | 411340 | 0 | 0 | 41 | 4 | 7 | 13 |
| | HD | Gr-005 | 0 | 0 | -170 | -13 | -14 | 0 |
| | HD | Gr-004 | 0 | 0 | 77 | 16 | 7 | 0 |
| | HD | Gr-011 | 0 | 0 | -11 | 0 | -7 | -13 |
| | IND | 411535 | 0 | 0 | 7 | -1 | 0 | 73 |
| | IND | 499588 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | IND | 411388 | 0 | 0 | 15 | 2 | -8 | 20 |
| | IND | 411365 | 0 | 0 | 31 | 5 | 12 | 7 |
| | IND | 411510 | 0 | 0 | 6 | 3 | 8 | 40 |
| | IND | 411119 | 0 | 0 | 4 | 0 | 2 | 47 |
| | IND | 411562 | 0 | 0 | 62 | 21 | 10 | 347 |
| | IND | 411265 | 1 | 1 | 1558 | 166 | 149 | -20 |
| IND | 411283 | 0 | 0 | 102 | 27 | 42 | 240 | |
| CCC I | 499998 | 0 | 0 | -7 | 0 | -3 | 0 | |
| CCC I | 411884 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | |
| CCC I | 411456 | 0 | 0 | 22 | 3 | 7 | 40 | |
| CCC I | 411797 | 0 | 0 | 29 | 10 | 3 | 27 | |
| CCC I | 411799 | 0 | 0 | 35 | 9 | 8 | -13 | |
| CCC II | 411142 | 0 | 0 | -7 | 4 | -16 | 27 | |
| CCC III | 411057 | 0 | 0 | 0 | -266 | -22 | -40 | |
| PFR2 ₄₄₉₋₄₅₇ | HD | Gr-006 | 0 | 0 | -34 | -2 | -1 | -7 |
| | HD | Gr-008 | 1 | 0 | -29 | 0 | 1 | -30 |
| | HD | 499664 | 0 | 0 | 0 | -3 | 0 | 0 |
| | HD | 411340 | 0 | 0 | -4 | 5 | -5 | 0 |
| | HD | Gr-005 | 0 | 0 | -209 | -38 | -18 | -20 |
| | HD | Gr-004 | 1 | 0 | 275 | 47 | 22 | -7 |
| | HD | Gr-011 | 0 | 0 | -12 | 0 | -8 | -20 |
| | IND | 411535 | 0 | 0 | -3 | -1 | -1 | 80 |
| | IND | 499588 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | IND | 411388 | 0 | 0 | 18 | 7 | -8 | 0 |
| | IND | 411365 | 0 | 0 | 16 | 2 | 3 | 13 |
| | IND | 411510 | 0 | 0 | 14 | 3 | 13 | 7 |
| | IND | 411119 | 0 | 0 | 6 | 1 | 2 | 20 |
| | IND | 411562 | 0 | 0 | 20 | 6 | 6 | 437 |
| | IND | 411265 | 1 | 1 | 1474 | 158 | 181 | -13 |
| IND | 411283 | 0 | 0 | 89 | 20 | 43 | 80 | |
| CCC I | 499998 | 0 | 0 | -5 | 0 | -2 | 0 | |
| CCC I | 411884 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 13 | |
| CCC I | 411456 | 0 | 0 | 43 | 3 | 28 | 33 | |
| CCC I | 411797 | 0 | 0 | 12 | 5 | 3 | 0 | |
| CCC I | 411799 | 0 | 0 | 36 | 11 | 8 | -87 | |
| CCC II | 411142 | 0 | 0 | -2 | 6 | -12 | 47 | |
| CCC III | 411057 | 0 | 0 | -4 | -266 | -18 | -33 | |

A patient with a significant decrease in the IFN- γ and TNF- α secretion is indicated in green.

^aChagas disease patients in indeterminate stage (IND) or cardiac forms (CCC). HD: healthy donors.

^bPositive responses are in red (≥ 4 pg/mL for IL-4, 2 pg/mL for IL-10, 15 pg/mL for IL-6 and 5 pg/mL for IFN- γ and TNF- α and at least three times un-stimulated cells).

^cPositive responses are in red (≥ 50 SFC/10⁶ PBMC) and at least two fold the obtained value in non-peptide sample control.

Table 6
Cytokine-secretion and Granzyme B response to PFR3 epitopes by PBMC from HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients and healthy donors.

| Peptide | Clinical form ^a | Patient ^a | IL-4 | IL-10 | IL-6 | IFN- γ | TNF- α | GzB ^c |
|-------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|-------|------|----------------------------|---------------|------------------|
| | | | (pg/mL) ^b | | | (SCF/10 ⁶ PBMC) | | |
| PFR3 ₄₂₈₋₄₃₆ | HD | Gr-006 | 0 | 0 | 152 | 0 | 0 | -13 |
| | HD | Gr-008 | 0 | 0 | 64 | 0 | 0 | -53 |
| | HD | Nor-17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | HD | 499664 | 0 | 0 | 0 | -3 | 0 | 7 |
| | HD | Nor-1 | 0 | 0 | -2 | 3 | -8 | 0 |
| | HD | 411340 | 0 | 0 | 5 | 2 | -3 | 7 |
| | HD | Gr-005 | 1 | 0 | 171 | 75 | 20 | -27 |
| | HD | Gr-004 | 0 | 0 | -9 | 0 | 0 | -7 |
| | HD | Gr-011 | 0 | 0 | -11 | 0 | -8 | -13 |
| | IND | 411535 | 0 | 0 | -2 | 0 | -1 | -27 |
| | IND | 499588 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 |
| | IND | 411388 | 0 | 0 | 41 | 5 | 3 | 7 |
| | IND | 411365 | 0 | 0 | 28 | 0 | -5 | 7 |
| | IND | 411510 | 0 | 0 | 19 | 5 | 9 | -27 |
| | IND | 411917 | 0 | 0 | 46 | 7 | 2 | 40 |
| IND | 411265 | 1 | 0 | 669 | 190 | 66 | -120 | |
| IND | 411283 | 0 | 0 | 141 | 21 | 23 | 160 | |
| CCC I | 411884 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | |
| CCC I | 411456 | 0 | 0 | 36 | 7 | 10 | 7 | |
| CCC I | 411797 | 0 | 0 | 25 | 8 | 3 | 27 | |
| CCC I | 411799 | 0 | 0 | 308 | 50 | 56 | 20 | |
| CCC II | 411142 | 0 | 0 | 1 | 0 | -18 | 100 | |
| CCC III | 411057 | 0 | 0 | 10 | -266 | -19 | -13 | |
| PFR3 ₄₇₅₋₄₈₂ | HD | Gr-006 | 0 | 0 | 27 | 6 | 14 | 33 |
| | HD | Gr-008 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | -93 |
| | HD | Nor-17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | HD | 499664 | 0 | 0 | 0 | -3 | 0 | 0 |
| | HD | Nor-1 | 0 | 0 | 8 | 6 | -5 | 7 |
| | HD | 411340 | 0 | 0 | 5 | 0 | -4 | 0 |
| | IND | 411535 | 0 | 0 | -4 | -1 | -1 | -7 |
| | IND | 499588 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | IND | 411388 | 0 | 0 | 44 | 7 | 1 | 7 |
| | IND | 411365 | 0 | 0 | 30 | 3 | 28 | 7 |
| | IND | 411510 | 0 | 0 | 4 | 3 | 5 | 47 |
| | IND | 411917 | 0 | 0 | 15 | 3 | -2 | 20 |
| | CCC I | 411884 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 |
| | CCC I | 499770 | 0 | 0 | 15 | 0 | -7 | -7 |
| | CCC III | 411057 | 0 | 0 | 39 | -150 | -8 | -40 |
| PFR3 ₄₈₁₋₄₈₉ | HD | Gr-006 | 0 | 0 | 12 | 6 | 2 | 7 |
| | HD | Gr-008 | 0 | 0 | 64 | 0 | 0 | 0 |
| | HD | Nor-17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | HD | 499664 | 0 | 0 | 0 | -3 | 0 | 0 |
| | HD | Nor-1 | 0 | 0 | 10 | -1 | -5 | 0 |
| | HD | 411340 | 0 | 0 | -1 | 3 | -4 | 0 |
| | HD | Gr-005 | 0 | 0 | -63 | -6 | 3 | -27 |
| | HD | Gr-004 | 0 | 0 | -11 | 0 | 0 | -7 |
| | HD | Gr-011 | 0 | 0 | -10 | 0 | -7 | -13 |
| | IND | 499588 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | IND | 411388 | 0 | 0 | 28 | 7 | -4 | 13 |
| | IND | 411365 | 0 | 0 | 27 | 0 | 5 | 20 |
| | IND | 411265 | 2 | 1 | 1778 | 238 | 240 | -80 |
| | IND | 411283 | 0 | 0 | 94 | 17 | 28 | 153 |
| | CCC I | 411884 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| CCC I | 499770 | 0 | 0 | -1 | 0 | -3 | -7 | |
| CCC I | 411456 | 0 | 0 | 35 | 7 | 5 | 0 | |
| CCC I | 411797 | 0 | 0 | 40 | 15 | 7 | 13 | |
| CCC I | 411799 | 0 | 0 | 74 | 28 | 23 | -13 | |
| CCC II | 411142 | 0 | 0 | -2 | 2 | -23 | 33 | |
| CCC III | 411057 | 0 | 0 | -2 | -264 | -18 | -40 | |

A patient with a significant decrease in the IFN- γ and TNF- α secretion is indicated in green.

^aChagas disease patients in indeterminate stage (IND) or cardiac forms (CCC). HD: healthy donors.

^bPositive responses are in red (≥ 4 pg/mL for IL-4, 2 pg/mL for IL-10, 15 pg/mL for IL-6 and 5 pg/mL for IFN- γ and TNF- α and at least three times un-stimulated cells).

^cPositive responses are in red (≥ 50 SFC/10⁶ PBMC) and at least two fold the obtained value in non-peptide sample control.

peptides for PFR2 (PFR2_{19–28}, PFR2_{156–163}, PFR2_{449–457}) and three for PFR3 (PFR3_{428–436}, PFR3_{475–482}, PFR3_{481–489}) were selected for further analyses as they showed to have the highest binding indexes. In general terms, a poor correlation between the theoretical and experimental HLA-binding data was found. Similarly poor correlation coefficients have been recently described between experimental and theoretical HLA-A*02:01-binding data for other *T. cruzi* antigens (Gowthaman et al., 2010; Maranon et al., 2011). Immunization assays carried out in C57BL/6-A2-K^b transgenic mice with the *T. cruzi* PFR2 and PFR3 genes fused to the HSP70 gene indicate that two out of the six epitopes (PFR2_{449–457} and PFR3_{481–489}) are highly immunodominant. Moreover, we observed that the six *T. cruzi* PFR2 and PFR3 CD8⁺ T selected epitopes are processed and presented by the *T. cruzi* parasite during natural infection and are restricted to the HLA-A*02:01 molecule. Although HLA-A*02:01 is the most prevalent human Class I allele (Krausa et al., 1995), it is possible that the characterized PFR2 and PFR3 CD8⁺ T epitopes may bind to other HLA class I molecules and may be recognized by HLA-A*02:01 negative Chagas disease patients. In fact, the CD8⁺ T cell HLA-A*02:01 restricted K1 peptide derived from *T. cruzi* KMP11 protein, which is highly recognized by Chagas disease patients, has recently been described to be a promiscuous epitope as it is also presented by other HLA-A2 supertype molecules (Lasso et al., 2010).

The six selected PFR2/PFR3 peptides which exhibit a high binding affinity to the HLA-A*02:01 molecule, were recognized by PBMC of HLA-A*02:01 Chagas disease patients. The cytokine pattern of the activated lymphocytes of the patients is pro-inflammatory (IFN- γ and TNF- α). The secretion of IFN- γ has been previously correlated to an improved protective immunity against *T. cruzi* experimental infection (Miyahira, 2008). In addition, the frequency and functionality of the IFN- γ producing CD8⁺ T cells have been described to correlate inversely with the severity of Chagas disease (Lauella et al., 2004). Secretion of anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) was not detected in any of the assayed patients. Moreover, a high level of IL-6, which has been reported to inhibit the expansion and functionality of regulatory T cells (Vander Aar et al., 2011), was also detected for these responder patients. Remarkably, our results also show that the activated CD8⁺ T cells cytotoxic activity, measured by the GzB secretion, is observed in chronic patients in the indeterminate phase of the disease but is not detected in symptomatic chronic patients. The observed cytotoxic activity presents certain heterogeneity among individuals which may be due to differences in the patient's T cell recognition repertoire and/or host genetic background, assuming a similar degree of exposure along *T. cruzi* infection, as it has been previously suggested (Fonseca et al., 2005).

The expression of PFR2 and PFR3 proteins in the flagellum-retracted intracellular amastigote form could help to understand how an antigen that is associated to the flagellar structure can elicit a Class I specific-immune response. In fact, proteins expressed in the amastigote form of *T. cruzi* that are anchored to the membrane, have shown to be processed into peptides and presented associated with class I MHC by the parasite-infected host cells (Garg et al., 1997). To date, it had been proposed that the degradation of the flagellum and PFRs during the transition of tripomastigote to amastigote leads flagellar components to become exposed and available for recognition by the host immune system (Portman and Gull, 2010).

In summary, six HLA-A*02:01-restricted epitopes, which are efficiently processed and presented in the context of the natural infection of *T. cruzi*, have been identified in the PFR2 and PFR3 proteins of the parasite. The cytokine pattern of the activated CD8⁺ T cells of the patients is pro-inflammatory. Although the cytokine secretion pattern did not change accordingly with the progression of the Chagas disease pathology, a higher IFN- γ secretion level was observed in the asymptomatic chronic Chagas patients versus symptomatic patients. The cytotoxic activity

of the PFRs epitope-specific CD8⁺ T cells seems to be correlated with the degree of severity of Chagas disease, since GzB secretion was only detected in cells from asymptomatic chronic patients. Thus, the PFR2 and PFR3-derived epitopes may constitute attractive molecules for monitoring Chagas disease pathology and may help to design specific immunotherapies and/or vaccines against *T. cruzi* infection. In fact, there is a high degree of conservation among the PFR2/PFR3 proteins from *T. cruzi* strains and other trypanosomatids (laboratory data).

5. Conclusion

PFR2 and PFR3 proteins of *T. cruzi* are expressed in the three forms of the parasite. These proteins contain at least six cytotoxic CD8⁺ T cell epitopes restricted to the HLA-A*02:01 molecule (PFR2_{19–28}, PFR2_{156–163}, PFR2_{449–457}, PFR3_{428–436}, PFR3_{475–482} and PFR3_{481–489}) which are processed and presented during the natural infection of Chagas disease. The cytotoxic activity of PFRs-specific CD8⁺ T lymphocytes was only detected in purified PBMC from chronic patients who were in the indeterminate phase of the disease.

Acknowledgements

We are grateful to Prof. M.E. Patarroyo for his help in the peptide synthesis. We thank A. Lopez-Barajas (IPBLN-CSIC) for her technical assistance in the purification of the recombinant proteins and purification of PFRs specific antibodies; A.I. Fernandez and L. Montosa (IPBLN-CSIC) for their technical assistance in the purification of peripheral mononuclear cells from blood samples; B. Rojas (IPBLN-CSIC) for her technical assistance in the indirect immunofluorescence assays. Dr. M.A. López-Nevot and A. Moreno, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, for HLA-A typing and Dr. C. Britten (Johanes Gutenberg-University) for the K562-A2 cell line. We also thank to Dr. L. Murcia and A. Iborra from Hospital Virgen de la Arrixaca (Murcia, Spain) for collecting human biological samples. This work was supported by grants P08-CVI-04037PAI (Junta de Andalucía), BFU2010-1670 from Plan Nacional I+D+i (MICINN), RD06/0021/0014 and RD06/0021/1007 – ISCIII-RETIC (MICINN, Spain) and FEDER. MS and BC were supported by grant FIS, 2009SGR385 from ISCIII (MICINN, Spain).

References

- Britten, C.M., Meyer, R.G., Kreer, T., Drexler, I., Wolfel, T., Herr, W., 2002. The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ ELISPOT assays. *Journal of Immunological Methods* 259, 95–110.
- Cazorla, S.I., Frank, F.M., Malchiodi, E.L., 2009. Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection. *Expert Review of Vaccines* 8, 921–935.
- Coura, J.R., Dias, J.C., 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (Suppl. 1), 31–40.
- Díez, H., López, M.C., Thomas, M.C., Guzman, F., Rosa, F., Veñazco, V., González, J.M., Puerta, C., 2006. Evaluation of IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes in response to the K1 peptide from KMP-11 protein in patients infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology* 28 (3), 101–105.
- Dutra, W.O., Rocha, M.O., Teixeira, M.M., 2005. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology* 21, 581–587.
- Fonseca, C.T., Cunha-Neto, E., Kalil, J., Jesus, A.R., Correa-Oliveira, R., Carvalho, E.M., Oliveira, S.C., 2004. Identification of immunodominant epitopes of *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens using human T cells. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 63–66.
- Fonseca, S., Moins-Teisserenc, H., Clave, E., Ianni, B., Nunes, V., Mady, C., Iwai, L., Sette, A., Sidney, J., Marin, M.L.C., Goldberg, A., Guilherme, L., Charron, D., Toubert, A., Kalil, J., Cunha Neto, E., 2005. Identification of multiple HLA-A*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8⁺ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients. *Microbes and Infection* 7, 688–697.
- Fouts, D.L., Stryker, G.A., Gorski, K.S., Miller, M.J., Nguyen, T.V., Wrightsman, R.A., Manning, J.E., 1998. Evidence for four distinct major protein components in the paraflagellar rod of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 21846–21855.

- 298 *A. Egui et al. / Molecular Immunology 52 (2012) 289–298*
- Garg, N., Nunes, M.P., Tarleton, R.L., 1997. Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway. *Journal of Immunology* 158, 3293–3302.
- Gowthaman, U., Chodiseti, S.B., Parihar, P., Agrewala, J.N., 2010. Evaluation of different generic in silico methods for predicting HLA class I binding peptide vaccine candidates using a reverse approach. *Amino Acids* 39, 1333–1342.
- Houghten, R.A., 1985. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen–antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 5131–5135.
- Krausa, P., Brywka 3rd, M., Savage, D., Hui, K.M., Bunce, M., Ngai, J.L., Teo, D.L., Ong, Y.W., Barouch, D., Allsop, C.E., et al., 1995. Genetic polymorphism within HLA-A*02: significant allelic variation revealed in different populations. *Tissue Antigens* 45, 223–231.
- Kuschnir, E., Sgammini, H., Castro, R., Evequoz, C., Ledesma, R., Brunetto, J., 1985. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 45, 249–256.
- Lasso, P., Mesa, D., Cuellar, A., Guzman, F., Bolanos, N., Rosas, F., Velasco, V., Thomas Mdel, C., Lopez, M.C., Gonzalez, J.M., Puerta, C.J., 2010. Frequency of specific CD8⁺ T cells for a promiscuous epitope derived from *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein in chagasic patients. *Parasite Immunology* 32, 494–502.
- Laucella, S.A., Postan, M., Martin, D., Hubby Fralish, B., Albareda, M.C., Alvarez, M.G., Lococo, B., Barbieri, G., Viotti, R.J., Tarleton, R.L., 2004. The frequency of IFN- γ T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *Journal of Infectious Diseases* 189, 909–918.
- Luhrs, K.A., Fouts, D.L., Manning, J.E., 2003. Immunization with recombinant paraflagellar rod protein induces protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* 21, 3058–3069.
- Maga, J.A., LeBowitz, J.H., 1999. Unravelling the kinetoplastid paraflagellar rod. *Trends in Cell Biology* 9 (10), 409–413.
- Maranon, C., Egui, A., Carrilero, B., Thomas, M.C., Pinazo, M.J., Gascon, J., Segovia, M., Lopez, M.C., 2011. Identification of HLA-A*02:01-restricted CTL epitopes in *Trypanosoma cruzi* heat shock protein-70 recognized by Chagas disease patients. *Microbes and Infection* 12, 1525–1532.
- Maranon, C., Planelles, L., Alonso, C., Lopez, M.C., 2000. HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. *International Immunology* 12, 1685–1693.
- Maranon, C., Thomas, M.C., Planelles, L., Lopez, M.C., 2001. The immunization of A2/K(b) 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. *Molecular Immunology* 38, 279–287.
- Marin-Neto, J.A., Rassi Jr., A., Avezum Jr., A., Mattos, A.C., Rassi, A., Morillo, C.A., Sosa-Estani, S., Yusuf, S., 2009. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (Suppl. 1), 319–324.
- Matsuda, N.M., Miller, S.M., Evora, P.R., 2009. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clinics (Sao Paulo)* 64 (12), 1219–1224.
- Miyahira, Y., 2008. *Trypanosoma cruzi* infection from the view of CD8⁺ T cell immunity—an infection model for developing T cell vaccine. *Parasitology International* 57, 38–48.
- Morell, M., Thomas, M.C., Caballero, T., Alonso, C., Lopez, M.C., 2006. The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* 24, 7046–7055.
- Padilla, A.M., Bustamante, J.M., Tarleton, R.L., 2009. CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Current Opinion in Immunology* 21, 385–390.
- Pogue, R.R., Eron, J., Frelinger, J.A., Matsui, M., 1995. Amino-terminal alteration of the HLA-A*0201-restricted human immunodeficiency virus pol peptide increases complex stability and in vitro immunogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8166–8170.
- Portman, N., Gull, K., 2010. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. *International Journal for Parasitology* 40, 135–148.
- Prata, A., 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infectious Diseases* 1, 92–100.
- Punukollu, G., Gowda, R.M., Khan, I.A., Navarro, V.S., Vasavada, B.C., 2007. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology* 115, 279–283.
- Rassi Jr., A., Rassi, A., 2010. Predicting prognosis in patients with Chagas disease: why are the results of various studies so different? *International Journal of Cardiology* 145, 64–65, author reply, pp. 66–67.
- Sette, A., Sidney, J., del Guercio, M.F., Southwood, S., Ruppert, J., Dahlberg, C., Grey, H.M., Kubo, R.T., 1994. Peptide binding to the most frequent HLA-A class I alleles measured by quantitative molecular binding assays. *Molecular Immunology* 31, 813–822.
- Tanowitz, H.B., Machado, F.S., Jelicks, L.A., Shirani, J., de Carvalho, A.C., Spray, D.C., Factor, S.M., Kirchhoff, L.V., Weiss, L.M., 2009. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Progress in Cardiovascular Diseases* 51, 524–539.
- Thomas, M.C., Garcia-Perez, J.L., Alonso, C., Lopez, M.C., 2000. Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. *DNA and Cell Biology* 19, 47–57.
- Thomas, M.C., Longobardo, M.V., Carmelo, E., Maranon, C., Planelles, L., Patarroyo, M.E., Alonso, C., Lopez, M.C., 2001. Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. *Clinical and Experimental Immunology* 123, 465–471.
- Vander Aar, A.M., de Groot, R., Sanchez-Hernandez, M., Taanman, E.W., van Lier, R.A., Teunissen, M.B., de Jong, E.C., Kapsenberg, M.L., 2011. Cutting edge: virus selectively primes human langerhans cells for CD70 expression promoting CD8⁺ T cell responses. *Journal of Immunology* 187, 3488–3492.
- Vazquez-Chagoyan, J.C., Gupta, S., Garg, N.J., 2011. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. *Advances in Parasitology* 75, 121–146.
- Vitiello, A., Marchesini, D., Furze, J., Sherman, L.A., Chesnut, R.W., 1991. Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex. *Journal of Experimental Medicine* 173, 1007–1015.
- Wizel, B., Nunes, M., Tarleton, R.L., 1997. Identification of *Trypanosoma cruzi* transsialidase family members as targets of protective CD8⁺ TC1 responses. *Journal of Immunology* 159, 6120–6130.
- Wrightsmann, R.A., Luhrs, K.A., Fouts, D., Manning, J.E., 2002. Paraflagellar rod protein-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes target *Trypanosoma cruzi*-infected host cells. *Parasite Immunology* 24, 401–412.
- Wrightsmann, R.A., Miller, M.J., Saborio, J.L., Manning, J.E., 1995. Pure paraflagellar rod protein protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity* 63, 122–125.

4.1.3.- Functional and phenotypical characterization of immunodominant CD8⁺ T-cell epitopes contain in the Trypanosoma cruzi TcCA-2 membrane antigen that are recognized by cytotoxic T cells from Chagas disease patients

Egui, A; Thomas, MC; Marañón, C; Carrilero, B; Segovia, M; Alonso, C; López, MC. Manuscrito en preparación.

Title: Functional and phenotypical characterization of immunodominant CD8⁺ T-cell epitopes contain in the *Trypanosoma cruzi* TcCA-2 membrane antigen that are recognized by cytotoxic T cells from Chagas disease patients.

Adriana Egui^a, M. Carmen Thomas^a, Concepción Marañón^{a,b}, Bartolomé Carrilero^c, Manuel Segovia^c, Carlos Alonso^d, Manuel Carlos López^{a,*}

^a Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPBLN-CSIC). Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud. Avda. del Conocimiento S/N. 18100-Granada, Spain

^b GENYO. Centro de Genómica e Investigación Oncológica: Pfizer / Universidad de Granada / Junta de Andalucía. Granada, Spain

^c Unidad Regional de Medicina Tropical. Hospital Virgen de la Arrixaca. Cra. Cartagena s/n. El Palmar, 30120- Murcia, Spain.

^d Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-Universidad Autónoma de Madrid. Cantoblanco, Madrid-Spain

*Corresponding author: Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPBLN-CSIC). Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud; Avda. del Conocimiento s/n. 18100-Granada (Spain). Ph.: 34 958 181661. Fax: 34 958 181632.

E-mail address: mclopez@ipb.csic.es (M.C. López).

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease, also known as American trypanosomiasis which affects at least 10 million people in Central and South America. In this geographic area more than 25 million people are at risk of infection (WHO 2012), and therefore it represents an important health problem. Several authors have considered American trypanosomiasis as the most neglected disease among the already neglected diseases (Tarleton and Curran 2012).

Immune control of *T. cruzi* is a complex process, requiring the generation of a substantial antibody response and the activation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses (Alvarez, Postan et al. 2008). Immune protection against the parasite infection relies heavily on the CD8⁺ T cell responses against *T. cruzi* after the intracellular replication and localization (Tarleton, Sun et al. 1994). These responses are driven by the initial encounter of parasite-specific T cells with parasite antigens, resulting in a clonal expansion and differentiation of effector and memory subsets (Masopust, Kaech et al. 2004). Many criteria have been used to characterize antigen-experienced memory CD8⁺ T cells including the expression of the activation marker CD45RA, the homing receptor CCR7 (Sabbaj, Heath et al. 2007), the costimulatory molecule CD27, and most recently, the cytokine receptor CD127 (interleukin IL7 receptor). The CD127 receptor allows cells to respond to IL-7, which, along with IL-15, is important for survival and homeostatic proliferation of memory T cells (Schluns, Kieper et al. 2000) (Becker, Wherry et al. 2002). CD127⁺ antigen-specific CD8⁺ T cells present in *T. cruzi* infection produce IFN- γ after peptide restimulation, are stably maintained when transferred to an antigen-free environment (Bixby and Tarleton 2008). Remarkably, complete parasite clearance in mice treated with benznidazole that resulted in the emergence of a protective *T. cruzi* specific, predominantly CD127⁺ central memory T cells population (Bustamante, Bixby et al. 2008). Clinical symptoms of Chagas disease are directly related to the efficiency of the immune response against *T. cruzi*. A more important clinical severity has been observed in patients with a lower CD8⁺ T lymphocytes count able to produce IFN- γ in response to *T. cruzi* compared to asymptomatic patients. This difference has been mainly associated to an increased differentiation of memory CD8⁺ T cells (CD27⁻CD28⁻CD45RA⁻) as well as clonal deployment in those individuals with a chronic severe *T. cruzi* infection (Albareda,

Laucella et al. 2006). While CD8⁺ T cell responses are crucial to control parasite infection there are only few parasite derived CD8⁺ epitopes described for *T. cruzi* antigens.

Many of the antigenic proteins of pathogenic protozoans including *T. cruzi* contain large tandem repeat domains. The TcCA-2 protein is characterized by N-terminal imperfect repetitions of a 12 aa domain (Buschiazzi et al 1992), as well as its homologous the TCR39 and B13 antigens (Hoft et al 1989; Gruber and Zingales 1993). Some of these repetitive domains are recognized with high sensitivity and specificity by sera from chronic Chagas disease patients (Thomas, Fernandez-Villegas et al. 2012) (Duranti, Camargo et al. 2012). It has also been described the recognition of T cells epitopes from the mentioned repetitive domains on the context of Class II HLA molecules (Abel, Iwai et al. 2005). Nevertheless, no CD8⁺ T cell epitopes of this immunodominant antigen has been characterized until now. In the present paper four T CD8⁺ epitopes contained in the *T. cruzi* TcCA-2 protein restricted to the HLA-A*02:01 molecule were identified. They are naturally presented and recognized by Chagas disease patients. Additionally, the frequency of peptide-specific CD8⁺ T cells, their functional activities and phenotype were determined. Interestingly, a differential phenotypic profile has been observed according to the severity of the disease. In patients with cardiac symptoms most of these TcCA-2-specific CD8⁺ T cells are effector memory cells (CD27⁻/CCR7⁻/CD45RA⁺) with characteristics of senescence. This fact could be related to the persistent immune system activation observed in this advanced stage of the infection.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

TAP-deficient T2 cells were used for HLA-A*02:01 binding assays and class I-negative K562 cells for the HLA-A*02:01 restriction assay. They were cultured in complete RPMI medium supplemented with 10% of inactivated Fetal Calf Serum (iFCS), 2 mM glutamine, and 100 U/ml penicillin. K562-A2 cells, expressing the HLA-A*02:01 molecule, were kindly provided by Dr Peter Ponsaerts (University of Antwerp), with the permission of Dr. Cedrik Britten (Johanes Gutenberg-University

Mainz), and cultured in the presence of 0.5 µg/ml of G-418 as previously described (Britten, Meyer et al. 2002).

Study populations

HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients were selected and included in this study. All patients were Spain-residents coming from endemic areas being diagnosed for Chagas disease using two conventional serological tests (Chagas ELISA, Ortho Clinical Diagnosis and Immunofluor Chagas, Biocientífica, Argentina), following WHO criteria. For the HLA-A*02:01 restriction assay, 10 adults chronic Chagasic patients were tested and for cytotoxicity, functional activity and phenotypic characterization 19 adults HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients and 9 healthy donors were studied. The clinical status of each HLA-A*02:01⁺ patient was diagnosed as indeterminate (IND, n=8) or cardiac (CCC, n=11) based on Kuschnir classification of Chagas disease (Kuschnir, Sgammini et al. 1985). HLA-A genotyping was performed using the RELI™ SSO HLA-A Typing kit (Invitrogen). All selected individuals had never received treatment for the disease.

Thirteen mL of blood samples from mentioned Chagas disease patients and healthy donors were collected in EDTA at Hospital Virgen de la Arrixaca (Murcia-Spain). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified as previously described in Egui et al. 2012, stored in iFCS with 10% DMSO and cryopreserved in liquid nitrogen until use.

Theoretical prediction of HLA-A*02:01 epitopes and synthetic peptides

The *in silico* prediction of potential HLA-A*02:01 ligands contained in the *T. cruzi* TcCA-2 protein was performed by analyzing the putative amino acid sequence of TcCA-2. The sequence was deduced by analyzing the *TcCA-2* gene sequence found in GenBank (CAI strain), accession number: M92049.1. Additionally, the *in silico* translation was performed of the sequence from the nucleotide 817-843 the sequence encoding the peptide 12828 from *T. cruzi* strain CL Brenner, accession number M-813834. Two HLA-A*02:01 binding prediction algorithms were used, SYFPEITHI for affinity (<http://www.syfpeithi.de/home.htm>) and BIMAS for calculating the stability (half-life) of the complex (www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/).

Peptides bearing the described HLA-A*02:01 binding motifs were synthesized by simultaneous multiple-peptide solid-phase methods. The peptides were assembled using the standard t-Boc solid-phase-peptide synthesis (SPPS) strategy on a P-methylbenzhydrylamide (MBHA) resin. Purity was checked by high performance liquid chromatography (HPLC), and the correct composition of the peptide was verified by mass spectrometry (Houghten 1985). Peptides were dissolved to 1 mM final concentration in water containing 10% DMSO and stored at -20°C .

HLA-A*02:01 binding assay

TAP-deficient T2 cells were used to evaluate the binding affinity to HLA-A*02:01. These cells were loaded with different quantities (25, 50 and 100 μM) of each peptide in duplicates in serum-free RPMI medium, and incubated overnight at room temperature. Afterwards, the cells were stained in duplicate with a PE-labeled HLA-A2-specific antibody (BB7.2 clone, BD biosciences) and analyzed by flow cytometry in order to analyze the conformationally correct HLA-A*02:01 surface expression. The high-affinity HLA-A*02:01-binding peptide HB-ENV₃₃₄₋₃₄₂ (WLSLLVPFV) was included as internal standard. Affinity data were calculated as the percentage of maximum complex stabilization, as described in Pogue, et al. 1995. The following equation was used: % of maximal stabilization = $100 \times [(\text{mean fluorescence with peptide}) - (\text{background mean fluorescence})] / [(\text{mean fluorescence with } 100 \mu\text{M HB-ENV peptide}) - (\text{background mean fluorescence})]$; background value was obtained with cells incubated in the same conditions without peptide (Maranon, Thomas et al. 2001).

ELISPOT

The frequency of IFN- γ and Granzyme B (GzB) producing cells was evaluated by ELISPOT assays using cryopreserved PBMCs from Chagas disease patients and healthy donors as a control. This protocol was carried out as described in Marañón et al., 2011. Briefly, 96-well PVDF membrane-bottom plates (Millipore) were pre-wetted with 35% ethanol and washed three times with PBS. Subsequently, plates were coated with 100 μL of anti IFN- γ (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or anti-GzB (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) monoclonal antibody (Mabtech) and incubated overnight at 4°C . Plates were washed with PBS and incubated with 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ of blocking solution (RPMI-1640-10% FCS) at 37°C for 30 min. Afterwards, 7.5×10^4 Splenocytes or PBMCs/well were added and incubated with 1 μM

of each peptide for 30 h at 37 °C with 5% CO₂ in triplicates. As a positive control, the PBMCs were stimulated with 50 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) and 500 ng/ml ionomycin (Sigma), or 10 µg/mL of phytohaemagglutinin (PHA, Sigma?). Supernatants were removed and aliquoted at -80°C for subsequent quantification and determination of the cytokine secretion profile. After five washes, 100 µL/well of a 1 µg/mL solution of biotinylated IFN γ - or GzB-specific antibody (Mabtech) was added in 0.5% iFCS in PBS, and the plates were incubated for 2 h at RT. Wells were extensively washed with PBS and incubated with 100 µL/well streptavidin-alkaline phosphatase (Sigma) at dilution of 1:6000 for 1 h at RT. After washing three times with PBS, 50 µL/well of substrate solution (NBT-BCIP substrate, Sigma) was added, and plates incubated for 20–30 min at RT in the dark. The reaction was stopped by rinsing the plates with cold tap water. The spots were visualized in an AXIO PLAN 2 Imagine microscope and quantified using KS ELISPOT software. The results are expressed as the number of peptide-induced spots forming cell (SFC)/10⁶ PBMC after subtracting the spot number of unstimulated cells (basal level).

Responses were considered significant if (i) a minimum of 30 SFC/10⁶ PBMCs were detected after subtraction of the negative control (PBMCs without peptide), and additionally, (ii) the response was at least over twofold the negative control.

Cytokine-secretion tests

Cytokine secretion (IL-4, IL-10, IL-6, IFN- γ , TNF- α) was determined in the supernatants of PBMCs from Chagas disease patients, after *in vitro* stimulation with 1 µM of each peptide for 30 h at 37 °C in RPMI supplemented with 10% iFBS as explained before. The secretion profile was determined by using a bead-based multiplex immunoassay system (Bio-Plex, Bio-Rad), following the manufacturer's instructions. The response was considered positive if an increase in the secretion of cytokines was at least three folds higher than the secretion by unstimulated cells (basal secretion level) and at least, 4 pg/mL for IL-4, 2 pg/mL for IL-10, 15 pg/mL for IL-6 and 5 pg/mL for IFN- γ and TNF- α . The positive control consisted of 50 ng/mL Phorbol 12 myristate 13-acetate (PMA) and 500 ng/mL ionomycin (Sigma). Cytokine levels were quantified in each sample by using the Bio-Plex Manager software 4.1 (Bio-Rad).

In HLA-A*02:01 restriction assay, peptide-pulsed K562-A2 cells were used as antigen-presenting cells (APC). Plates were seeded with 20,000 peptide-pulsed K562-A2 (Britten et al., 2002) or K562 cells as a negative control. APC were incubated with 60,000 effector cells per well and the IFN- γ secretion test was performed as mentioned above.

CD8⁺ T cell peptide-specific phenotypic characterization

TcCA-2-specific CD8⁺ T cells were characterized using a HLA-A*02:01 APC-labeled dextramer loaded with the 12822 and 12827 peptide respectively (Inmunodex). 1X10⁶ PBMCs from 17 adults HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients and 6 healthy donors were incubated with 10 μ L of each dextramer in 40 μ L PBS 5% FCS 10 min at room temperature (RT) in the dark. Afterwards, these cells were incubated 20 min at 4 °C with a cocktail of antibodies (BD Pharmingen): CD8-V500, CD8 PerCP-Cy5.5 CD45RA-APC-H7, CCR7-V450, CD27-FITC, CD127-PerCp-Cy5, CD57-FITC and 1/50 diluted CD44RA-APC. The labeled cells were washed twice with PBS-5% FCS and resuspended with 400 μ L of PBS 1X. Data were acquired in a FACS Aria III Cell Sorter and analyzed using Flowjo 7.6.5 software (Bio-Rad). At least 100.000 PBMC cells were acquired using FCS/SSC parameters. The gating strategy is shown in figure 2.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS statistical package version 15.0 (Spss Inc., Chicago Illinois). The Mann-Whitney U test was used to carry out comparisons among groups of patients. Statistical significance was assigned at a value of $p \leq 0.05$.

RESULTS

Selection of HLA-A*02:01-binding peptides within *T. cruzi* TcCA-2 protein

In order to identify peptides containing potential HLA-A*02:01-binding sites, the deduced amino acid sequence of *T. cruzi* TcCA-2 was screened using two computer algorithms, SYFPEITHI for binding affinity (www.syfpeithi.de) and Bimas for stability of the complex (http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/). Eight peptides showed to have mid-to-high scores of affinity to HLA-A*02:01 for some of the

algorithms analyzed (Table 1), thus they were synthesized and their in vitro binding capacity was tested using TAP-deficient T2 cells. The measured accumulation of HLA-A*02:01 molecules on the surface of T2 cells reflects the capacity of each exogenous peptide to bind and stabilize this class I molecule (Pogue, Eron et al. 1995).

The relative binding index of these eight TcCA-2 peptides was evaluated in a peptide concentration assay where three different amounts of each peptide were tested (25µM, 50µM and 100µM). The HB-ENV₃₃₅₋₃₄₃ peptide was employed as internal reference as it has previously shown high affinity for HLA-A*02:01 binder (Sette, Vitiello et al. 1994); Egui et al. 2012 *Mol Immunol* 52:289-298). As shown in figure 1, three peptides (12823, 12824 and 12827) showed a relative binding index to HLA-A*02:01 superior to 30%.

Detection of CD8⁺ T lymphocytes specific for TcCA-2 epitopes in HLA-A*02:01+ Chagas disease patients.

In order to analyze whether Chagas disease patients could recognize the TcCA-2-derived peptides in the context of HLA-A*02:01⁺ molecule, peptide-pulsed K562-A2 cells were used as APCs in an IFN γ secretion test (Table 3). PBMCs from HLA-A*02:01⁺ Chagas disease patients recognized the 12819, 12822, 12827 and 12828 epitopes while being presented on K562-A2 but not K562 cells, which do not express Class I molecules. As shown in table 2, 2 out of 9 patients responded to the 12819 peptide, 2 out of 10 to the 12822, 3 out of 9 the 12827 and 1 out of 10 12828. These results show that 4 out of the 8 TcCA-2 derived peptides are efficiently processed and presented for the stimulation of HLA-A*02:01-restricted T CD8⁺ lymphocytes during the natural history of *T. cruzi* infection.

Cytotoxic activity of the CD8⁺ T cells specific for the four TcCA-2-derived epitopes was evaluated by the secretion of GzB through ELISPOT assays. Thus, PBMC from HLA-A*02:01 chagasic patients, who come from an endemic area and currently reside in Spain (n=14) and healthy donors HLA-A*02:01 (n=9) were tested after incubation of each peptide. A positive GzB response was detected in three out of 10 patients in response to 12819 peptide, four out of 14 patients in response to 12822 peptide, one out of 14 patients in response to 12827 peptide and one out of 11 patients in response to 12828 peptide (table 3).

Functional analysis of these epitope-specific CD8⁺ T cells was carried out by determination of the secretion profile of the pro-inflammatory (IFN- γ , TNF- α and IL-6) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) cytokines. The obtained results, presented in Table 3, show that 29% of the patients (4 out of 14) recognized the peptides 12822 and 12827 by secreting IFN- γ , TNF- α and IL-6, while for 12828 only IL-6 is induced on 18% of the patients. Despite the 12819 peptide induces cytotoxic T lymphocytes, it did not detect the presence of mentioned cytokine production. Moreover, the four TcCA-2 derived peptides do not induce secretion of anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) in the PBMC of assayed patients (data not shown). For peptides 12822 and 12827 the pro-inflammatory cytokines secretion level is higher in the chronic Chagas patients at the asymptomatic stage of the disease compared with that detected in patients with cardiopathology.

Phenotypic characterization of T CD8⁺ lymphocytes specific for TcCA-2 derived peptides

After demonstrating lymphocytic activation capacity by TcC-A2 (12819, 12822, 12827, and 12828), it was interesting to characterize phenotypically T CD8 lymphocytes specific for the two most immunodominant peptides (12822 and 12827). With that aim mononuclear cells from Chagas patients under different severities of the disease (IND (n=5) y CCC (n=11)) and healthy donors (HD n=6) were incubated with 12822 and 12827 dextramers. In the lymphocyte population, differential CD8 expression levels were found after evaluating them with flow cytometry (Figure 2A). For population T CD8^{HIGH} lymphocytes specific for the 12822 and 12827 peptides were determined (Figure 2B) in both healthy controls and Chagas disease patients.

Among the T lymphocytes specific for each dextramer, CD45RA expression (Figure 2D) CD27 and CCR7 allowed discriminate different CD8⁺ T cells subpopulations including naive CD8 T cells (CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺), terminally differentiated RA⁺ effector memory (T_{EMRA}, CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻) (Figure 2F), effector memory (T_{EM}, CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻) and central memory (T_{CM}, CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺) (Figure 2E). Moreover, by combining the CD45RA/CD127 and CD44/CD57 markers subpopulations were defined as follows: early differentiated CD8 T cells (T_{ED} CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺), CD8 terminally differentiated (T_{TD}

CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻), senescent memory CD8⁺ T lymphocytes (CD8⁺CD44⁺CD57⁺) and non-senescent memory CD8⁺ T lymphocytes (CD8⁺CD44⁺CD57⁻). Positive regions for each antibody used in the present investigation were established based on the control isotypes corresponding to each antibody. Taking into account the dextramers, it was used as a reference to establish the cut-off as well as the negative control (non-marked cells), and the marking of mononuclear cells incubated with every antibody except for the dextramer to be evaluated.

As shown on figure 3A, on total CD8⁺ T cells populations from each individual evaluated in this study, we observed that CD8 lymphocyte percentage is significantly higher on Chagas disease patients (IND and CCC) compared with healthy donors ($P \leq 0.05$). In addition, we detected that both IND and CCC Chagas disease patients have a higher percentage of 12822 and 12827 specific T cells CD8⁺ compared to healthy individuals ($P \leq 0.01$).

Triple cell labeling using antibodies against CD45RA, CD27 and CCR7 molecules, allowed the phenotypical characterization of 12822 and 12827-specific CD8 T cells from Chagas disease patients under different phases of the disease (IND and CCC). Thus, in figure 4A₁ we observe that 12822-specific CD8_{HIGH} T cells from IND patients present a higher percentage of cells expressing the CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺ (T_{NAIVE}) phenotype than that detected in CCC patients ($P \leq 0.01$). Moreover, the percentage of CD8 T cells subpopulation completely differentiated memory cells (CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻ T_{EMRA}) are significantly less in IND patients than in CCC. In fact, the 12822-specific CD8 T cells from CCC chagasic patients present an effector phenotype, having a main expression of T_{EMRA} cells compared to T_{NAIVE} ($P \leq 0.01$), as well as in T_{EM} cells compared to T_{CM} ($P \leq 0.05$).

The 12827-specific CD8 T cells populations have a similar profile for the 12822 peptide (Figure 4B₁). Thus, the percentage of cells expressing CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺ (T_{NAIVE}) was higher in IND patients compared to the percentage of this T_{NAIVE} cells detected in CCC ($P \leq 0.01$). Moreover, the percentage of CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻ (T_{EM}) is higher in CCC chagasic patients versus IND patients ($P \leq 0.05$). In addition, the 12827-specific CD8 T cells from chagasic patients in CCC phase have a predominant profile of T_{EM} cells versus of T_{CM} cells ($P \leq 0.001$) (Figure 4B₁).

The 12822 and 12827-specific CD8 T cells differentiation level (early and terminally differentiated phenotype, $CD8^+CD45RA^-CD127^+$ and $CD8^+CD45RA^+CD127^-$, respectively) was determined by combining the CD45RA and CD127 surface marker (Figure 4A₂-B₂). The obtained results showed that both IND and CCC patients have a predominant terminally differentiated phenotype expression versus the early differentiated phenotype ($P \leq 0.01$ and $P \leq 0.001$).

The phenotype associated with replicative senescent $CD8^+$ T lymphocytes is attributed to the expression of CD57. Therefore, we evaluated the CD57 expression in $CD44^+$ cells (marker for effector-memory T-cells) in both $CD8^+$ 12822 and 12827-specific populations. The obtained results shown in Figure 5A-B, evidence that CCC chagasic patients have a significant higher percentage of $CD44^+CD57^+$ senescent memory cells than that detected in IND patients ($P \leq 0.01$). By the contract the specific-peptide $CD8^+$ T cells from patients in IND phase of the disease have a predominant phenotype ($CD44^+CD57^-$) of memory non-senescent ($P \leq 0.001$).

TABLES AND FIGURES

Table 1.- Sequences of the TcCA-2-derived HLA-A*02:01 binding peptides.

| CODE PEPTIDE | POSITION (nt) | SEQUENCE ^a | SYFPEITHI score | BIMAS score |
|--------------|---------------|-----------------------|--------------------|----------------|
| 12828 | 817-843 | AAAGDKLSL * | 23 | 0.29 |
| 12819 | 1204-1233 | ALQVTNHRYL | 22 | 23.49 |
| 12822 | 1891-1920 | TVFDASRTV | 18 | 18.46 |
| 12823 | 1921-1950 | FANAPGVAQV | 22 | 10.22 |
| 12824 | 2032-2061 | SILQNVHATL | 26 | 10.86 |
| 12825 | 2158-2187 | AIGGGKLPAL | 28 | 6.75 |
| 12826 | 2215-2244 | SAFGNHASTV | 21 | 3.57 |
| 12827 | 2386-2412 | ALRNLRVFL | 24 | 8.92 |

Theoretical binding scores to HLA-A*02:01 calculated by the algorithm SYFPEITHI and the dissociation half time in minutes calculated by the algorithm BIMAS.

^a Sequences contained in the putative region of the sequence found in GenBank, accession number: M92049.1. The sequence starts from the nucleotide 566 and ends on the nucleotide 2461.

* The sequence encoding the peptide 12828 is contained in the position 817-843 of the nucleotide sequence from Brenner strain (accession number XM-813834).

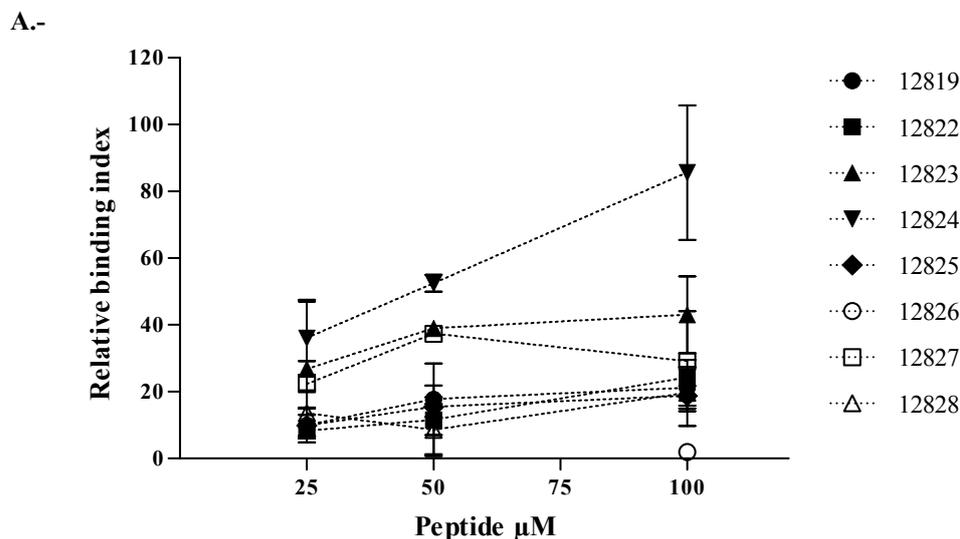


Fig. 1. Binding assay of HLA-A*02:01-restricted TcCA-2 derived peptides to TAP-deficient T2 cells. Relative binding index were calculated using the HB-ENV₃₃₄₋₃₄₂ peptide fluorescence index as a reference. The binding success of each peptide was determined at 25, 50 and 100 μM.

Table 2.- HLA-A*02:01 restriction of the recognition of TcCA-2 epitopes by Chagas disease patients.

| Peptide | Chagas disease patient^a | INF-γ secretion range (pg/mL)^b |
|----------------|---|--|
| 12819 | 2/9 | 6-7 |
| 12822 | 2/10 | 5-7 |
| 12823 | 0/10 | - |
| 12824 | 0/8 | - |
| 12825 | 0/9 | - |
| 12826 | 0/9 | - |
| 12827 | 3/9 | 12-15 |
| 12828 | 1/10 | 9 |

K562-A2 cells were pulsed with 1 mM of each peptide for 1 h, and cocultured with PBMCs from HLA-A*02:01 Chagas disease patients. Following 30 h of growth, IFN- γ secretion was measured in the supernatants. IFN- γ secretion level in K652 cells, not expressing the class I molecule, was subtracted from the values obtained in the assays with the K562-A2 cells loaded with peptides.

Responses were considered positive when the supernatant IFN- γ concentration of the peptide-stimulated cells was at least two folds the concentration of the un-stimulated cells (non-peptide).

^a Patients with positive response, in relation with the total number of patients per assay.

^b Range of IFN- γ secretion by patients with a positive response to TcCA-2 peptides.

Table 3.- Cytokine-secretion and Granzyme B response to TcCa-2 epitopes by PBMCs from HLA-A*02:01⁺ in Chagas disease patients and healthy donors.

| Peptide | Clinicalform ^a | Patient ^a | IL-6 | IFN- γ | TNF- α | GzB ^c | Peptide | Clinicalform ^a | Patient ^a | IL-6 | IFN- γ | TNF- α | GzB ^c |
|---------|---------------------------|----------------------|----------------------|---------------|---------------|----------------------------|---------|---------------------------|----------------------|----------------------|---------------|---------------|----------------------------|
| | | | (pg/mL) ^b | | | (SCF/10 ⁶ PBMC) | | | | (pg/mL) ^b | | | (SCF/10 ⁶ PBMC) |
| 12819 | HD | 411340 | 22 | 1 | 8 | 1 | HD | 411340 | 6 | 0 | 0 | 0 | |
| | HD | GR-008 | 3 | -3 | -21 | -47 | HD | GR-008 | 22 | 3 | 0 | -70 | |
| | HD | 499664 | 0 | -3 | 0 | 0 | HD | 499664 | 0 | -3 | 0 | 0 | |
| | HD | Nor-17 | 0 | 0 | 0 | 0 | HD | Nor-1 | -6 | 1 | -14 | 0 | |
| | HD | Nor-1 | 1 | -2 | -6 | 0 | HD | Gr-006 | 69 | 13 | 5 | 7 | |
| | HD | Gr-006 | -5 | 3 | 1 | 0 | HD | Gr-005 | -77 | -21 | -2 | -47 | |
| | HD | Gr-005 | -58 | 0 | -4 | -40 | HD | Gr-004 | -5 | 0 | 0 | -7 | |
| | HD | Gr-004 | -12 | 4 | -1 | -7 | HD | Gr-011 | -12 | 0 | -8 | -7 | |
| | HD | Gr-011 | -4 | 0 | 0 | -7 | IND | 411535 | -5 | 0 | -1 | -7 | |
| | IND | 499571 | 0 | 1 | 0 | 83 | IND | 411265 | 1127 | 81 | 83 | -100 | |
| | IND | 411535 | -5 | 0 | -2 | 67 | IND | 411283 | 55 | 15 | 26 | -20 | |
| | IND | 411388 | 2 | 2 | -5 | 7 | IND | 411388 | 32 | 1 | -11 | 13 | |
| | IND | 411365 | 10 | 2 | 14 | 0 | IND | 411365 | 23 | 5 | 23 | 7 | |
| | IND | 411510 | -3 | 0 | 1 | -7 | IND | 411510 | -1 | 0 | 2 | 13 | |
| | IND | 411917 | -17 | -1 | -17 | -10 | IND | 411917 | -2 | 1 | -3 | -20 | |
| | CCC I | 499861 | -4 | 0 | -2 | 50 | CCC I | 499861 | -7 | 0 | -3 | -8 | |
| | CCC I | 411884 | 0 | 0 | 0 | 0 | CCC I | 411884 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | CCC I | 499770 | 1 | 0 | -6 | -7 | CCC I | 411456 | 18 | 3 | 12 | 13 | |
| | CCC III | 411509 | -4 | 0 | -5 | 0 | CCC I | 499770 | 49 | 0 | 16 | 0 | |
| HD | 411340 | 11 | 2 | 3 | 1 | CCC II | 411142 | -4 | 0 | -15 | 53 | | |
| HD | GR-008 | 31 | 1 | 15 | -73 | CCC III | 411797 | 9 | -5 | 3 | 27 | | |
| HD | 499664 | 0 | -3 | 0 | 1 | CCC III | 411509 | -5 | 0 | -4 | 25 | | |
| HD | Nor-1 | 18 | 4 | -6 | 0 | HD | 411340 | 9 | 0 | 4 | 0 | | |
| HD | Gr-006 | -2 | 2 | 2 | -7 | HD | GR-008 | 9 | -1 | 0 | -47 | | |
| HD | Gr-005 | 16 | 5 | -1 | -40 | HD | 499664 | 0 | -3 | 0 | 0 | | |
| HD | Gr-004 | -15 | 0 | -1 | 0 | HD | Nor-1 | 1 | 6 | -8 | 1 | | |
| HD | Gr-011 | 54 | 8 | 10 | -20 | HD | Gr-006 | 1 | 6 | 2 | -7 | | |
| IND | 411535 | -6 | 0 | -1 | -13 | HD | Gr-005 | -183 | -19 | -11 | -47 | | |
| IND | 411265 | 1641 | 204 | 160 | -13 | HD | Gr-004 | -9 | 0 | 0 | 0 | | |
| IND | 411283 | 80 | 12 | 35 | 47 | HD | Gr-011 | -11 | 0 | -8 | -20 | | |
| IND | 411388 | 21 | 1 | -10 | 0 | IND | 499571 | 0 | 0 | 0 | 67 | | |
| IND | 411365 | 7 | 0 | 15 | 27 | IND | 411535 | -5 | 0 | -1 | -27 | | |
| IND | 411510 | 1 | 0 | 1 | 0 | IND | 411388 | 36 | 2 | 7 | 33 | | |
| IND | 411917 | -13 | -1 | -4 | 40 | IND | 411365 | 43 | 1 | -6 | 7 | | |
| CCC I | 499861 | -4 | 0 | -3 | 0 | IND | 411510 | 1 | 0 | -1 | -20 | | |
| CCC I | 411884 | 0 | 0 | 0 | 7 | IND | 411917 | 18 | 7 | 11 | 13 | | |
| CCC I | 411456 | 46 | 4 | 6 | -7 | CCC I | 499861 | -4 | 2 | -2 | 8 | | |
| CCC I | 499770 | 3 | -2 | -11 | 13 | CCC I | 411884 | 0 | 0 | 0 | 7 | | |
| CCC II | 411142 | -3 | 2 | -20 | 80 | CCC I | 411456 | 0 | 0 | 0 | 13 | | |
| CCC III | 411797 | 31 | 3 | 7 | 7 | CCC I | 499770 | 22 | 0 | 4 | -7 | | |
| CCC III | 411509 | -4 | 0 | -5 | 50 | CCC III | 411509 | -4 | 0 | -5 | 0 | | |

^a Chagas disease patients in indeterminate stage (IND) or cardiac forms (CCC). HD: healthy donors.

^b Positive responses are in red (IL-6 ≥ 15 pg/mL, IFN- γ and TNF- α ≥ 5 pg/mL for and at least three folds the non-peptide control value).

^c Positive responses are in red (≥ 35 SFC/10⁶ PBMCs superior to non-peptide sample control and at least two folds the non-peptide control value).

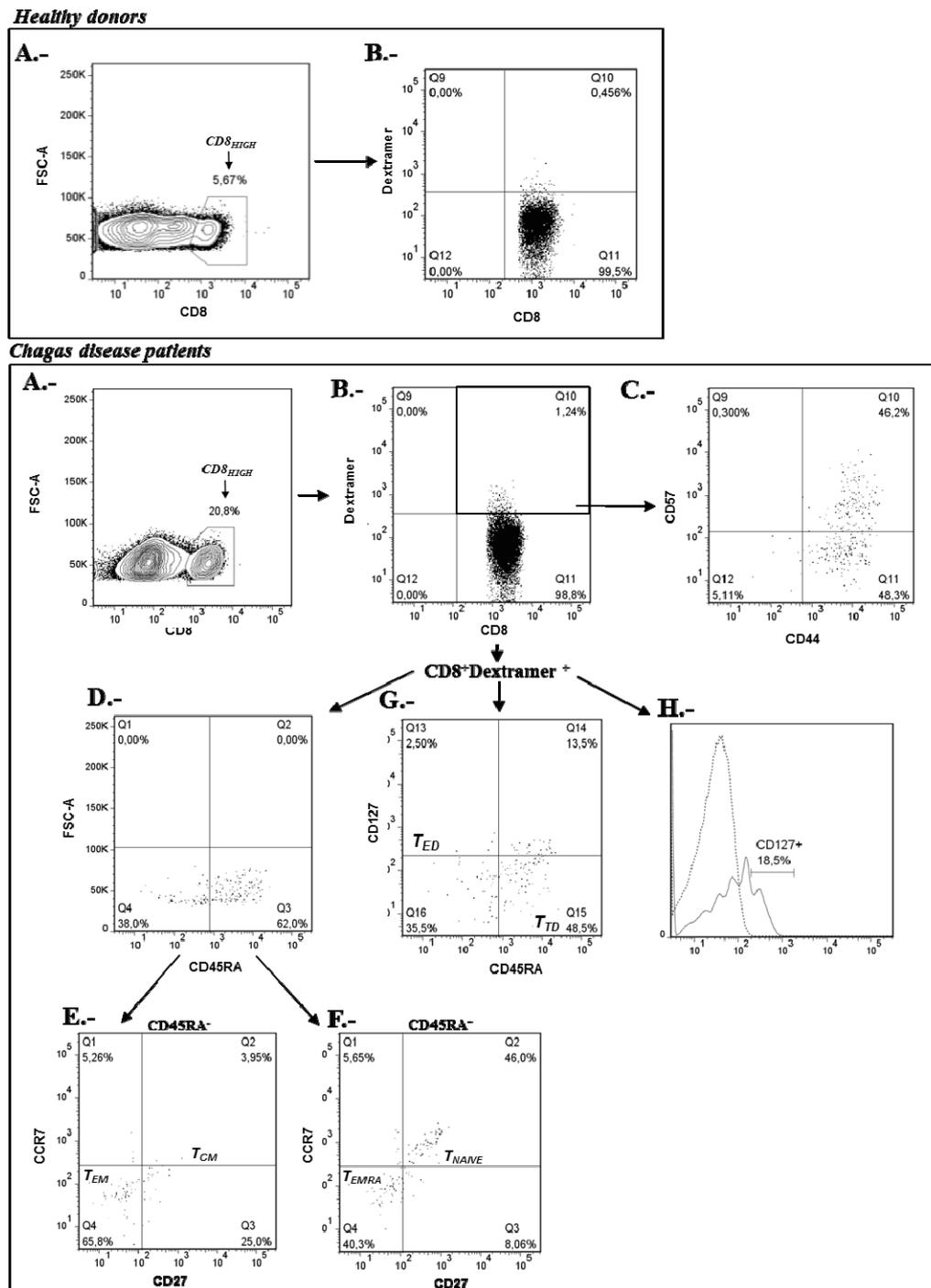


Fig. 2.- Phenotypic characterization of CD8⁺High T cells specific for the 12827 peptide determined by flow cytometry. Representative data for PBMCs from a healthy donor (upper panel) or a Chagas disease patient (lower panel). A.- CD8⁺ T cells. B.- CD8⁺ T cells specific for the 12827 peptide. C.- CD8⁺ T cells specific for the 12827 CD44/CD57 peptide. D.- CD8⁺ T cells specific for the 12827 CD45RA peptide. E.- CD8⁺ T cells specific for the 12827 CD45RA⁻ CD27/CCR7 peptide. F.- CD8⁺ T cells specific for the 12827 CD45RA⁺ CD27/CCR7 peptide. G.- CD8⁺ T cells specific for the 12827 CD45RA/CD127 peptide.

TED (CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺): early differentiated CD8⁺ T cells.
TTD (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁺): terminally differentiated CD8⁺ T cells.
TCM (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺): central memory CD8⁺ T cells.
TEM (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁻): effector memory CD8⁺ T cells.
TNAIVE (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁻): naive CD8⁺ T cells.
TEMRA (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁻): effector memory CD8⁺ T cells RA⁺.

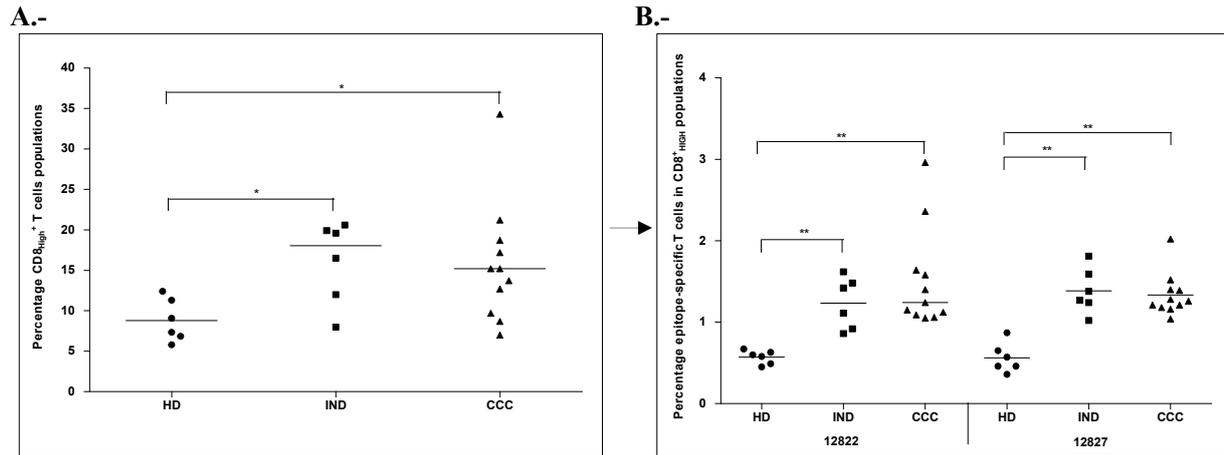


Fig. 3.- CD8⁺ and CD8⁺ peptide-specific T cells populations. Cells subpopulations were determined by flow cytometry in 5 healthy donors (HD), 5 patients with the indeterminate form (IND) and 11 patients with the cardiac form (CCC). Horizontal lines on each group represent the median and interquartile range. Statistically significant differences are indicated by *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 respectively. A.- CD8⁺ T cells percentage on each population B. CD8^{high} T Cell percentage specific for the 12822 and 12827 peptides.

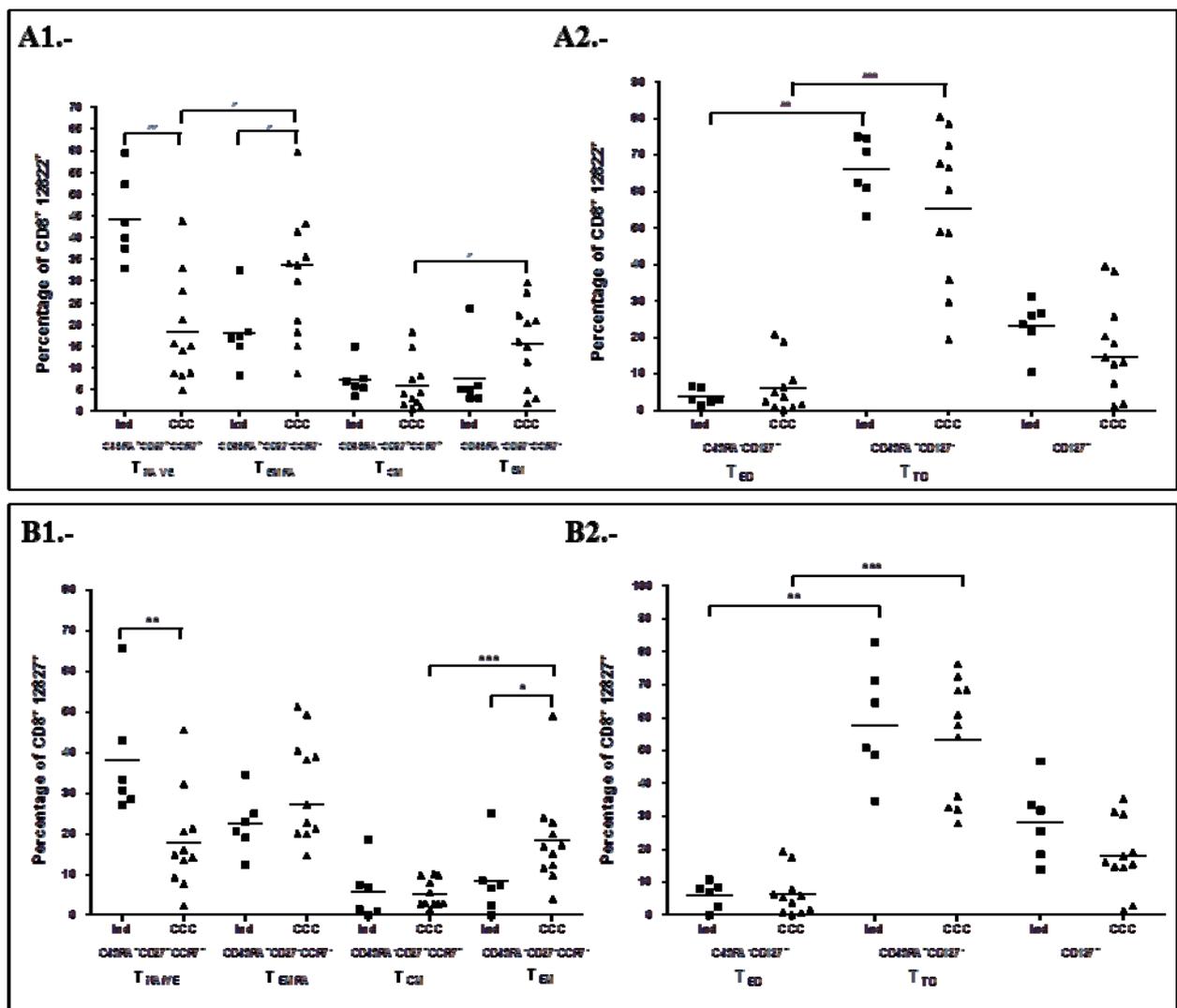


Fig. 4.- Phenotypic characterization of specific CD8⁺ T cells in patients with Chagas' disease. A.- 12822 peptide. B.- 12827 peptide. Cells from 6 indeterminate form patients (IND) and 11 patients with the cardiac form (CCC) were analyzed. According to the combination of antibodies used on the peptide-specific cells the CD8_{HIGH} subpopulations were divided in: T_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺): naive CD8⁺ T cells, T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁺): effector memory CD8⁺ T cells RA⁺, T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺): central memory CD8⁺ T cells, T_{EM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁺): effector memory CD8⁺ T cells, T_{ED} (CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺): early differentiated CD8⁺ T cells, T_{TD} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻): terminally differentiated CD8⁺ T cells. Statistically significant differences are indicated *P≤0.05, **P≤0.01, ***P≤0.001.

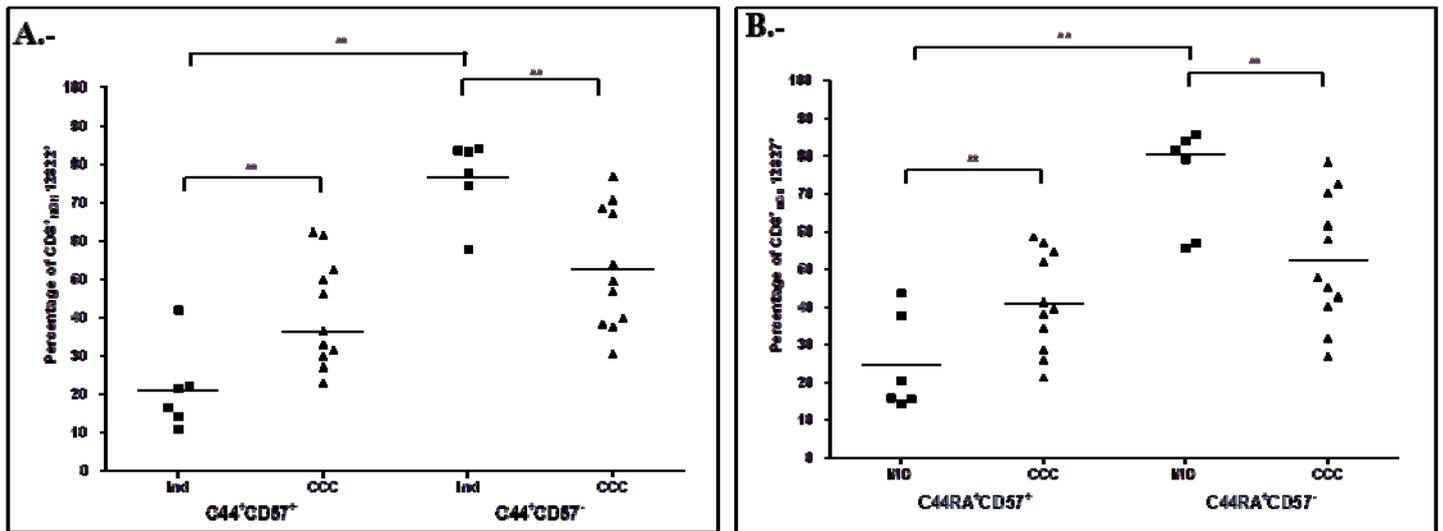


Fig. 5.- CD4⁺ CD57⁺ and CD4⁺ CD57⁻ cell populations specific for the 12822 (A) and 12827 (B) peptides derived from the TCcA-2 from *T. cruzi*. Cells from 6 patients in indeterminate stage (IND) and 11 patients with the cardiac form (CCC) were analyzed.

REFERENCES

- Abel, L. C., L. K. Iwai, et al. (2005). "T cell epitope characterization in tandemly repetitive Trypanosoma cruzi B13 protein." *Microbes Infect* 7(11-12): 1184-1195.
- Albareda, M. C., S. A. Laucella, et al. (2006). "Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients." *Int Immunol* 18(3): 465-471.
- Alvarez, M. G., M. Postan, et al. (2008). "HLA Class I-T Cell Epitopes from trans-Sialidase Proteins Reveal Functionally Distinct Subsets of CD8 T Cells in Chronic Chagas Disease." *PLoS Negl Trop Dis* 2(9): e288.
- Becker, T. C., E. J. Wherry, et al. (2002). "Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells." *J Exp Med* 195(12): 1541-1548.
- Bixby, L. M. and R. L. Tarleton (2008). "Stable CD8+ T cell memory during persistent Trypanosoma cruzi infection." *J Immunol* 181(4): 2644-2650.
- Britten, C. M., R. G. Meyer, et al. (2002). "The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays." *J Immunol Methods* 259(1-2): 95-110.
- Bustamante, J. M., L. M. Bixby, et al. (2008). "Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease." *Nat Med* 14(5): 542-550.
- Duranti, M., L. Camargo, et al. (2012). "Evidence for T Cell Help in the IgG Response against Tandemly Repetitive Trypanosoma cruzi B13 Protein in Chronic Chagas Disease Patients." *J Parasitol Res* 2012: 635873.
- Houghten, R. A. (1985). "General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(15): 5131-5135.
- Kuschnir, E., H. Sgammini, et al. (1985). "[Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy]." *Arq Bras Cardiol* 45(4): 249-256.
- Maranon, C., M. C. Thomas, et al. (2001). "The immunization of A2/K(b) 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* 38(4): 279-287.
- Masopust, D., S. M. Kaech, et al. (2004). "The role of programming in memory T-cell development." *Curr Opin Immunol* 16(2): 217-225.
- Pogue, R. R., J. Eron, et al. (1995). "Amino-terminal alteration of the HLA-A*0201-restricted human immunodeficiency virus pol peptide increases complex stability and in vitro immunogenicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(18): 8166-8170.
- Sabbaj, S., S. L. Heath, et al. (2007). "Functionally competent antigen-specific CD127(hi) memory CD8+ T cells are preserved only in HIV-infected individuals receiving early treatment." *J Infect Dis* 195(1): 108-117.
- Schluns, K. S., W. C. Kieper, et al. (2000). "Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo." *Nat Immunol* 1(5): 426-432.
- Sette, A., A. Vitiello, et al. (1994). "The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes." *J Immunol* 153(12): 5586-5592.
- Tarleton, R. L. and J. W. Curran (2012). "Is Chagas disease really the "new HIV/AIDS of the Americas"?" *PLoS Negl Trop Dis* 6(10): e1861.

- Tarleton, R. L., J. Sun, et al. (1994). "Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease." Infect Immun **62**(5): 1820-1829.
- Thomas, M. C., A. Fernandez-Villegas, et al. (2012). "Characterization of an immunodominant antigenic epitope from *Trypanosoma cruzi* as a biomarker of chronic Chagas' disease pathology." Clin Vaccine Immunol **19**(2): 167-173.
- WHO, W. H. O. (2012). "Chagas disease (American trypanosomiasis) - fact sheet (revised in August 2012)." Wkly Epidemiol Rec **87**(51/52): 519-522.

4.2.- Actividad de la enzima Indolamina-2.3-dioxigenasa (IDO) en pacientes con enfermedad de Chagas y modificaciones post-tratamiento con Benznidazol.

4.2.1.- Benznidazole treatment reduces the induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) enzymatic activity in Chagas disease symptomatic patients.

Marañón, C, Egui, A; Fernández-Villegas, A; Carrilero, B; Thomas, MC; Segovia, M; López, MC.

Parasite Immunol, 2013; 35(5-6): 180-187.

Impact Factor: 2.208 (17/35 Q2).

PMID: 23473453.



Benznidazole treatment reduces the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enzymatic activity in Chagas disease symptomatic patients

C. MARAÑÓN,^{1,2} A. EGUI,¹ A. FERNÁNDEZ-VILLEGAS,¹ B. CARRILERO,³ M. C. THOMAS,¹ M. SEGOVIA^{3,4} & M. C. LÓPEZ¹

¹Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPBLN- CSIC), Granada, Spain, ²GENYO Centro de Genómica e Investigación Oncológica, Pfizer/Universidad de Granada/Junta de Andalucía, Granada, Spain, ³Unidad Regional de Medicina Tropical, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain, ⁴Departamento de Genética y Microbiología, Universidad de Murcia, Spain

SUMMARY

The enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for the regulation of immune responses in pro-tolerogenic antigen-presenting cell. To address the profile of immune responses associated with Chagas disease, we measured IDO activity of peripheral blood mononuclear cells from 168 chronic patients and 13 healthy donors. We found that IDO activity was increased in patients with Chagas disease when compared with controls. Moreover, the IDO activity of patients with Chagas disease in the symptomatic chronic phase, involving cardiac or digestive alterations, was higher than that detected in asymptomatic patients and correlated with the severity of the symptoms. Furthermore, benznidazole treatment induced a long-lasting decrease in IDO activity in symptomatic patients, reaching levels comparable with those of healthy donors. These results suggest that a pro-tolerogenic state is associated with the severity of Chagas disease and that benznidazole treatment is a valuable tool for breaking the parasite-driven immune tolerance in the symptomatic chronic phase of Chagas disease.

Keywords benznidazole, Chagas disease, IDO activity, tolerance

INTRODUCTION

American trypanosomiasis or Chagas disease is affecting 8–15 million people in Latin America, with an incidence of 40 000 annual new cases and 12 500 annual deaths. *Trypanosoma cruzi* parasite is transmitted to humans mainly by an invertebrate vector, but also congenitally and by blood transfusion, organ transplantation and ingestion of contaminated food and drinks. The acute phase is short-lasting after the infection, and most infected patients recover an apparently healthy state, although they remain seropositive, entering into the chronic indeterminate stage of the sickness. A fraction of the patients remain in this stage indefinitely; however, several years after entering into the chronic phase, a third of the infected individuals develop lesions in the heart, oesophagus and colon or in the peripheral nervous system (1). The detection of the parasite in the affected tissues of symptomatic patients with Chagas disease suggests that the persistence of the parasites in these tissues is important for Chagas disease pathogenesis (2). Nowadays, two drugs are available for Chagas disease treatment (benznidazole and nifurtimox), both being reasonably effective in the acute and post-acute phases (1). However, data regarding the benefits of these treatments in the chronic phase are contradictory and this issue is now under consideration (3). In the Spanish Health System, every patient with Chagas disease receives aetiological treatment regardless of the presence of symptoms, as recommended by Viotti *et al.* (4).

Several studies performed in animal model have established that parasite-specific antibodies and CD8⁺ T-cell responses are needed to reach a protective immunity

Correspondence: Concepción Marañón Lizana, GENYO (Centro de Genómica e Investigación Oncológica, Pfizer/Universidad de Granada/Junta de Andalucía) Avenida de la Ilustración, 114, PTS 18016, Granada, Spain (e-mail: concepcion.maranon@genyo.es).

Received: 27 November 2012

Accepted for publication: 18 February 2013

against *T. cruzi* infection (5). A strong parasite-specific IFN γ response is correlated with a mild clinical form of Chagas disease in chronic patients (6), and the cytotoxic activity of parasite-specific CD8⁺ T lymphocytes has been reported in chronic patients in the indeterminate phase of the disease but not in symptomatic chronic patients (7), indicating that a strong and well-oriented immune response is required to control the proliferation of the parasites, thus preventing the tissue damage characteristic of Chagas disease.

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) plays a key role in the immunity/tolerance balance. IDO is initially expressed as a proenzyme in innate immune cells (8) and catalyzes the degradation of the essential amino acid L-tryptophan to N-formyl kynurenine. Thus, IDO is the first and rate-limiting step in the tryptophan catabolism through the kynurenine pathway, causing the depletion of tryptophan, which is accompanied by the production of immunoregulatory kynurenines. This results in a halted growth of microbes, and the suppression of T-cell proliferation and functions. Therefore, tryptophan catabolism by IDO functions as a counteracting pathway, preventing the induction of excessive or undesired responses as allergy or autoimmunity (9). Accordingly, IDO activity is characteristic of a pro-tolerogenic profile of antigen-presenting cells (APC), mainly monocytes and dendritic cells (10). A high circulating IDO activity has been reported in HIV (11) and sepsis (12,13) patients. In both cases, the measured activity was correlated with severity markers and, moreover, the aetiological treatment significantly decreased the IDO activity values. In the mouse model, it has been described that the IDO-mediated production of kynurenines leads to the control of the acute experimental *T. cruzi* infection (14). Moreover, an early 3-hydroxy kynurenine treatment showed to be effective in reducing the cardiac lesions in the experimental infection with *T. cruzi* (15). In this study, we studied whether higher tryptophan degradation by IDO activity could be detected during human chronic *T. cruzi* infection and investigated the effect of the treatment with the antiparasite drug benznidazole in the IDO activity.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Thirteen healthy donors and 168 adult chronic patients with Chagas disease were selected at Hospital Virgen de la Arrixaca in Murcia, Spain. All patients were diagnosed for Chagas disease using two conventional serological tests (Chagas ELISA, Ortho Clinical Diagnosis and Immunofluor Chagas, Biocientífica, Argentina), following WHO criteria. The patients and healthy donors were Spain-residents coming from endemic areas and, as a result, with no possibility of re-infection during the study. Complementary tests were carried out to determine the clinical status of the patients. Accordingly, patients were diagnosed as indeterminate (IND, $n = 43$) if they were asymptomatic. Symptomatic patients were diagnosed as suffering cardiac (CARD, $n = 99$), digestive (DIG, $n = 8$) or mixed (CARD/DIG, $n = 19$) Chagas disease forms, depending of the associated pathologies observed (Table 1). CARD patients were further stratified using the Kuschnir score (16). None of the patients had ever received any antiparasite treatment before. *T. cruzi*-specific PCR tests were carried out using genomic DNA purified from peripheral blood from 103 patients before the beginning of the aetiological treatment as described in (17). The protocols were approved by the Ethical Committees of Hospital Virgen de la Arrixaca and Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Spain). A signed informed consent was obtained from all individuals prior to their inclusion in the study.

Biological samples

Blood samples were collected in EDTA before the treatment (t0) and every three months from the beginning of benznidazole treatment (5 mg/kg/day for 60 days) during a year (t1–t4). One hundred and seventeen patients (out of 168) could be monitored after treatment. The blood was kept and transported O/N following the recommendations of (18), in specific containers maintaining a sample tem-

Table 1 Study population

| Characteristics | Study group | | | | |
|------------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| | HD | IND | CCC | DIG | CARD/DIG |
| <i>n</i> | 13 | 43 | 99 | 8 | 18 |
| Age (median, range) | 32 (25–56) | 33 (18–61) | 37 (19–58) | 40 (26–54) | 41 (24–54) |
| Female (<i>n</i> , %) | 10 (77%) | 27 (63%) | 60 (61%) | 7 (88%) | 11 (61%) |

perature between 22 and 30°C until the analysis. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were purified within 24 h by sedimentation over Ficoll–Hypaque and used immediately to test IDO activity. For all patients, the results of the serologic tests used for the diagnosis of Chagas disease were available, but not those corresponding to the exact ELISA signal/cut-off (S/C) values for five of them. Consequently, they could not be included in the correlation studies.

Cell lines and stimulation

The monocytic line THP-1 was cultured in RPMI supplemented with 10% calf fetal serum.

To monitor the enzyme activity, 5×10^5 fresh PBMC were washed and resuspended in 500 μ L Hanks buffer (HBSS) containing 100 μ M L-tryptophan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated for 24 h at 37°C and 5% CO₂ as in (8). Supernatants were harvested and tested for IDO activity. When indicated, the cells were treated with 500 U/mL IFN γ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) to induce IDO activity. The IDO-specific inhibitor 1-methyl-L-tryptophan (L-MT, Sigma-Aldrich) was added at a final concentration of 100 μ M during the incubation time as in (19).

Determination of IDO enzymatic activity

Indoleamine 2,3-dioxygenase activity was quantified through the measure of kynurenines in the supernatant of THP-1 cells and PBMC using a modification of the spectrophotometric assay described in (20). Briefly, 125 μ L of the supernatants or known concentrations of kynurenine (0–100 μ M) were mixed with 25 μ L of 50% trichloroacetic acid in duplicates in a U-bottom 96-well plate. After 1 h at 4°C, and 15 min at 65°C, plates were centrifuged at 1250 $\times g$ and 125 μ L of supernatants were mixed with one volume of Ehrlich reagent (100 mg of p-dimethylaminobenzaldehyde in 5 mL of glacial acetic acid, Sigma-Aldrich) in a flat-bottom 96-well plate. Optical density was measured at 492 nm.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS statistical package version 15.0 (Spss Inc., Chicago Illinois). The Mann–Whitney *U*-test was used to carry out comparisons between groups of patients. Additionally, Jonckheere–Terpstra rank test was used to correlate IDO activity with progressive grades of severity of Chagas disease (21). The Wilcoxon test was used to study the post-treatment evolution of IDO activity. Spearman correlation analysis was

used to evaluate the correlation between IDO activity and parasite-specific serum reactivity measured by ELISA signal/cut-off (S/C) ratios. Statistical significance was assigned at a value of $P \leq 0.05$.

RESULTS

Increased IDO activity in PBMC of patients with Chagas disease is associated with the symptomatic stages of the disease

We wondered whether a chronic *T. cruzi* infection is associated with a pro-tolerogenic profile of APC. Therefore, we adapted the colorimetric Ehrlich determination of kynurenine described in (8) to set up an easy and reliable test for IDO activity determination in a high number of PBMC samples. As shown in Figure 1a, this assay allows the detection of the induction of IDO activity by IFN γ in THP-1 cells, and indeed, this activity was sensitive to the IDO-specific inhibitor L-MT, in agreement with the results described (22). Moreover, an IFN γ -mediated induction of IDO activity was also observed in fresh PBMC of healthy donors, while IDO activity could not be detected without stimulation (Figure 1b). The IFN γ -induced IDO activity was also observed when the blood samples were kept overnight in storage conditions mimicking those of the shipping from Hospital Virgen de la Arrixaca to the Instituto de Parasitología López Neyra, following the recommendations of (18). As shown in Figure 1c, even if the detected activity was lower at 24 h, we found an excellent correlation with the values obtained just after the obtention of the sample. Therefore, our experimental set-up allows a simple and fast evaluation of IDO activity in PBMC.

As shown in Figure 2a, kynurenine concentration was increased in the supernatants of PBMC of patients with Chagas disease (CHA) when compared with that observed in PBMC of healthy donors (HD). Moreover, IDO activity was well correlated with the serological reactivity, reflected by the ELISA signal/cut-off ratio values employed to establish Chagas disease diagnosis using the Ortho ELISA kit ($r = 0.287$, $P < 0.001$, Spearman correlation test, $n = 163$, Figure 2b). Nevertheless, IDO activity was not associated with a *T. cruzi*-positive PCR test ($P = 0.287$ Mann–Whitney test, $n = 103$, Figure 2c).

The cohort of patients under study comprises a heterogeneous group of individuals with diverse clinical manifestations, from indeterminate patients who have no apparent clinical disturbances (IND) to those with different degrees of Chagas-associated cardiopathies and/or digestive disorders (Table 1). Thus, to investigate the involvement of IDO activity in the physiopathology of Chagas disease, we took into account the finding of Chagas-associated pathologies

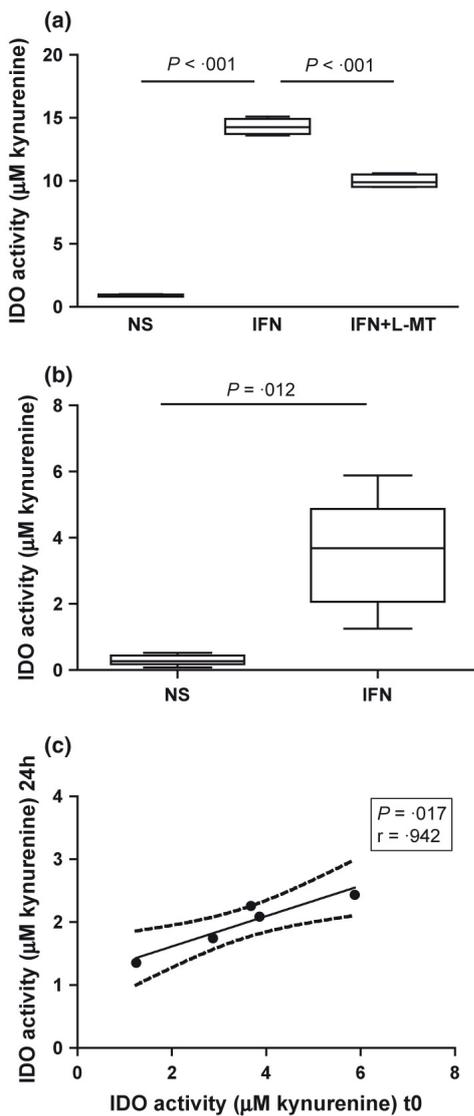


Figure 1 Validation of a colorimetric method for the determination of IDO activity in PBMC using the Ehrlich reagent. (a) THP-1 cells were tested for IDO activity in quadruplicates as described in the Materials and Methods section. NS, no stimulated; IFN, stimulated with 500 U/mL rhIFN γ , IFN+L-MT, IFN-stimulated cells in the presence of the IDO-specific inhibitor L-MT. Data are representative of two experiments, (b) PBMC of 5 healthy donors were stimulated with IFN γ and tested for IDO activity as before. (c) Blood samples of five healthy donors were immediately processed after bleeding or kept under controlled conditions as detailed in Materials and Methods for 24 h. IDO activity tests were carried out in both conditions and the results were compared. Middle line: median. Whiskers, interquartile range (25–75 percentiles). *P* values for Mann–Witney *U*-tests (a and b) or correlation values in a Spearman test (c) are shown.

in the clinical records of the patients. As shown in Figure 3a, IDO activity values were only significantly higher in symptomatic (SYMPT), but not in asymptomatic (IND)

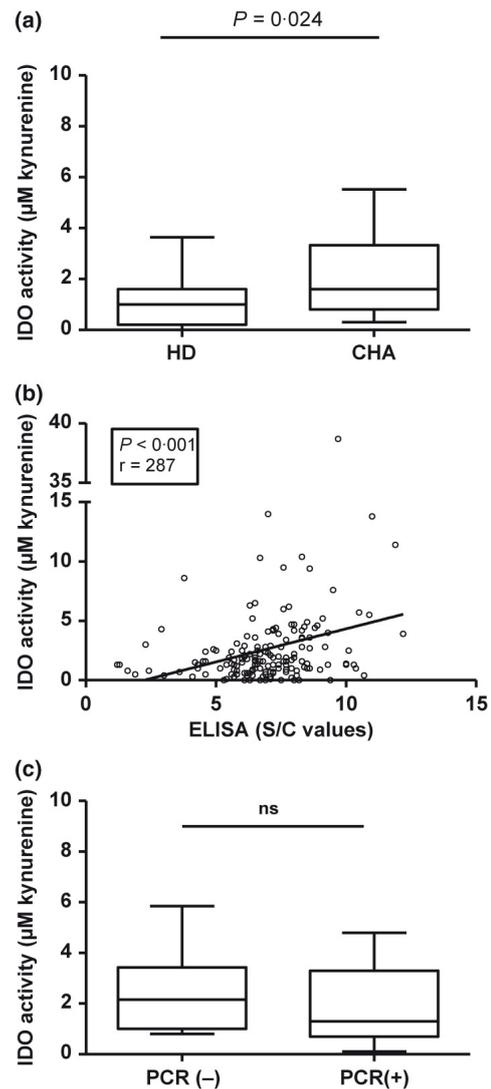


Figure 2 High IDO activity in PBMC of patients with Chagas disease. (a) Kynurenine concentration in the supernatants of PBMC purified from 13 healthy donors (HD) and 168 patients with Chagas disease (CHA). (b) Correlation of IDO activity and ELISA signal/cut-off (S/C) values ($n = 163$). (c) IDO activity in PBMC from patients showing negative (PCR(-), $n = 46$) or positive (PCR(+), $n = 57$) results in *T. cruzi*-specific PCR detection tests.

patients, when compared to HD. Indeed, the measured kynurenine concentration was significantly higher in SYMPT patients than in IND, indicating that a pro-tolerogenic state of APC is associated with the severity of chronic Chagas disease, in agree with a significant Jonckheere–Terpstra trend test ($P = 0.002$). To know whether a high IDO activity is related with a particular Chagas-associated pathology, the patients were further stratified according to their cardiac (CARD), digestive (DIG) or mixed (CARD/DIG) symptoms. As shown in Figure 3b, the IDO activity was significantly higher in PBMC from patients with Chagas disease

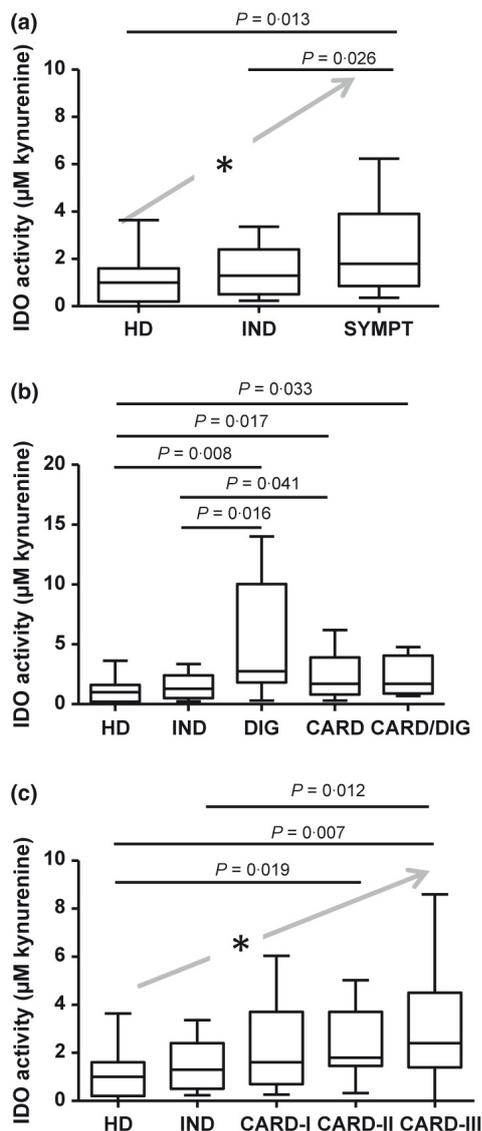


Figure 3 (a) IDO activity was measured in PBMC of 13 healthy donors (HD), 43 indeterminate (IND) and 125 symptomatic (SYMPT) patients with Chagas disease. (b) Comparison of IDO activity in PBMC of 13 healthy donors (HD), 43 indeterminate patients (IND), and Chagas disease patients with different clinical manifestations: 8 with digestive disorders (DIG), 99 with chagasic cardiopathies (CARD), and 18 with both digestive and cardiac involvement (CARD/DIG). (c) Chagas chronic cardiopathy patients were stratified according to the severity of their symptoms using Kuschnir classification (CARD-I, 67 patients; CARD-II, 13 patients; CARD-III, 19 patients). Only significant P values ($P < 0.05$) using Mann–Witney U -test between pairs of groups are noted in the graph. * $P < 0.05$ in Jonckheere–Terpstra test for trends.

having either pathological cardiac or digestive manifestations compared with that detected in IND patients. Therefore IDO activity does not seem to be correlated with a specific tissue damage (cardiac or digestive), but with the

severity of the Chagas-associated symptoms. Moreover, a positive trend is observed, in the IDO activity of chronic patients with Chagas disease associated with the severity of the cardiac damage, as determined by the Kuschnir classification value ($P = 0.002$, Jonckheere–Terpstra test, HD to CARD-III, Figure 3c).

Decrease in IDO activity by benznidazole in symptomatic patients

To determine the effect of a 60-day course of benznidazole treatment, the IDO activity in the PBMC of patients with Chagas disease was followed up after the aetiological treatment, every three months during a year. As seen in Figure 4a, a significant IDO activity reduction was durably observed in patients with Chagas disease (CHA) from 9 months (t3 and t4) after the beginning of the treatment (t0) ($P = 0.011$ and $P = 0.001$ for t3 and t4, respectively, using a paired Wilcoxon's t -test). The IDO activity values at time points t3 and t4 are equivalent to those observed in healthy donors (t3 range [0–34], median 1.1; t4 range [0–9], median 0.7; HD range [0–4.8], median 1.0. The P values for Mann–Witney tests were 0.156 (t3 vs. HD) and 0.352 (t4 vs. HD)).

When the IDO activity data were analysed taking into consideration the stage of the disease of the treated patients, a statistically significant decrease was only observed in SYMPT patients (Figure 4b) at t2, t3 and t4. As expected, no statistically significant drop in the IDO activity was observed in IND patients (Figure 4c), whose IDO activity values were already similar to those of HD before treatment (Figure 3b, IND, vs. HD).

DISCUSSION

In this study, we describe for the first time a pro-tolerogenic profile in the APC of patients with Chagas disease, which correlates with the severity of the disease. A significantly high IDO activity was only detected in SYMPT patients with cardiac or digestive disorders but not in IND patients, which is likely a reflect of the profile of infiltrating APC in the infected tissues of chronic patients. Indeed, a positive relation was found between severity scores and IDO activity. Interestingly, it has been reported a high secretion of IL-10 and a low secretion of IL-12 by APC of monocyte-derived DC from patients with Chagas disease after stimulation with the *T. cruzi* heat shock protein of 70 KDa, TcHSP70 (23), as an indication of a pro-tolerogenic bias during the chronic phase of the natural infection.

A recent report suggested a correlation between *T. cruzi* persistence in affected tissues and the incidence of clinical symptoms (2). Moreover, it has been described that the

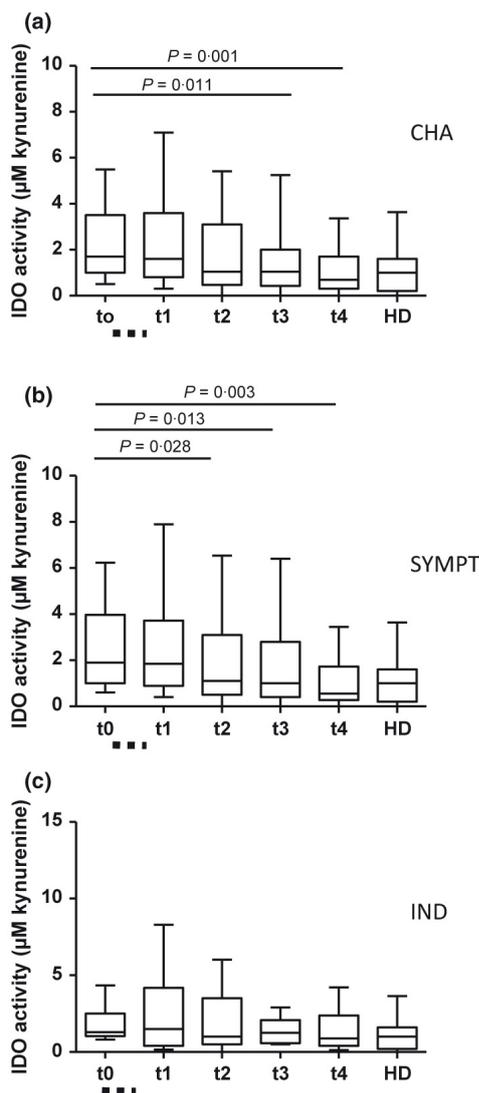


Figure 4 Benznidazole treatment is followed by a decrease in IDO activity. (a) IDO activity on PBMC of 13 healthy donors (HD), and 117 patients with Chagas (CHA) disease before treatment (t0), and 3, 6, 9 and 12 months after the beginning of benznidazole treatment (t1, t2, t3 and t4, respectively). The dotted line under the X-axis indicates the duration of benznidazole treatment. Patients with Chagas (CHA) disease were separated for analysis symptomatic (SYMPT, $n = 96$) and indeterminate (IND, $n = 21$). Only significant P values ($P < 0.05$) using a Wilcoxon paired test comparing different time points with t0 are noted in the graph. HD values are included in the graph as a reference.

parasite can induce IDO activity in murine macrophages *in vitro* as well as in the acute phase of the experimental infection (14), and that human dendritic cells express high levels of IDO in response to *Leishmania* spp (24). Accordingly, it has been reported the finding of a Treg activity in the lesions of patients of cutaneous leishmaniasis, and a correlation between the local expression of IDO

and FoxP3 (25). In addition, it has been described an IDO-mediated immune suppression in draining lymph nodes of mice infected with *Leishmania major* (26), suggesting that IDO is locally induced both in the infected tissues and in draining lymph nodes *in vivo*, generating a bias in the parasite-specific T-cell response. Therefore, IDO-inhibiting treatments should be valuable to reach a protective local antiparasite immunity.

Up to date, only a few studies have been carried out regarding the neuropsychological consequences of *T. cruzi* infection, reflecting little interest in studying these aspects. However, some recent reports have shown a high incidence of depressive symptoms in patients with Chagas disease (27), which have been preferentially associated with digestive symptoms independently of quality of life parameters (28). IDO has been directly connected with depressive-like behaviours in experimental *T. cruzi* infection (29), as IDO activity decrease tryptophan concentration in the brain, and thus, its availability for the synthesis of serotonin, a neurotransmitter that is necessary for the normal mood state (30). An IDO-mediated depressive syndrome has also been described in the experimental model of infection with mycobacteria (31). The relationship between a high IDO activity in symptomatic patients and Chagas-associated depression is appealing and need further investigations.

In accordance with similar results in studies involving patients suffering other infectious diseases (11,12), the data presented here show that the benznidazole treatment is followed by a decrease of IDO activity (Figure 2), in line with the finding that benznidazole ameliorates the IDO-related depressive behaviour in infected animals (29). The overexpression of IDO during chronic infection and inflammation processes is mediated by a noncanonical NF- κ B pathway implicating the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the nuclear factor- κ B (NF- κ B), in an I κ B-kinase- α (IKK α)-dependent manner (32). Benznidazole inhibits the activation of NF- κ B and p38 MAPK activities (33), and hence, it has the potential to directly interfere with the parasite-induced IDO overexpression in treated patients. The patients with Chagas disease included in this study received benznidazole treatment for 60 days and had already finished the treatment at the time of the first follow-up (t1, 3 months), when a significant decrease in IDO activity had not been observed yet (Figure 4a and b, t1), and the drop in the IDO activity continued decreasing during the post-treatment follow-up period (one year). Therefore, it is not likely that the decline of the measured IDO activity is exclusively due to a direct effect of benznidazole on NF- κ B and p38 MAPK. On the contrary, it is probable that the progressive decrease in parasite load induced by the drug is changing the initial tolerogenic profile of the

infiltrating APC into stimulatory cells, which would be able to promote protective immune responses.

The persistence of the parasites in the tissues in the chronic infection might create a vicious circle, because the induction of IDO activity should prevent the induction of a strong and well-oriented local immune response. This suboptimal immune response would be unable to control the parasite in the tissues, which, in turn, should promote again IDO activity. Consequently, the stable diminution of IDO activity induced by benznidazole treatment in symptomatic patients with Chagas disease would provide an immunological evidence of the benefits of this treatment during the chronic phase of Chagas disease, as well as a biomarker for benznidazole efficacy in symptomatic patients with Chagas disease.

REFERENCES

- Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis* 2010; **10**: 556–570.
- Marcon GE, de Albuquerque DM, Batista AM, et al. Trypanosoma cruzi: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; **106**: 85–91.
- Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Morillo CA, et al. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J* 2008; **156**: 37–43.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 2006; **144**: 724–734.
- Padilla AM, Bustamante JM & Tarleton RL. CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. *Curr Opin Immunol* 2009; **21**: 385–390.
- Laucella SA, Postan M, Martin D, et al. Frequency of interferon- γ -producing T cells specific for Trypanosoma cruzi inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis* 2004; **189**: 909–918.
- Egui A, Thomas MC, Morell M, et al. Trypanosoma cruzi paraflagellar rod proteins 2 and 3 contain immunodominant CD8(+) T-cell epitopes that are recognized by cytotoxic T cells from Chagas disease patients. *Mol Immunol* 2012; **52**: 289–298.
- Braun D, Longman RS & Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* 2005; **106**: 2375–2381.
- Huang L, Baban B, Johnson BA 3rd & Mellor AL. Dendritic cells, indoleamine 2,3 dioxygenase and acquired immune privilege. *Int Rev Immunol* 2010; **29**: 133–155.
- Popov A & Schultze JL. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J Mol Med (Berl)* 2008; **86**: 145–160.
- Zangerle R, Widner B, Quirchmair G, Neurauter G, Sarcletti M & Fuchs D. Effective antiretroviral therapy reduces degradation of tryptophan in patients with HIV-1 infection. *Clin Immunol* 2002; **104**: 242–247.
- Darcy CJ, Davis JS, Woodberry T, et al. An observational cohort study of the kynurenine to tryptophan ratio in sepsis: association with impaired immune and microvascular function. *PLoS One* 2011; **6**: e21185.
- Tattevin P, Monnier D, Tribut O, et al. Enhanced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 2010; **201**: 956–966.
- Knubel CP, Martinez FF, Fretes RE, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against Trypanosoma cruzi. *Faseb J* 2010; **24**: 2689–2701.
- Knubel CP, Martinez FF, Acosta Rodriguez EV, et al. 3-Hydroxy kynurenine treatment controls T. cruzi replication and the inflammatory pathology preventing the clinical symptoms of chronic chagas disease. *PLoS One* 2011; **6**: e26550.
- Kuschnir E, Sgammini H, Castro R, Evequoz C, Ledesma R & Brunetto J. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arq Bras Cardiol* 1985; **45**: 249–256.
- Murcia L, Carrilero B, Munoz MJ, Iborra MA & Segovia M. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1759–1764.
- Olson WC, Smolkin ME, Farris EM, et al. Shipping blood to a central laboratory in multicenter clinical trials: effect of ambient temperature on specimen temperature, and effects of temperature on mononuclear cell yield, viability and immunologic function. *J Transl Med* 2011; **9**: 26.
- Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res* 2007; **67**: 792–801.
- Kumar S, Malachowski WP, DuHadaway JB, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is the anticancer target for a novel series of potent naphthoquinone-based inhibitors. *J Med Chem* 2008; **51**: 1706–1718.
- Bewick V, Cheek L & Ball J. Statistics review 10: further nonparametric methods. *Crit Care* 2004; **8**: 196–199.
- Lopez AS, Alegre E, Diaz A, Mugueta C & Gonzalez A. Bimodal effect of nitric oxide in the enzymatic activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in human monocytic cells. *Immunol Lett* 2006; **106**: 163–171.
- Cuellar A, Santander SP, Thomas Mdel C, et al. Monocyte-derived dendritic cells from chagasic patients vs healthy donors secrete differential levels of IL-10 and IL-12 when stimulated with a protein fragment of Trypanosoma cruzi heat-shock protein-70. *Immunol Cell Biol* 2008; **86**: 255–260.
- Donovan MJ, Tripathi V, Favila MA, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induced by Leishmania infection of human dendritic cells. *Parasite Immunol* 2012; **34**: 464–472.
- Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, et al. Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to Leishmania guyanensis. *Infect Immun* 2009; **77**: 1465–1474.
- Makala LH, Baban B, Lemos H, et al. Leishmania major attenuates host immunity by stimulating local indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *J Infect Dis* 2011; **203**: 715–725.

- 27 Jackson Y, Castillo S, Hammond P, *et al.* Metabolic, mental health, behavioural and socioeconomic characteristics of migrants with Chagas disease in a non-endemic country. *Trop Med Int Health* 2012; **17**: 595–603.
- 28 Ozaki Y, Guariento ME & de Almeida EA. Quality of life and depressive symptoms in Chagas disease patients. *Qual Life Res* 2011; **20**: 133–138.
- 29 Vilar-Pereira G, Silva AA, Pereira IR, *et al.* Trypanosoma cruzi-induced depressive-like behavior is independent of meningoencephalitis but responsive to parasiticide and TNF-targeted therapeutic interventions. *Brain Behav Immun* 2012; **26**: 1136–1149.
- 30 Myint AM, Schwarz MJ, Steinbusch HW & Leonard BE. Neuropsychiatric disorders related to interferon and interleukins treatment. *Metab Brain Dis* 2009; **24**: 55–68.
- 31 O'Connor JC, Andre C, Wang Y, *et al.* Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Neurosci* 2009; **29**: 4200–4209.
- 32 Puccetti P & Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 817–823.
- 33 Manarin R, Pascutti MF, Ruffino JP, *et al.* Benznidazole blocks NF-kappaB activation but not AP-1 through inhibition of IKK. *Mol Immunol* 2010; **47**: 2485–2491.

4.3.- Evaluación inmunológica del efecto del tratamiento con Benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica asintomática y en fase crónica con sintomatología cardíaca.

4.3.1.- Respuesta funcional de linfocitos T CD8⁺ de pacientes con enfermedad de Chagas, tratados con benznidazol, a péptidos contenidos en específicas proteínas de *T. cruzi*.

Con el fin de evaluar si el tratamiento con benznidazol modula la funcionalidad de los linfocitos T CD8⁺ específicos de antígenos de *T. cruzi*, fue monitorizada la actividad citotóxica y capacidad secretora de citoquinas pro y anti-inflamatorias en células mononucleares de pacientes con enfermedad de Chagas (IND n=7 y CCC n=14) antes y tras el tratamiento con dicha droga. Así, las células mononucleares de cada uno de los pacientes ensayados fueron recolectadas previo al tratamiento con benznidazol y tras 12- 30 meses post-tratamiento, e incubadas con 1µM de específicos péptidos contenidos en las proteínas HSP70 (HSP70₂₁₀₋₂₁₈), PFR2 (PFR2₄₄₉₋₄₅₇), PFR3 (PFR3₄₂₈₋₄₃₆) y TcCA-2 (12822 y 12827). Los péptidos a ensayo fueron seleccionados en base a sus características de inmunodominancia en cuanto a la activación de una respuesta citotóxica antígeno-específica (ver resultados de apartados 4.1.1, 4.1.2 y 4.1.3). Igualmente fue incluido el péptido K1 contenido en la proteína KMP11 de *T. cruzi* para el cual, estudios previos del laboratorio mostraron que se trata de un epítotope T CD8⁺ el cual es procesado y presentado en el contexto de la infección natural por *T. cruzi* (Diez, Lopez et al. 2006).

Los resultados obtenidos muestran (Tabla R3.1) para todos los péptidos ensayados cambios significativos en la funcionalidad de las mencionadas células tras el tratamiento con benznidazol *versus* aquella observada pre-tratamiento. Interesantemente, las células procedentes de los pacientes en fase IND de la enfermedad y tratados con benznidazol muestran, en general, una disminución del nivel de secreción de las citoquinas IL-6, IFN- γ y TNF- α y frecuencia de linfocitos T citotóxicos productores de GzB con respecto a aquella observada previo al tratamiento. En presencia de los péptidos HSP70₂₁₀₋₂₁₈ y PFR2₄₄₉₋₄₅₇ esta disminución es estadísticamente significativa para los niveles de secreción de IFN- γ ($p \leq 0,05$).

En los pacientes en fase cardiaca de la enfermedad (CCC), al igual que en pacientes en fase IND el tratamiento con benznidazol da lugar a la disminución tanto del nivel de secreción de citoquinas como de frecuencia de linfocitos T secretores de GzB, relativa a aquella observada en dichos pacientes pre-tratamiento. Sin embargo, interesantemente, las células de algunos pacientes CCC para los cuales no se había detectado respuesta (secreción de citoquinas y/o GzB) pre-tratamiento muestran tras el

tratamiento secreción de al menos alguna de las citoquinas determinadas y/o secreción de GzB. Así, post- tratamiento las células de los mencionados pacientes muestran niveles detectables de expresión de citoquinas en 6 pacientes tras estimulación con los péptidos (frente HSP70₂₁₀₋₂₁₈; PFR3₄₂₈₋₄₃₆ TcCA-2 12822, en 5 pacientes frente TcCA-2 12827, en 3 pacientes frente al péptido PFR2₄₄₉₋₄₅₇ y en 2 pacientes frente K1.

Tabla R3.1.- Secreción de citoquinas (IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ y TNF α) y actividad citotóxica (número de células productoras GzB) en células mononucleares de pacientes con enfermedad de Chagas estimuladas con péptidos contenidos en proteínas de *T. cruzi* pre y post tratamiento con benznidazol.

| Peptido | Fase | Paciente | IL-6 (pg/mL) | | IL-10 (pg/mL) | | IL-17 (pg/mL) | | IFN- γ (pg/mL) | | TNF- α (pg/mL) | | GzB (SEFCX10 ⁶ PBMC) | | |
|-------------------------|--------|------------|--------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|-----------------------|----------|-----------------------|-----------|---------------------------------|----------|-----|
| | | | Pre Tto | Post Tto | Pre Tto | Post Tto | Pre Tto | Post Tto | Pre Tto | Post Tto | Pre Tto | Post Tto | Pre Tto | Post Tto | |
| HSP70 ₂₁₀₋₈ | IND | 411388 | 103 | 101 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 8 | -1 | 0 | 0 | 13 | |
| | | 411562 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 2 | 0 | 254 | 0 | |
| | | 411265 | 711 (57) | -80 (17) | 0 (17) | 0 | 1 | 0 | 194 (57) | -8 (17) | 82 (37) | -26 (17) | -20 (47) | 27 | |
| | | 411283 | 82 (71%) | 25 (14%) | 0 (14%) | 0 | 0 | -9 | 23 (71%) | -1 (14%) | 18 (43%) | 5 (14%) | 120 (57%) | 8 | |
| | | 411345 | -10 | -57 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -13 | 0 | 25 | 7 | -7 | |
| | | 499539 | 1329 | -3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 174 | 0 | 56 | 0 | 117 | 13 | |
| | | 411139 | -147 | -97 | 0 | 0 | 0 | 0 | -24 | -22 | 0 | 0 | 707 | -13 | |
| | | CCC I | 499861 | 0 | 5 | 0 | -1 | 0 | 0 | 12 | -6 | 0 | -2 | 22 | 6 |
| | | CCC I | 499088 | 0 | 35 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | -2 | 0 | -3 | 20 | -7 |
| | | CCC I | 499698 | 9 | 67 | 0 | 0 | 0 | 0 | -11 | 8 | 0 | 13 | 3 | 22 |
| CCC I | 499346 | -26 | -163 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -35 | -11 | -30 | 10 | 8 | | |
| CCC I | 411811 | 0 | -3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 9 | 0 | -2 | -86 | 0 | | |
| CCC I | 499676 | -977 (1/2) | 2 (1/2) | -1 | 0 (1/2) | 4 (1/2) | 7 (1/2) | -67 | 9 (2/12) | -2 (1/2) | 0 (2/12) | 20 (2/12) | 33 | | |
| CCC I | 411393 | 0 (8%) | -1 (8%) | 0 | 0 (8%) | 0 (8%) | 0 (8%) | 4 | 2 (17%) | 0 (8%) | 0 (17%) | -7 (17%) | 10 | | |
| CCC I | 411456 | 35 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | -8 | 13 | -13 | 0 | -153 | | |
| CCC II | 411142 | -6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | -18 | 6 | 47 | 3 | | |
| CCC III | 411797 | 17 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 3 | -7 | 0 | | |
| CCC III | 499807 | -1463 | 294 | -2 | 2 | 0 | 0 | -94 | 31 | -64 | -29 | -20 | -7 | | |
| CCC III | 411630 | -2 | -85 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -10 | 80 | -3 | | |
| PFR2 ₄₄₉₋₄₅₇ | IND | 411388 | 18 | 408 | 0 | -14 | 0 | 11 | 7 | 5 | -8 | 14 | 0 | 7 | |
| | | 411562 | 20 (3/5) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 (4/5) | 0 | 6 (3/5) | 0 | 437 (2/5) | 10 | |
| | | 411265 | 1474 (60%) | -76 | 1 | 0 | 1 | 0 | 158 (80%) | -4 | 181 (60%) | -33 | -13 (40%) | 7 | |
| | | 411283 | 89 | 12 | 0 | 0 | 0 | 1 | 20 | 4 | 43 | 7 | 80 | 42 | |
| | | 411345 | -10 | -251 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -49 | 0 | 1 | -8 | -40 | |
| | | CCC I | 499861 | 0 | 14 | 0 | -1 | 0 | 0 | 12 | 1 | 0 | -2 | 22 | 17 |
| | | CCC I | 499088 | 0 | 838 | 0 | 1 | 0 | 6 | 2 | 32 | 0 | 19 | 0 | -17 |
| | | CCC I | 499698 | 17 | -7 | 0 | 0 | 0 | 0 | -19 | 0 | -4 | 0 | -3 | -11 |
| | | CCC I | 499346 | 0 | -172 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -11 | -4 | -30 | 3 | 4 |
| | | CCC I | 411811 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -2 | 0 | -1 | -76 | -5 |
| CCC I | 499676 | 2041 | 0 | 7 | 0 | 8 | 0 | 64 | 0 | 6 | 0 | 73 | -7 | | |
| CCC I | 411393 | 0 (1/4) | 9 (2/4) | 0 (1/4) | 0 | 8 (2/4) | 10 (2/4) | 8 (1/4) | 7 (1/4) | 0 (1/4) | 1 | 10 (1/4) | 17 (1/4) | | |
| CCC I | 411456 | 43 (7%) | -38 (14%) | 0 (7%) | 0 | 0 (14%) | 0 (14%) | 3 (7%) | -14 (7%) | 28 (7%) | -32 | 33 (7%) | -200 (7%) | | |
| CCC II | 411142 | -2 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | -12 | -1 | 47 | 3 | | |
| CCC III | 499770 | 2 | 0 | 0 | 0 | -16 | 0 | -16 | 0 | 0 | 0 | -10 | 23 | | |
| CCC III | 411797 | 12 | -8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 3 | -6 | 0 | -13 | | |
| CCC III | 499807 | -747 | 92 | -2 | 1 | 0 | 0 | -55 | 10 | -44 | 2 | -63 | 37 | | |
| CCC III | 411509 | 0 | -8 | 0 | 0 | -3 | 0 | -1 | -13 | 0 | -1 | 13 | -38 | | |
| CCC III | 411630 | -4 | -107 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -10 | 0 | -3 | | |
| PFR3 ₄₂₈₋₄₃₆ | IND | 411388 | 41 | -262 | 0 | -11 | 0 | 21 | 5 | 1 | 3 | -10 | 7 | 3 | |
| | | 411562 | 0 (2/4) | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (2/4) | 0 | 0 (2/4) | 2 | 30 (1/4) | 27 (1/4) | |
| | | 411265 | 669 (50%) | 45 | 0 | 0 | 1 | 0 | 190 (50%) | 6 | 66 (50%) | -15 | -120 (25%) | 33 (25%) | |
| | | 411283 | 141 | 24 | 0 | 0 | 0 | -1 | 21 | 1 | 28 | 9 | 160 | 58 | |
| | | CCC I | 499861 | 0 | -5 | 0 | -1 | 0 | 0 | 8 | -10 | 0 | -2 | 6 | 17 |
| | | CCC I | 499088 | 0 | 118 | 0 | 0 | 6 | 4 | 2 | 13 | 0 | 1 | -7 | -30 |
| | | CCC I | 499698 | 1333 | -4 | 5 | 0 | 0 | 0 | 121 | 4 | 10 | 0 | 43 | 11 |
| | | CCC I | 499346 | 19 | 1866 | 0 | 7 | 0 | 0 | 11 | -15 | 0 | 439 | 3 | -4 |
| | | CCC I | 411811 | 0 | -2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 4 | 0 | -1 | -81 | -5 |
| | | CCC I | 499676 | 1314 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 26 | 0 | 9 | 0 | 23 | -27 |
| CCC I | 411393 | 0 (4/4) | 1 (1/4) | 0 (1/4) | 0 (1/4) | 4 (2/4) | 8 (5/4) | 6 (3/4) | 10 (2/4) | 0 (2/4) | 0 (1/4) | 7 (1/4) | 7 (1/4) | | |
| CCC I | 411456 | 36 (29%) | -31 (7%) | 0 (7%) | 0 (7%) | 0 (14%) | 0 (14%) | 7 (14%) | -9 (14%) | 10 (14%) | -18 (7%) | 7 (7%) | -140 (7%) | | |
| CCC III | 499770 | 16 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 4 | 4 | 1 | 0 | -7 | -20 | | |
| CCC III | 411797 | 25 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 3 | 1 | 27 | -13 | | |
| CCC II | 411142 | 1 | 89 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | -18 | 4 | 100 | -10 | | |
| CCC III | 499807 | -982 | 2372 | -2 | 6 | 0 | 0 | -69 | 186 | -50 | 80 | -60 | 57 | | |
| CCC III | 411509 | 0 | -10 | 0 | 0 | -6 | 10 | -6 | -6 | 0 | -2 | 7 | -13 | | |
| CCC III | 411630 | 3 | 47 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 4 | 3 | -2 | 0 | 7 | | |

| Peptido | Fase | Paciente | IL-6 (pg/mL) ^a | | IL-10 (pg/mL) ^a | | IL-17 (pg/mL) ^a | | IFN- γ (pg/mL) ^a | | TNF- α (pg/mL) ^a | | GzB (SFCX10 ⁶ PBMC) ^b | | |
|---------|---------|----------|---------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|---|-----------------------|-------|
| | | | Pre Tto ^c | Post Tto ^c | Pre Tto ^c | Post Tto ^c | Pre Tto ^c | Post Tto ^c | Pre Tto ^c | Post Tto ^c | Pre Tto ^c | Post Tto ^c | Pre Tto ^c | Post Tto ^c | |
| IND | IND | 411388 | 21 | -157 | 0 | 9 | 0 | 27 | 1 | 0 | -10 | -18 | 0 | 0 | |
| | | 411562 | 0 | 2/4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2/4 | 0 | 1/4 | 3 | 1/4 | |
| | | 411265 | 1641 | (50%) | 43 | 1 | 0 | 2 | 0 | 204 | (50%) | 2 | 160 | (50%) | |
| | | 411283 | 80 | 14 | 0 | 0 | 0 | 3 | 12 | 2 | 35 | 19 | 47 | 125 | |
| | 12822 | CCC I | 499861 | 0 | -5 | 0 | -1 | 0 | 0 | 8 | -6 | 0 | -2 | 83 | -6 |
| | | CCC I | 499088 | 0 | 200 | 0 | 0 | 0 | 5 | 2 | 12 | 0 | 5 | 50 | -3 |
| | | CCC I | 499698 | 73 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | 13 | 6 |
| | | CCC I | 499346 | -67 | -172 | 0 | 0 | 0 | 0 | -8 | -11 | -12 | -30 | -7 | 0 |
| | | CCC I | 411811 | 0 | -2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | -1 | -67 | 10 |
| | | CCC I | 499676 | 1679 | 5 | 3 | 0 | 0 | 7 | 26 | 8 | 13 | 0 | 33 | 27 |
| | | CCC I | 411393 | 0 | 2/4 | 0 | 0 | 7 | 1/4 | 5 | 4/4 | 10 | 1/4 | 7 | 3/4 |
| | | CCC I | 411456 | 46 | (14%) | -2 | 0 | 0 | (7%) | 0 | (29%) | 4 | (7%) | -15 | (21%) |
| 12827 | CCC II | 411142 | -3 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 8 | -20 | 2 | 80 | 13 | |
| | CCC III | 499770 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | -2 | 8 | -11 | 1 | 13 | -7 | |
| | CCC III | 411797 | 31 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 5 | 7 | 15 | 7 | 20 | |
| | CCC III | 499807 | -1218 | 345 | -2 | 0 | 0 | 0 | -83 | 36 | -53 | 1 | -30 | -23 | |
| | CCC III | 411509 | -4 | -21 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | -11 | -5 | -1 | 50 | -25 | |
| | CCC III | 411630 | 1 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 10 | 13 | |
| | IND | 411388 | 32 | -95 | 0 | -7 | 0 | -7 | 1 | -3 | -11 | -6 | 13 | 3 | |
| | | 411562 | 0 | 2/4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2/4 | 0 | 2/4 | 0 | 3 | |
| | | 411265 | 1127 | (50%) | 114 | 0 | 0 | 1 | 0 | 81 | (50%) | -1 | 83 | (50%) | |
| | | 411283 | 55 | 24 | 0 | 0 | 0 | 3 | 15 | 1 | 26 | 5 | -20 | 100 | |
| | 12827 | CCC I | 499861 | 0 | 54 | 0 | -1 | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 | -2 | -6 | |
| | | CCC I | 499088 | 1 | 57 | 0 | 0 | 0 | 8 | -4 | 6 | 0 | 5 | 33 | |
| CCC I | | 499698 | 45 | 8 | 0 | 1 | 0 | 0 | -4 | 18 | -4 | 2 | 7 | | |
| CCC I | | 499346 | 2327 | 1084 | 4 | 0 | 6 | 0 | 340 | 29 | 230 | -30 | 7 | | |
| CCC I | | 411811 | 0 | -2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 7 | 0 | -1 | -81 | | |
| CCC I | | 499676 | 404 | 2 | 0 | 0 | 7 | 0 | -9 | 3 | -18 | 0 | 57 | | |
| CCC I | | 411393 | 0 | 3/4 | 2 | 3/4 | 0 | 1/4 | 0 | 2/4 | 0 | 1/4 | 0 | 1/4 | |
| CCC I | | 411456 | 18 | (21%) | -10 | (21%) | 0 | (7%) | 0 | (14%) | 0 | (21%) | 3 | (14%) | |
| CCC II | | 411142 | -4 | 303 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 38 | -15 | 21 | 53 | | |
| CCC III | | 499770 | 49 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 6 | 16 | 0 | 0 | | |
| CCC III | | 411797 | 9 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | -5 | 3 | 12 | 27 | -13 | | |
| CCC III | | 499807 | -849 | 149 | -2 | 0 | 0 | 0 | -62 | 39 | -44 | 19 | -43 | | |
| CCC III | 411509 | -5 | -17 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | -11 | -4 | -1 | 25 | | | |
| CCC III | 411630 | 4 | -33 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -19 | | | |
| KI | IND | 411388 | 1 | -4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 | 7 | | |
| | | 411562 | 44 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 0 | 4 | 0 | 427 | | |
| | | 411265 | 1578 | 2/6 | 218 | 1 | 0 | 1 | 0 | 182 | 1/6 | 16 | 184 | 1/6 | |
| | | 411345 | -10 | (33%) | -155 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | (17%) | -49 | 0 | (17%) | |
| | | 499539 | -9 | -3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 53 | |
| | | 411139 | -64 | -60 | 0 | 0 | 0 | 0 | -19 | -25 | 1 | 20 | 87 | -13 | |
| | CCC I | 499861 | 0 | -6 | 0 | -1 | 0 | 0 | 8 | -3 | 0 | -2 | 11 | 6 | |
| | | 499088 | 0 | 88 | 0 | 0 | 0 | 0 | -2 | -3 | 0 | 4 | 77 | -23 | |
| | | 499698 | -3 | -5 | 0 | 0 | 0 | 0 | -21 | -4 | -3 | 0 | 7 | -11 | |
| | | 499346 | -102 | 1411 | 0 | 3 | 0 | 0 | -15 | 99 | -14 | -2 | 7 | 17 | |
| | | 411811 | 0 | -2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | -2 | 0 | -1 | -76 | -5 | |
| | | 499676 | 2041 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 55 | 4 | 8 | 1 | 40 | 0 | |
| CCC I | 411393 | 0 | 5 | 1/3 | 0 | 1/3 | 0 | 0 | 1/3 | 0 | 1/3 | 13 | 3/3 | | |
| CCC II | 411142 | -2 | -3 | (8%) | 0 | (8%) | 0 | 1 | (8%) | 0 | (8%) | 80 | (15%) | | |
| CCC III | 411797 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | -5 | 0 | 1 | 1 | 34 | 0 | | |
| CCC III | 499770 | 0 | 0 | 0 | 0 | -7 | 0 | -10 | 3 | 0 | 0 | -13 | -27 | | |
| CCC III | 499807 | -1100 | 103 | -2 | 0 | 0 | 0 | -73 | 2 | -51 | 32 | -40 | 7 | | |
| CCC III | 411509 | 1 | 83 | 0 | 0 | -10 | 0 | -5 | -3 | 0 | 5 | 20 | 0 | | |
| CCC III | 411630 | 6 | 70 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 2 | 2 | 0 | 7 | 27 | | |

^a La respuesta de citoquinas fue considerada positiva cuando la secreción en células estimuladas es al menos tres veces mayor al valor obtenido en PBMC con medio de cultivo y ≥ 15 pg/mL para IL-6, ≥ 2 pg/mL para IL-10 e IL-17 y 5 pg/mL para IFN- γ y TNF- α .

^b La actividad citotóxica (GzB) fue considerada positiva cuando el número de spots fue al menos dos veces mayor al número de spots obtenidos en el control con medio de cultivo e igual o mayor de 35 spots para HSP70₂₁₀₋₂₁₈, 12822 y 12827 e igual o mayor de 50 para PFR2₄₄₉₋₄₅₇ y PFR3₄₂₈₋₄₃₆.

^c Se indica el número y porcentaje de pacientes respondedores con respecto al total de pacientes ensayados.

Las respuestas consideradas como positivas son indicadas en rojo.

4.3.2.- Caracterización del fenotipo de memoria, diferenciación y senescencia de linfocitos T CD8⁺ específicos de péptidos contenidos en las proteínas HSP70, PFR2, PFR3, TcCA-2 y KMP11 pre y post tratamiento con Benznidazol.

Demostrada la capacidad de activación linfocitaria por parte de cada uno de los péptidos contenidos en las proteínas HSP70, PFR2, PFR3, TcCA-2 y KMP11 (sección de resultados 4.1.1, 4.1.2 y 4.1.3), resultó interesante caracterizar en PBMC de pacientes con enfermedad de Chagas, tanto en fase crónica indeterminada (IND) como en fase crónica cardíaca (CCC) el fenotipo de memoria, diferenciación y senescencia de los linfocitos TCD8 específicos de aquellos péptidos más inmunogénicos de cada una de las citadas proteínas (HSP70₂₁₀₋₂₁₈ (HSP70), PFR2₄₄₉₋₄₅₇ (PFR2), PFR3₄₂₈₋₄₃₆ (PFR3), 12822, 12827 (TcCA-2) y K1 (KMP11)). Dicha caracterización fenotípica se llevó a cabo tanto en condiciones pre tratamiento como post-tratamiento con el fin de evaluar las modulaciones fenotípicas inducidas por el tratamiento con Benznidazol.

Para ello células mononucleares provenientes de pacientes con la enfermedad de Chagas en diferentes estadios de la enfermedad (IND (n=6), CCC (n=11)) e individuos sanos (HD n=6) fueron incubadas con dextrameros HLA-A*02:01 unidos a cada uno de los péptidos a ensayar, seguido de anticuerpos monoclonales frente a las proteínas de superficie CD8, CD45RA, CD27, CCR7, CD127, CD44 y CD57.

La caracterización de las poblaciones basadas en la combinación de anticuerpos para todos los péptidos ensayados se llevó a cabo según se observa en la figura 2 de la sección 4.1.3 (Egui et al manuscrito en preparación). Brevemente, dentro de la población de células linfocitarias, se observan diferentes niveles de expresión positivos para la molécula CD8, por lo que fueron definidas dos subpoblaciones según el nivel de fluorescencia en CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}. Dentro de cada una de estas subpoblaciones, fueron determinados en controles sanos y pacientes con enfermedad de Chagas, los linfocitos TCD8⁺ específicos de cada uno de los epítopes ensayados.

La combinación de anticuerpos frente a las moléculas de superficie CD45RA, CD27 y CCR7 en linfocitos T CD8 epítipo-específicos permitió definir las siguientes subpoblaciones: linfocitos T_{NAIVE} (CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺), linfocitos T CD8⁺ de memoria efectora totalmente diferenciados RA⁺ (T_{EMRA}, CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻), linfocitos T CD8⁺ de memoria efectora (T_{EM}, CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻) y linfocitos T CD8⁺ de memoria central (T_{CM}, CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺), igualmente combinando los

marcadores CD45RA-CD127 fueron definidas las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ en diferenciación temprana (T_{ED} CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺) y linfocitos T CD8⁺ totalmente diferenciados (T_{TD} CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻).

Por otro lado, se emplearon anticuerpos frente a las proteínas de superficie CD44 y CD57 ya que, la expresión de CD57 es asociada con un fenotipo de células senescentes, mientras que la expresión de la molécula CD44 se corresponde con un fenotipo de células de memoria efectoras, por lo que la combinación de ambos anticuerpos en linfocitos T CD8⁺ epítipo-específicos nos permitió definir las subpoblaciones CD8⁺CD44⁺CD57⁺ y CD8⁺CD44⁺CD57⁻ en linfocitos T CD8⁺ de memoria senescentes y linfocitos T CD8⁺ de memoria no senescentes respectivamente.

Las regiones positivas para cada uno de los anticuerpos evaluados, fueron establecidas basándonos en los isotipos control correspondiente para cada uno de los anticuerpos evaluados. En cuanto a los dextrámeros, fue empleado como referencia para establecer el punto de corte, tanto el control negativo (células sin marcaje), como el marcaje de las células mononucleares incubadas con todos los anticuerpos a evaluar exceptuando el dextrámero correspondiente.

Detección de linfocitos T CD8⁺ totales en donantes sanos y pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol.

Como se muestra en la figura R3.1 en las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ totales presentes en cada uno de los individuos ensayados, se observa que en controles sanos no hay diferencias entre las subpoblaciones CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}, contrariamente en pacientes con enfermedad de Chagas tanto en fase IND como en fase CCC se observa que el porcentaje de linfocitos TCD8_{HIGH} es significativamente superior que el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} (P≤0,001), así mismo se observa que el porcentaje de linfocitos T CD8_{LOW} es significativamente menor en pacientes IND comparado con individuos sanos (P≤0,05), mientras que la población T CD8_{HIGH} es significativamente superior en pacientes con enfermedad de Chagas independiente del grado de patología con respecto a individuos sanos (P≤0,05).

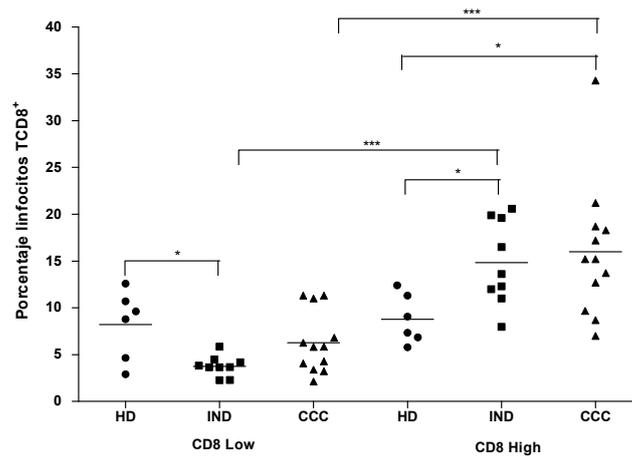


Figura R3.1.- Porcentaje de linfocitos T CD8 en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Chagas. Los resultados fueron determinados mediante citometría de flujo en 6 individuos sanos (HD), 9 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 12 pacientes con enfermedad de Chagas en fase cardiaca (CCC). Según el nivel de expresión de CD8 las poblaciones fueron clasificadas como CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de células TCD8⁺ determinada en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P<0,05, **P<0,01, ***P< 0,001.

Tras el tratamiento con Benznidazol en pacientes en fase IND y CCC, se mantiene un mayoritario porcentaje de linfocitos TCD8_{HIGH} con respecto a TCD8_{LOW} (P<0,001 y P<0,001), sin embargo, no se observan diferencias en el porcentaje de linfocitos TC8⁺ entre individuos sanos y pacientes con enfermedad de Chagas.

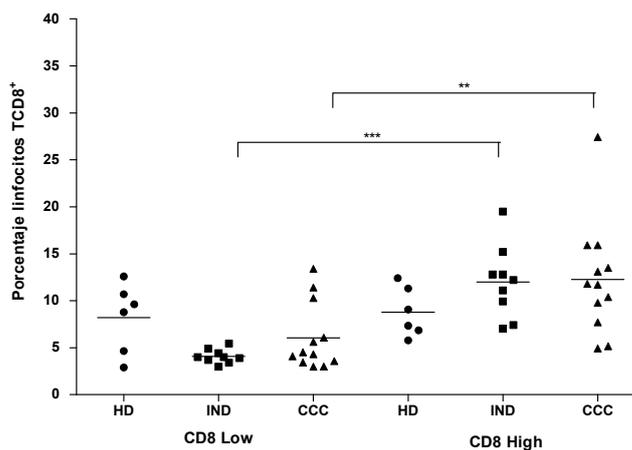


Figura R3.2.- Porcentaje de linfocitos T CD8 en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. Los resultados fueron determinados mediante citometría de flujo en 6 individuos sanos (HD), 9 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 12 pacientes con enfermedad de Chagas en fase cardiaca (CCC). Según el nivel de expresión de CD8 las poblaciones fueron clasificadas como CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de células TCD8⁺ determinada en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P<0,05, **P<0,01, ***P< 0,001.

4. 3.2.1.- Péptido HSP70₂₁₀₋₂₁₈ contenido en la proteína HSP70.

Caracterización fenotípica pre-tratamiento.

Dentro de las subpoblaciones CD8_{LOW} y CD8_{HIGH} fue determinado el porcentaje de linfocitos HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicos en individuos sanos (n=5) y en pacientes con enfermedad de Chagas (IND n=5 y CCC n=11). En la figura R3.3 se observa que, en pacientes y no en donantes sanos se detectan linfocitos TCD8 HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicos. En CD8_{LOW} este porcentaje de células epítipo-específicas es 4 veces mayor en IND (media de frecuencia 2,13) y CCC (media de frecuencia 2,06) con respecto a individuos sanos (media de frecuencia 0,58) ($P \leq 0,01$) mientras que, en CD8_{HIGH} aunque se observa un menor porcentaje de células específicas en pacientes con enfermedad de Chagas con respecto a CD8_{LOW} (IND, media de frecuencia 1,86 y CCC, media de frecuencia 1,48), este se mantiene 3 veces mayor en pacientes con respecto a donantes sanos (media de frecuencia 0,68) ($P \leq 0,01$). No encontrándose diferencias entre el porcentaje de linfocitos TCD8⁺ específicos en pacientes según el grado de patología (Figura R3. 3).

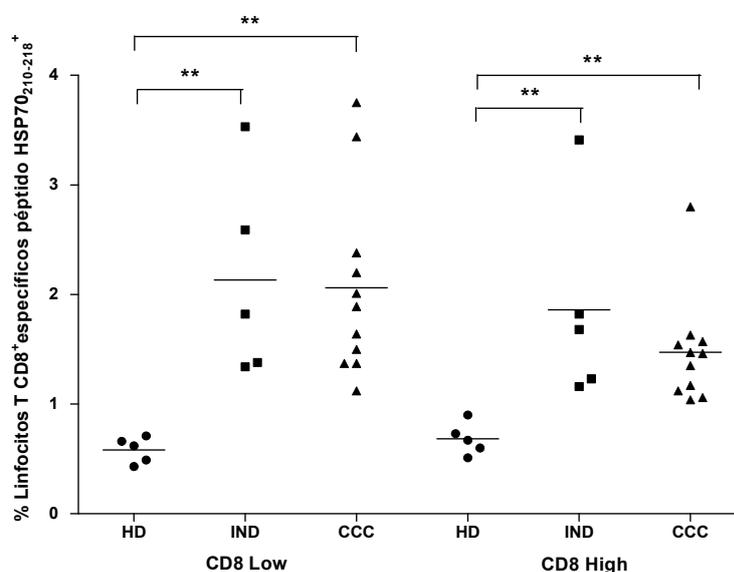


Figura R3.3.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítipo HSP70₂₁₀₋₂₁₈ en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Chagas. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo empleando dextrámeros del péptido HSP70₂₁₀₋₂₁₈. Los resultados muestran los porcentajes obtenidos en 5 individuos sanos (HD), 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). El porcentaje de linfocitos epítipo-específicos fue evaluado dentro de las poblaciones CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de células TCD8⁺-específicas en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Triples marcajes usando las moléculas CD45RA, CD27 y CCR7 permitieron la caracterización fenotípica de los linfocitos T CD8⁺ HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicos de pacientes con enfermedad de Chagas en distintas fases de la enfermedad (IND y CCC).

La figura R3.4 muestra que, en pacientes en fase IND y CCC, hay un mayor porcentaje de células T CD8_{LOW} HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicas que expresan un fenotipo de células efectoras totalmente diferenciadas CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻ (T_{EMRA}) con respecto a células T_{NAIVE} (CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺) (P≤0,05 y P≤0,001), así como un mayor porcentaje de células de memoria efectora (CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻ (T_{EM})) con respecto a linfocitos T de memoria central (CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺ (T_{CM})) (P≤0,01). Sin embargo, no se observan diferencias entre grupos de pacientes (IND y CCC) dentro de ninguna de las subpoblaciones caracterizadas. En células T CD8_{HIGH} se observa una mayor dispersión dentro de cada una de las subpoblaciones caracterizadas. En IND no hay diferencias significativas entre poblaciones, observándose en CD8_{HIGH} un mayor porcentaje de células T_{NAIVE} con respecto a los porcentajes detectados en CD8_{LOW}. En CCC al igual que lo observado en CD8_{LOW} se mantiene una mayor población de células T_{EMRA} y T_{EM} con respecto a T_{NAIVE} y T_{CM} respectivamente (P≤0,05 y P≤0,01).

El grado de diferenciación de los linfocitos T CD8 (LOW y HIGH) HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicos, se determinó combinando los marcadores CD45RA y CD127. El porcentaje de linfocitos T CD8⁺ epítotope-específicos totalmente diferenciados (T_{TD} CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻) en IND y CCC, fue significativamente superior (P≤0,01 y P≤0,001) con respecto a linfocitos T CD8⁺ en diferenciación temprana (T_{ED} CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺) (figura R3.4). En cuanto a la expresión de CD127 no se observan diferencias según el grado de patología.

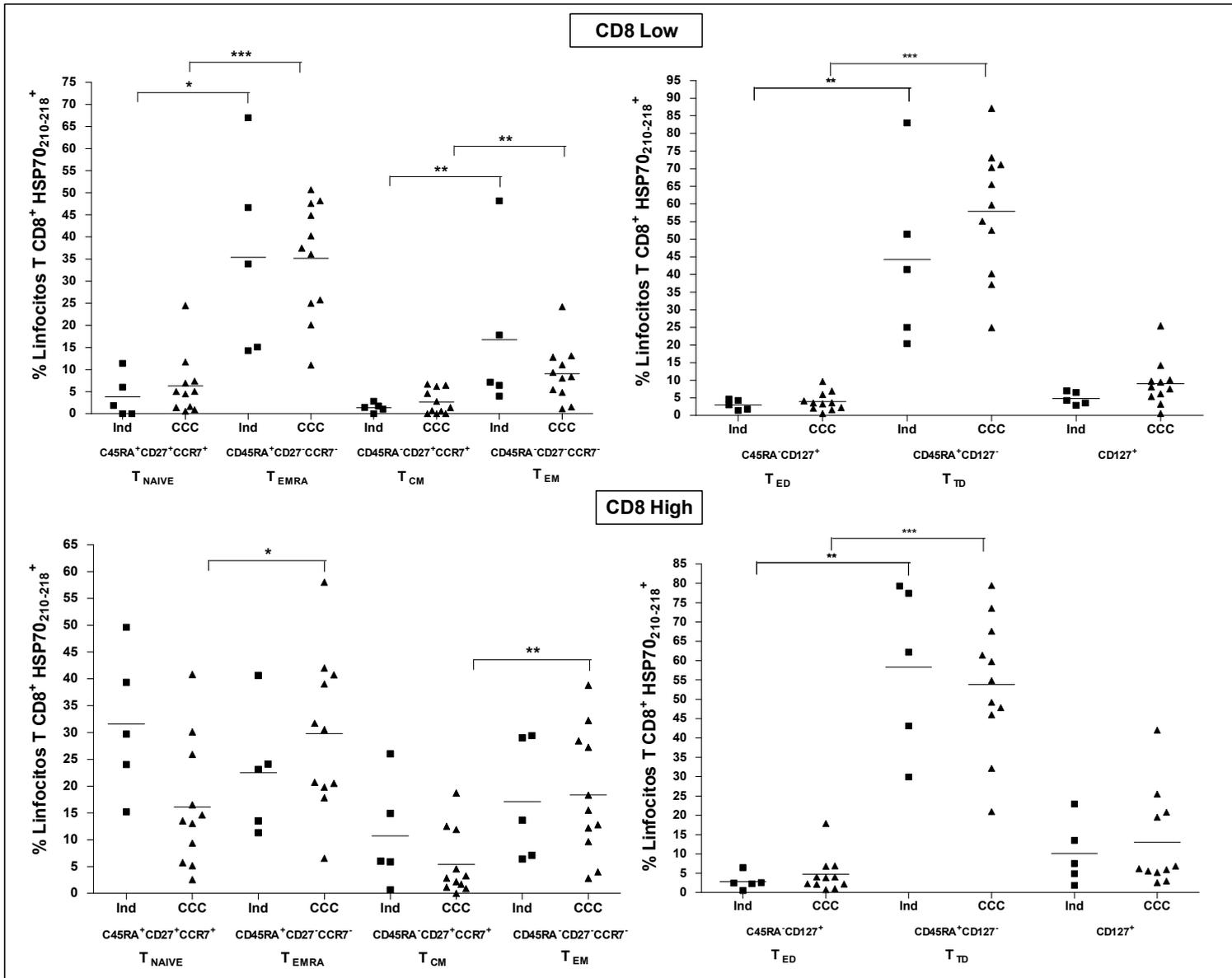


Figura R3.4.-Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítipo HSP70₂₁₀₋₂₁₈ en pacientes con enfermedad de Chagas. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo en linfocitos T CD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. Se muestran los resultados obtenidos en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardiaca (CCC). Combinando anticuerpos monoclonales frente a las moléculas de superficie CD45RA, CCR7, CD27, CD127 se establecen las siguientes subpoblaciones: T_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺), T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻) células de memoria efectora RA⁺, T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺) células de memoria central, T_{EM} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻) células de memoria efectora, T_{ED} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁺) células en diferenciación temprana, T_{TD} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻) células totalmente diferenciadas. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

En cuanto a la expresión de la molécula de superficie CD57, observamos que en CD8_{LOW} HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicos hay mayoritariamente un fenotipo de células CD44⁺CD57⁻ (linfocitos T CD8 de memoria no senescentes) frente a CD44⁺CD57⁺

($P \leq 0,01$ y $P \leq 0,05$) tanto en IND como en CCC, sin embargo esta población es mayoritaria en IND con respecto a CCC ($P \leq 0,05$). Interesantemente en linfocitos TCD8_{HIGH} en CCC se observa mayor porcentaje de células de memoria senescentes CD44⁺CD57⁺ respecto a pacientes en fase IND ($P \leq 0,05$) grupo en el cual se evidencia un mayor porcentaje de linfocitos T CD8⁺ no senescentes (CD44⁺CD57⁻) ($P \leq 0,01$) (figura R3.5).

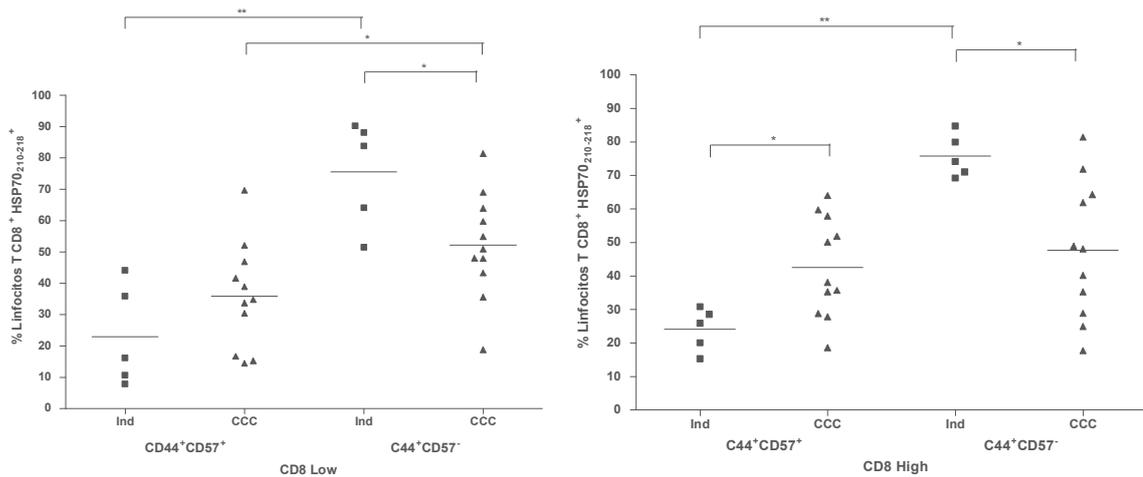


Figura R3.5.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo HSP70₂₁₀₋₂₁₈ en pacientes con enfermedad de Chagas. La expresión de las moléculas de superficie CD44 y CD57 fue determinada mediante citometría de flujo en linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. En las gráficas se representan el porcentaje de células HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicas dentro de las subpoblaciones CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻, en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardiaca (CCC). Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Caracterización fenotípica post-tratamiento con Benznidazol.

Tras el tratamiento con Benznidazol se observa que el porcentaje de células T CD8 HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicas se mantiene mayoritario en pacientes con enfermedad de Chagas (IND y CCC) con respecto a individuos sanos (Figura R3.6), tanto en la subpoblación CD8_{LOW} (IND, media de frecuencia de 1,72%, CCC, media de frecuencia 2,30 y HD, media de frecuencia 0,58) ($P \leq 0,01$) como en CD8_{HIGH} (IND, media de frecuencia de 1,68%, CCC, media de frecuencia 1,56 y HD, media de frecuencia 0,58) ($P \leq 0,05$ y $P \leq 0,01$). Dentro de la subpoblación CD8_{HIGH} se observa un paciente en fase IND que presenta un bajo porcentaje de linfocitos T CD8 HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicos a nivel de los porcentajes observados en individuos sanos (Figura R3.6).

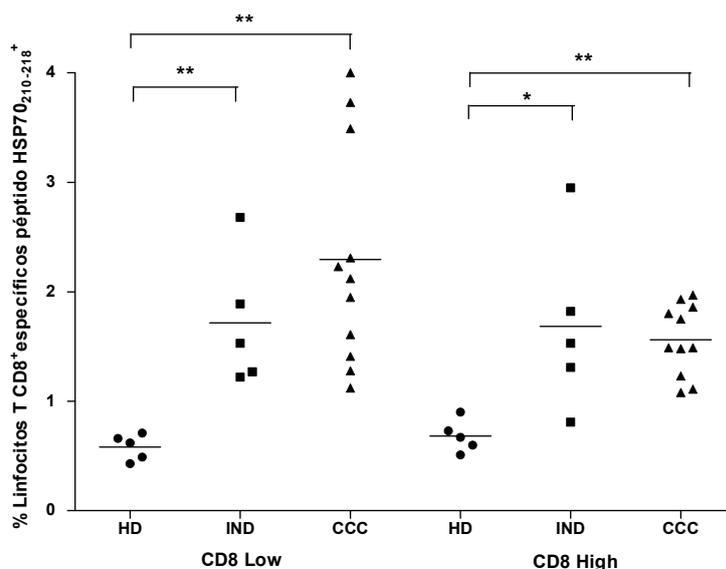


Figura R3.6.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítipo HSP70₂₁₀₋₂₁₈ en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo empleando dextrámeros del péptido HSP70₂₁₀₋₂₁₈. Los resultados muestran los porcentajes obtenidos en 5 individuos sanos (HD), 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardiaca (CCC). El porcentaje de linfocitos epítipo-específicos fue evaluado dentro de las poblaciones CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de células TCD8⁺-específicas en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

A nivel fenotípico tras el tratamiento con Benznidazol se observa que, en IND y CCC hay un mayor porcentaje de células T CD8_{LOW} HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicas que expresan un fenotipo de células efectoras totalmente diferenciadas CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻ (T_{EMRA}) con respecto a células T_{NAIVE} (CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺) (P≤0,05 y P≤0,001) (figura R3.7). Igualmente en CCC hay un mayor porcentaje de células de memoria efectoras (CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻ (T_{EM})) con respecto a linfocitos T de memoria central (CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺ (T_{CM})) (P≤0,05) (figura R3.7), en IND se observa tras el tratamiento con Benznidazol que no hay diferencias significativas entre las subpoblaciones T_{EM} y T_{CM} tal como se observaba pre-tratamiento (figura R3.4). Entre grupos de pacientes (IND y CCC) no se observan diferencias dentro de ninguna de las subpoblaciones caracterizadas.

En células T CD8_{HIGH} en IND hay un mayor porcentaje de células T_{NAIVE} con respecto a CCC (P≤0,05), así como con respecto a células T_{EMRA} (P≤0,01) (figura R3.7), por otro lado en CCC a diferencia de lo observado pre-tratamiento (figura R3.4) no hay diferencias significativas entre las poblaciones T_{NAIVE} y T_{EMRA} o T_{CM} y T_{EM}.

El cuanto al grado diferenciación linfocitario tanto en CD8_{LOW} y CD8_{HIGH} HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicos se observa una mayoritaria expresión de linfocitos T CD8⁺ péptido-específicos totalmente diferenciados (T_{TD} CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻) en IND y CCC (P≤0,01 y P≤0,001) con respecto a linfocitos T CD8⁺ en diferenciación temprana (T_{ED} CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺) (figura R3.7). En cuanto a la expresión de CD127 nuevamente no se observan diferencias según el grado de patología.

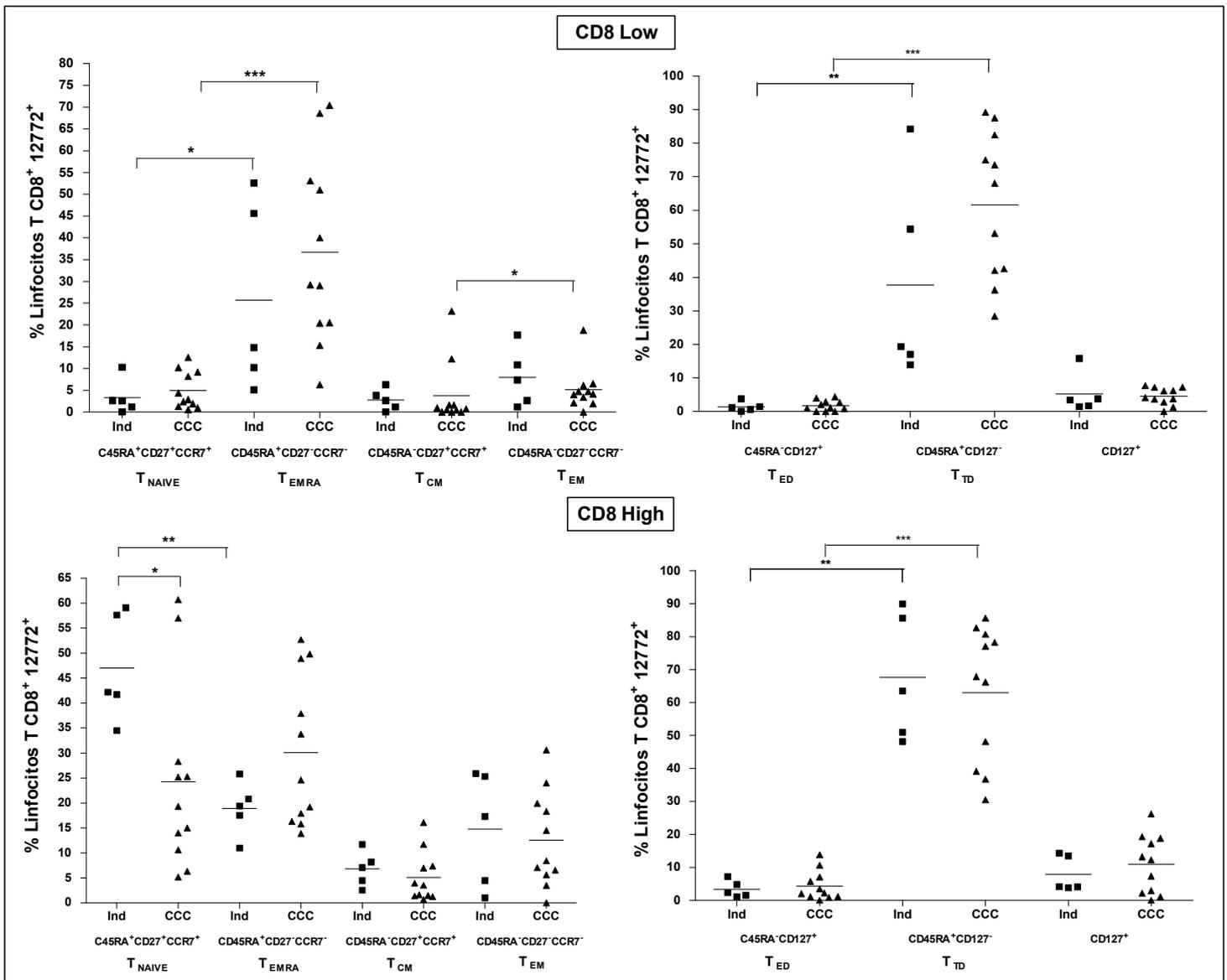


Figura R3.7.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítipo HSP70₂₁₀₋₂₁₈ en pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo en linfocitos T CD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. Se muestran los resultados obtenidos en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). Combinando anticuerpos monoclonales frente a las moléculas de superficie CD45RA, CCR7, CD27, CD127 se establecen las siguientes subpoblaciones: T_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁺ CCR7⁺), T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁻ CCR7⁻) células de memoria efectora RA⁺, T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺) células de memoria

central, T_{EM} ($CD8^+CD45RA^+CD27^+CCR7^+$) células de memoria efectora, T_{ED} ($CD8^+CD45RA^+CD127^+$) células en diferenciación temprana, T_{TD} ($CD8^+CD45RA^+CD127^-$) células totalmente diferenciadas. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,001$.

Tras el tratamiento con Benznidazol en CCC se observa en $CD8_{LOW}$ y no en $CD8_{HIGH}$ un mayor porcentaje de células con un fenotipo asociado a senescencia $CD44^+CD57^+$ ($P \leq 0,05$) con respecto a pacientes en fase IND, grupo en el cual se detecta tanto en $CD8_{LOW}$ como en $CD8_{HIGH}$ un mayor porcentaje de células $CD44^+CD57^-$ versus CCC ($P \leq 0,01$), sin embargo a nivel general en $CD8_{LOW}$ y en $CD8_{HIGH}$ tanto en IND como en CCC se tiene mayor porcentaje de células $CD44^+CD57^-$ con respecto a $CD44^+CD57^+$ ($P \leq 0,001$ y $P \leq 0,05$) (figura R3.8).

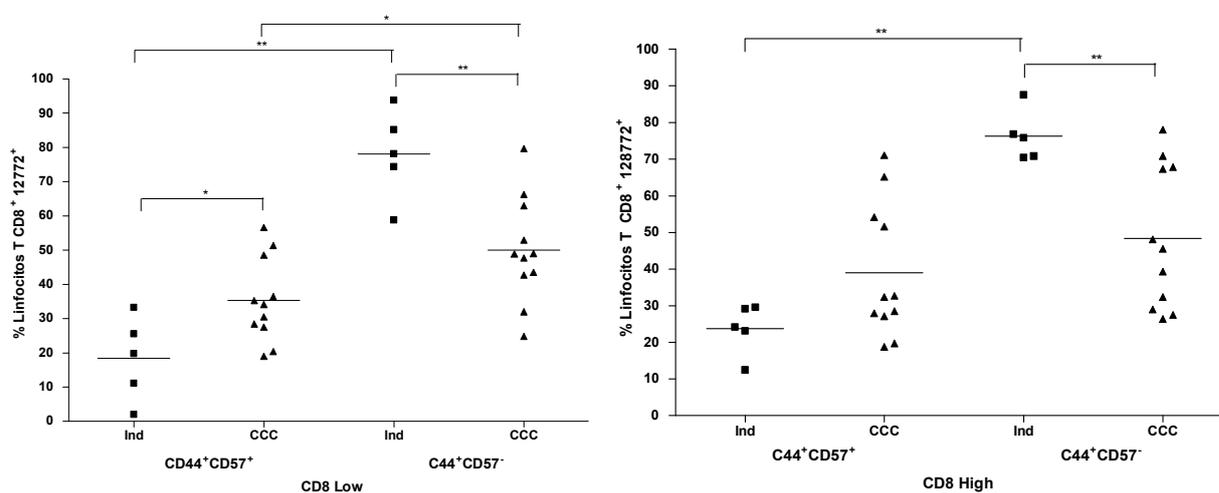


Figura R3.8.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo HSP70₂₁₀₋₂₁₈ en pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. La expresión de las moléculas de superficie CD44 y CD57 fue determinada mediante citometría de flujo en linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. En las gráficas se representan el porcentaje de células HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicas dentro de las subpoblaciones $CD44^+CD57^+$ y $CD44^+CD57^-$, en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,001$.

Modificaciones fenotípicas inducidas por el tratamiento con Benznidazol.

Los cambios inducidos tras el tratamiento con Benznidazol fueron observados comparando el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicos provenientes de pacientes con enfermedad de Chagas pre-tratamiento (resultados mostrados figura R3.3) y tras el tratamiento con el fármaco (resultados mostrados figura R3.6).

En la figura R39 se muestra el porcentaje de células HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicas por individuo pre y post-tratamiento con Benznidazol. Tanto en IND como en CCC, se observan cambios no significativos en el porcentaje de células específicas, no encontrándose una tendencia de disminución o aumento según el grado de patología. Interesantemente se encuentran pacientes tanto en fase IND como en CCC en los cuales no se observan las mismas modificaciones post tratamiento (disminución o aumento) dentro de las subpoblaciones CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}.

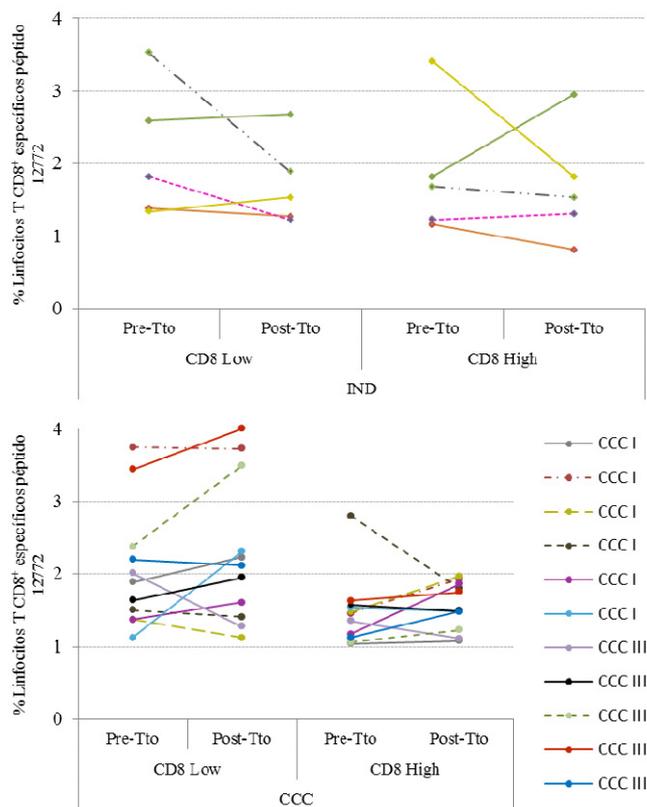


Figura R3.9.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítipo HSP70₂₁₀₋₂₁₈ en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. En la gráfica se muestra para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos determinados pre tratamiento (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤ 0,001.

El porcentaje de células HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicas que expresan cada una de las subpoblaciones celulares en condiciones pre-tratamiento (figura R3.4) se ve modificado tras el tratamiento con Benznidazol (figura R3.7) tal como muestra la figura R3.10. En CD8_{LOW} se observa una significativa disminución del porcentaje de células T_{ED} y CD127⁺ en pacientes en fase cardiaca de la enfermedad (P≤0,05). En la subpoblación CD8_{HIGH} pacientes en fase IND muestran un aumento de células T_{NAIVE} y T_{TD} (P≤0,05)

mientras que en CCC disminuye el porcentaje de células efectoras de memoria (T_{EM}) y aumenta el porcentaje de linfocitos específicos totalmente diferenciados (T_{TD}) ($P \leq 0,05$).

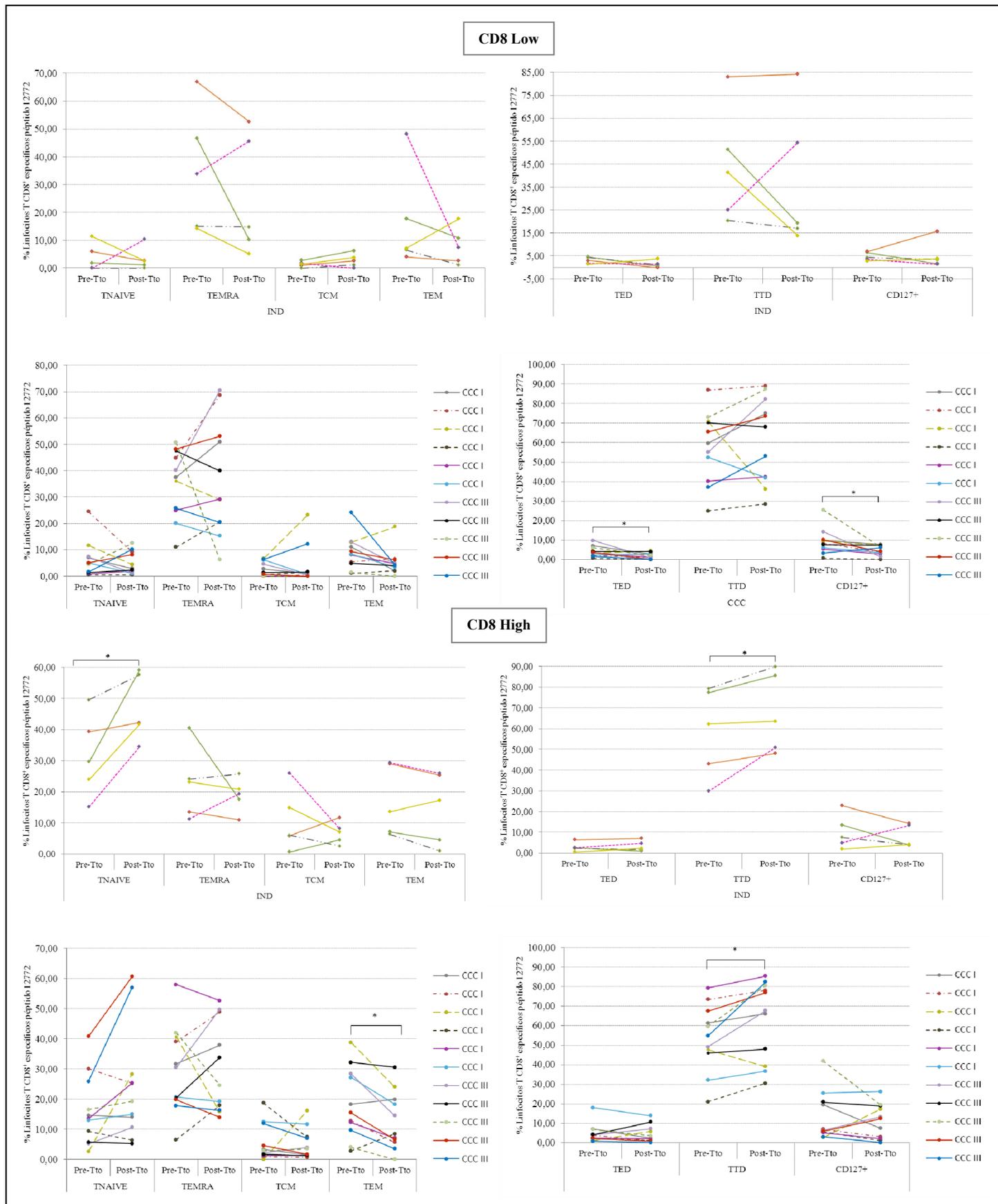


Figura R3.10.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítipo HSP70₂₁₀₋₂₁₈ en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. Se muestra para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas, el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos dentro de las subpoblaciones T_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁺ CCR7⁺), T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁻ CCR7⁻), T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺), T_{EM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻ CCR7⁻), T_{ED} (CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺), T_{TD} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻) y CD127⁺, en condiciones pre tratamiento (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤ 0,001.

El porcentaje de linfocitos T CD8⁺ HSP70₂₁₀₋₂₁₈-específicos que expresan la molécula de superficie CD57⁺ se ve modificado tras el tratamiento con Benznidazol (figura R3.11). Sin bien, estos cambios no son estadísticamente significativos por lo que no hay una tendencia según el grado de patología, en los pacientes en fase cardiaca se observa que en CD8_{LOW} en 7 de 11 (64%) pacientes y en CD8_{HIGH} en 5 de 11 pacientes (45%) hay un marcado incremento en la frecuencia de células senescentes (CD44⁺CD57⁺) con respecto a IND en los cuales en 2 de 5 (40%) y 3 de 5 pacientes (60%) en CD8_{LOW} y CD8_{HIGH} respectivamente se ve un menor incremento de células senescentes. Así mismo, en los pacientes en fase IND, se observa tanto en CD8_{LOW} como CD8_{HIGH} pre y pos-tratamiento que todos los individuos tienen un mayor porcentaje de células no senescentes (CD44⁺CD57⁻), a diferencia de los pacientes en fase CCC en lo que se observa una mayor dispersión no teniéndose un perfil claramente senescente o no senescente.

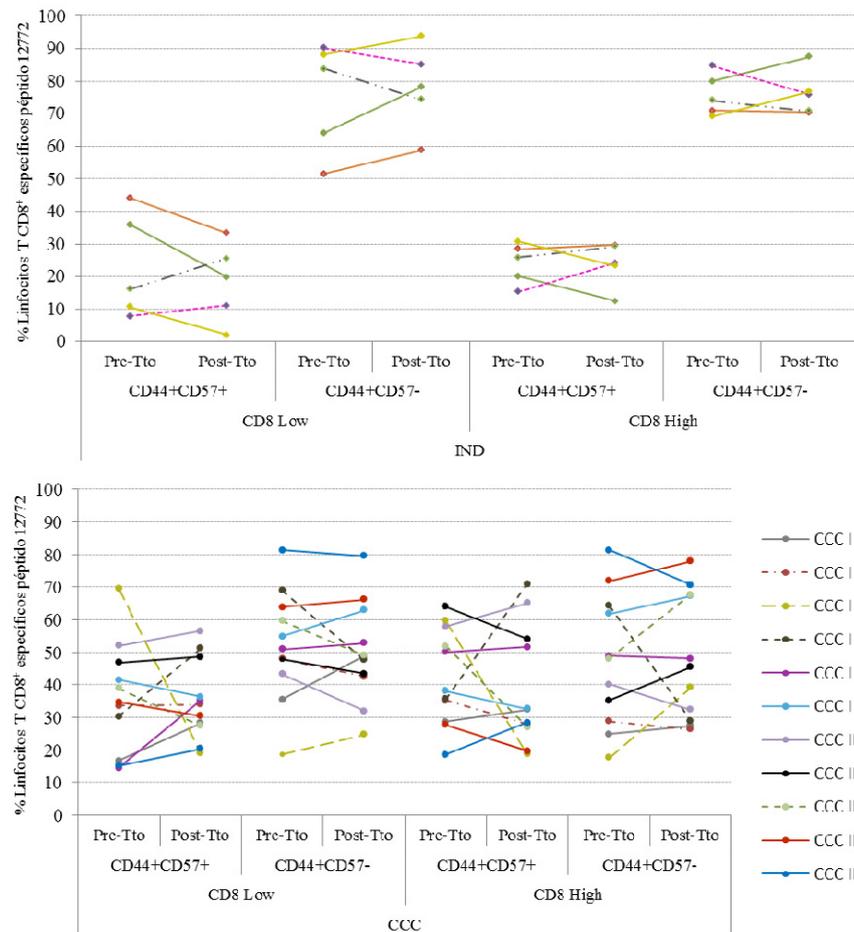


Figura R3.11.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo HSP70₂₁₀₋₂₁₈ en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. . En la gráfica se muestra, para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardíaca (CCC) de la enfermedad de Chagas, el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos dentro de las subpoblaciones CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻, pre (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤ 0,001.

4. 3.2.2.- Péptido PFR2₄₄₉₋₄₅₇ contenido en la proteína PFR2.

Caracterización fenotípica pre-tratamiento.

Los resultados obtenidos, mediante citometría de flujo, muestran la presencia de linfocitos TCD8⁺ que reconocen el epítipo PFR2₄₄₉₋₄₅₇ contenido en la proteína PFR2 de *T. cruzi*. Como se muestra en la figura R3.12, la frecuencia de linfocitos PFR2₄₄₉₋₄₅₇-específicos es estadísticamente superior en pacientes con enfermedad de Chagas con respecto a individuos sanos. En linfocitos T CD8_{LOW} el porcentaje de células específicas es 5 veces mayor ($P \leq 0,01$) en IND (rango de frecuencia 1,99-2,58 (2,28)) y CCC (rango de frecuencia 1,05-4,17 (2,25)) con respecto a donantes sanos (rango de frecuencia 0,18– 0,74 (0,47)).

Por otro lado, en linfocitos T CD8_{HIGH} igualmente se observa un menor número de células específicas en individuos sanos (rango de frecuencia 0,13-0,60 (0,38)) de 3 y 5 veces frente a IND (rango de frecuencia 1,02-1,42 (1,19)) y CCC (rango de frecuencia 0,71-7,68 (1,85)). En la fase cardíaca de la enfermedad se observa un paciente para el cual se detecta un porcentaje de linfocitos PFR2₄₄₉₋₄₅₇-específicos (7,65%) considerablemente superior que en el resto de pacientes ensayados.

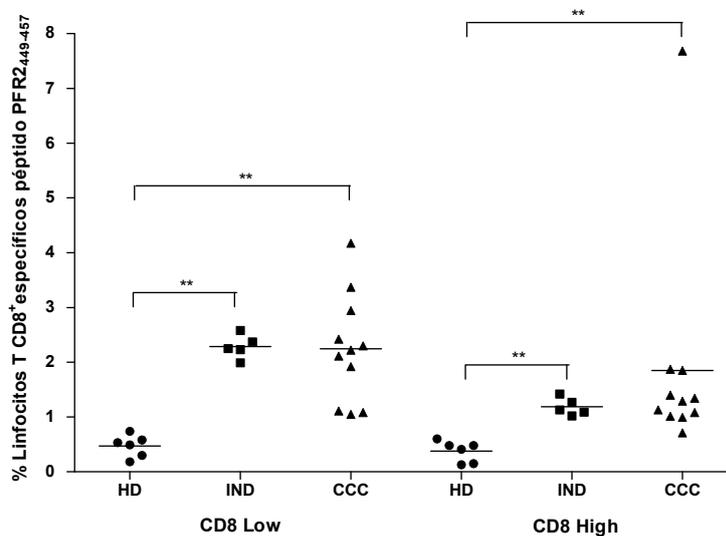


Figura R3.12.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR2₄₄₉₋₄₅₇ en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Chagas. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo empleando dextrámeros del péptido PFR2₄₄₉₋₄₅₇. Los resultados muestran los porcentajes obtenidos en 6 individuos sanos (HD), 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). El porcentaje de linfocitos epítipo-específicos fue evaluado dentro de las poblaciones CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de células TCD8⁺-específicas en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Los resultados obtenidos muestran que, dentro de cada una de las subpoblaciones caracterizadas se observa dispersión dentro de los individuos muestreados principalmente en fase cardiaca de la enfermedad (figura R3.13). En CD8_{LOW} en pacientes en fase CCC, hay un mayor porcentaje de células de memoria efectora tanto T_{EMRA} (CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻) con respecto a células T_{NAIVE} (P≤0,001) como T_{EM} CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻ frente a células de memoria central CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺ (P≤0,01). Así mismo, se observa un mayor porcentaje de células totalmente diferenciadas CD45RA⁺CD127⁻ (P≤0,001). Interesantemente, en ambas subpoblaciones (T_{EMRA} y T_{EM}) el paciente para el cual se detecta el mayor porcentaje de células efectoras, se corresponde con el paciente para el cual se detectaba un muy alto porcentaje de linfocitos PFR₂₄₄₉₋₄₅₇-específicos (figura R3.12). Sin embargo, en CD8_{HIGH} se observa que dicho paciente presenta el mayor porcentaje de células de memoria central CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺ (T_{CM}) y no de células de memoria efectora. Igualmente en CD8_{HIGH} en IND hay una mayor frecuencia de células T_{NAIVE} con respecto a células T_{EMRA} (P≤0,05), mientras que, en CCC es mayoritario el porcentaje de células T_{EM} frente a células de memoria central (T_{CM}) (P≤0,05). Para ambos grupos de pacientes en CD8_{HIGH} se observa un mayor porcentaje de células totalmente diferenciadas (T_{TD}) (P≤0,01 y P≤0,001) (figura R3.13).

Por otro lado, la determinación de la expresión de CD44 y CD57 en linfocitos PFR₂₄₄₉₋₄₅₇-específicos muestra que, en CD8_{LOW} y CD8_{HIGH} la población mayoritaria observada en pacientes con enfermedad de Chagas se corresponde con el fenotipo CD44⁺CD57⁺ característico de células senescentes (P≤0,01 y P≤0,001) (figura R3.14). Dentro de la subpoblación CD8_{HIGH} se observa que en IND dicha población CD44⁺CD57⁺ no es estadísticamente superior encontrándose en este grupo de pacientes un mayor porcentaje de células no senescentes (CD44⁺CD57⁻) con respecto a CCC (P≤0,05).

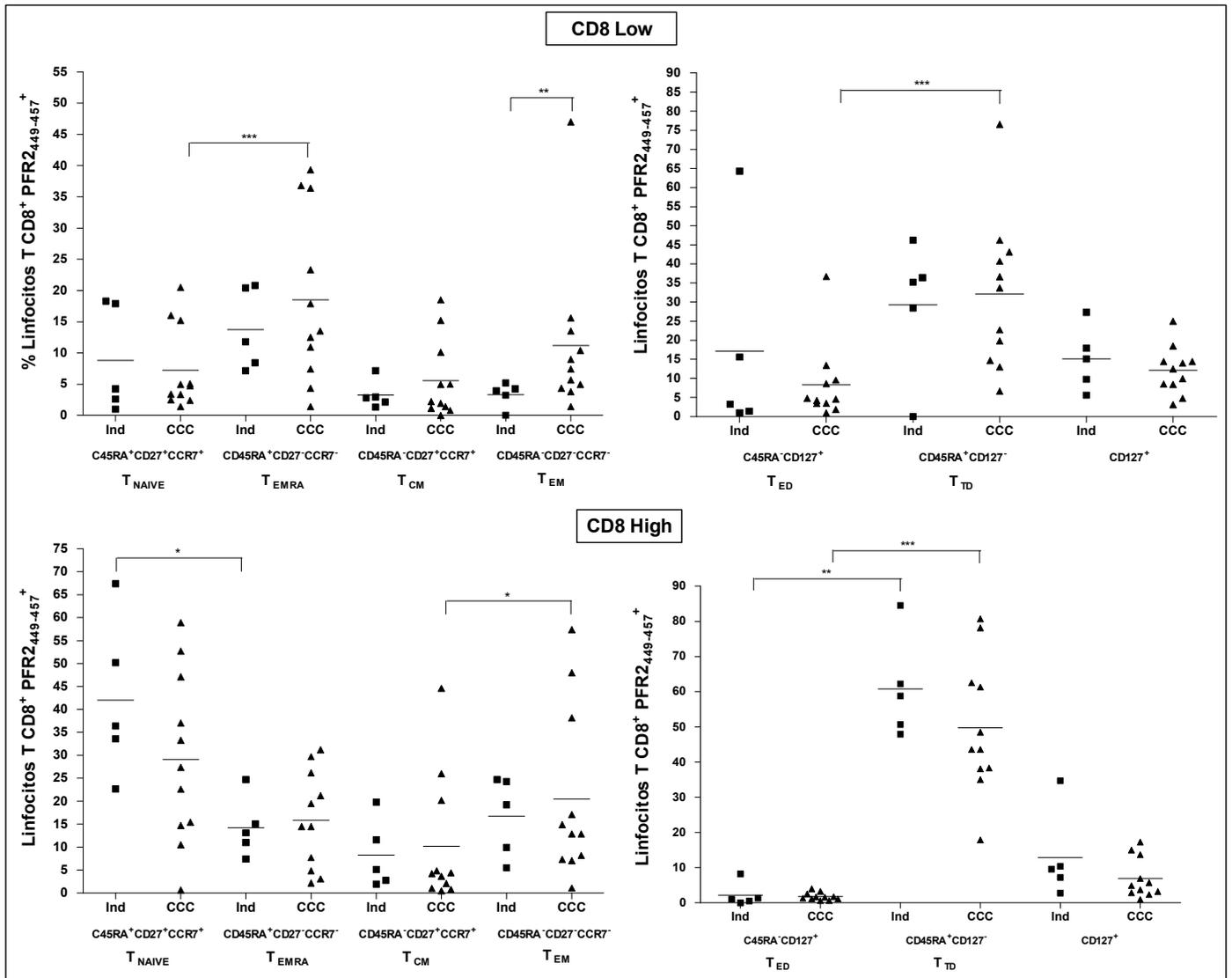


Figura R3.13.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR2₄₄₉₋₄₅₇ en pacientes con enfermedad de Chagas. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo en linfocitos T CD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. Se muestran los resultados obtenidos en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). Combinando anticuerpos monoclonales frente a las moléculas de superficie CD45RA, CCR7, CD27, CD127 se establecen las siguientes subpoblaciones: T_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺), T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁺) células de memoria efectora RA⁺, T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺) células de memoria central, T_{EM} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁺) células de memoria efectora, T_{ED} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁺) células en diferenciación temprana, T_{TD} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻) células totalmente diferenciadas. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

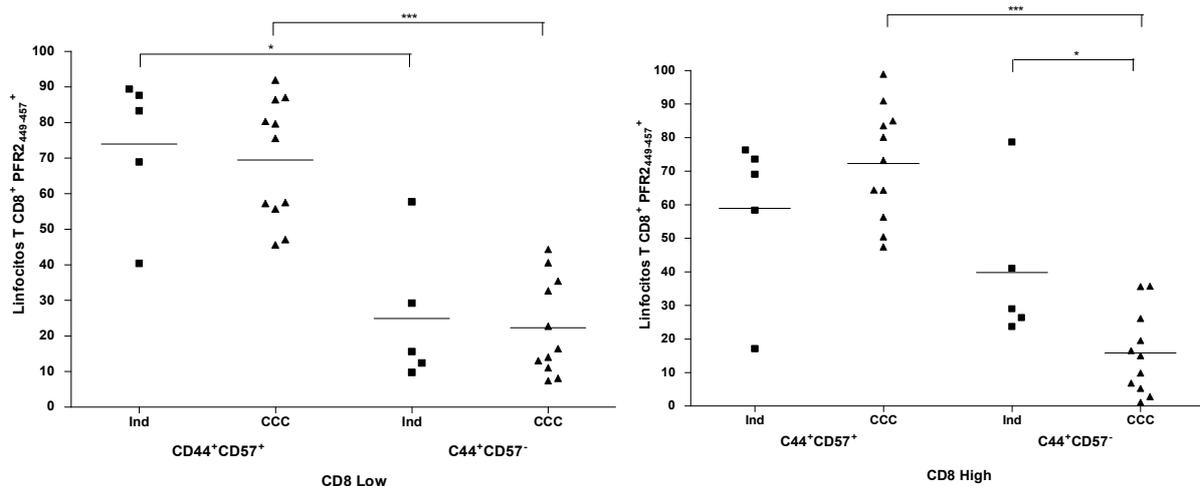


Figura R3.14.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR2₄₄₉₋₄₅₇ en pacientes con enfermedad de Chagas. La expresión de las moléculas de superficie CD44 y CD57 fue determinada mediante citometría de flujo en linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. En las gráficas se representan el porcentaje de células PFR2₄₄₉₋₄₅₇-específicas dentro de las subpoblaciones CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻, en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardiaca (CCC). Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

Caracterización fenotípica post-tratamiento con Benznidazol.

Tras el tratamiento con Benznidazol se observa que el porcentaje de células T CD8 (Low y High) PFR2₄₄₉₋₄₅₇-específicas se mantiene superior en pacientes con enfermedad de Chagas (IND y CCC) con respecto a individuos sanos (P≤0,01). En pacientes en fase indeterminada, el porcentaje de linfocitos PFR2₄₄₉₋₄₅₇-específicos es mayoritario en CD8_{LOW} con respecto a CD8_{HIGH} (P≤0,01) (Figura R3.15).

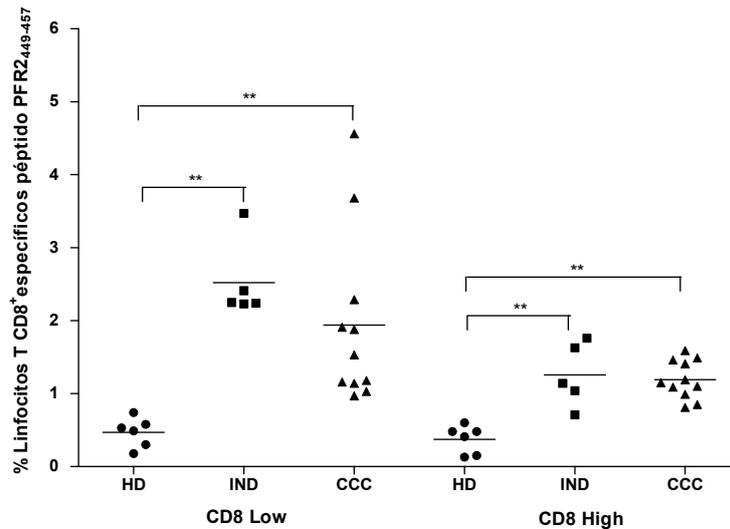


Figura R3.15.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítoto PFR₂₄₄₉₋₄₅₇ en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo empleando dextrámeros del péptido PFR₂₄₄₉₋₄₅₇. Los resultados muestran los porcentajes obtenidos en 6 individuos sanos (HD), 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). El porcentaje de linfocitos epítoto-específicos fue evaluado dentro de las poblaciones CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de células TCD8⁺-específicas en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

La caracterización de las subpoblaciones de células que reconocen el epítoto PFR₂₄₄₉₋₄₅₇ tras el tratamiento con Benznidazol permitieron determinar que, en linfocitos T CD8_{LOW} en CCC se mantiene un mayor porcentaje de células de memoria efectora totalmente diferenciadas (T_{EMRA}) (CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻) con respecto a células T_{NAIVE} (P≤0,05) (figura R3.16), sin embargo, la diferencia observada pre tratamiento entre células T_{EM} y T_{CM} (figura R3.13) no es estadísticamente significativa tras el tratamiento con Benznidazol. Así mismo en CCC se mantiene un mayor porcentaje de células totalmente diferenciadas CD45RA⁺CD127⁻ (P≤0,01). Por otro lado, en CD8_{HIGH} tal como se observaba pre-tratamiento en IND hay una mayor frecuencia de células T_{NAIVE} con respecto a células T_{EMRA} (P≤0,05), mientras que, en CCC es mayoritario el porcentaje de células T_{EMRA} frente a células T_{NAIVE} (P≤0,01), no manteniéndose una diferencia estadísticamente significativa entre las poblaciones T_{EM} y T_{CM}. En ambos grupos de pacientes en CD8_{HIGH} se mantiene un mayor porcentaje de células totalmente diferenciadas (T_{TD}) (P≤0,01 y P≤0,001). En cuanto a la expresión de CD127 no se observan diferencias según el grado de patología ni pre ni post-tratamiento con Benznidazol (figura R3.16).

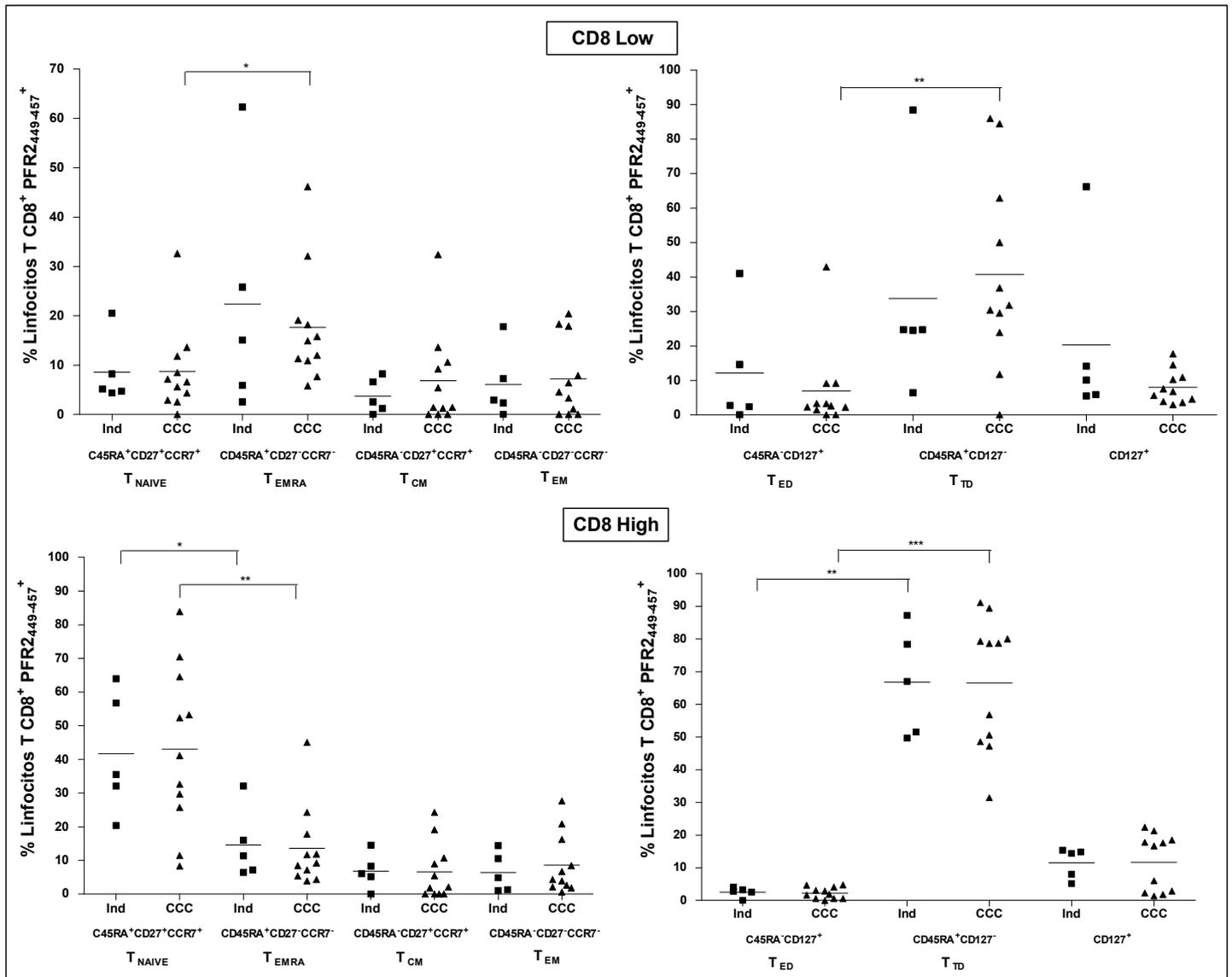


Figura R3.16.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR2₄₄₉₋₄₅₇ en pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo en linfocitos T CD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. Se muestran los resultados obtenidos en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). Combinando anticuerpos monoclonales frente a las moléculas de superficie CD45RA, CCR7, CD27, CD127 se establecen las siguientes subpoblaciones: T_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁺ CCR7⁺), T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁻ CCR7⁻) células de memoria efectora RA⁺, T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺) células de memoria central, T_{EM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻) células de memoria efectora, T_{ED} (CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺) células en diferenciación temprana, T_{TD} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻) células totalmente diferenciadas. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

En cuanto a la expresión de CD44 y CD57, en CD8_{LOW} y CD8_{HIGH} la población mayoritaria observada en pacientes con enfermedad de Chagas se corresponde con el fenotipo CD44⁺CD57⁺ característico de células senescentes, sin embargo, tras el tratamiento con Benznidazol se observa que estas diferencias se mantienen estadísticamente significativas solo en los pacientes en fase cardiaca ($P \leq 0,001$) mientras que, en IND se mantiene un mayor porcentaje de células no senescentes (CD44⁺CD57⁻) con respecto a CCC ($P \leq 0,05$) (figura R3.17).

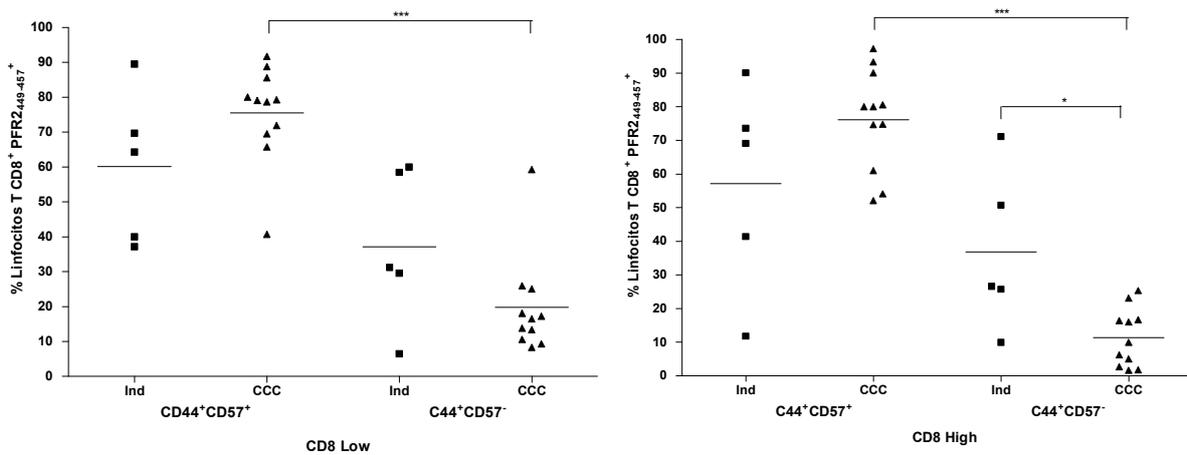


Figura R3.17.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR2₄₄₉₋₄₅₇ en pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. La expresión de las moléculas de superficie CD44 y CD57 fue determinada mediante citometría de flujo en linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. En las gráficas se representan el porcentaje de células PFR2₄₄₉₋₄₅₇-específicas dentro de las subpoblaciones CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻, en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardiaca (CCC). Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Modificaciones fenotípicas inducidas por el tratamiento con Benznidazol.

Con el fin de evaluar el efecto del tratamiento con Benznidazol sobre el porcentaje de células epítipo-específicas se observa en la figura R3.18 la comparativa entre los resultados obtenidos pre (figura RII.12) y post-tratamiento (figura R3.15)

Como muestra la figura R3.18, no se observan cambios significativos en el porcentaje de células específicas detectadas en pacientes con enfermedad de Chagas (IND y CCC). Aunque no se observa una tendencia de disminución o aumento según el grado de patología, uno de los pacientes en fase CCC (línea punteada verde) para el cual se detectaba un alto porcentaje linfocitos PFR2₄₄₉₋₄₅₇-específicos pre-tratamiento

muestra una muy marcada disminución del porcentaje de células específicas tras el tratamiento.

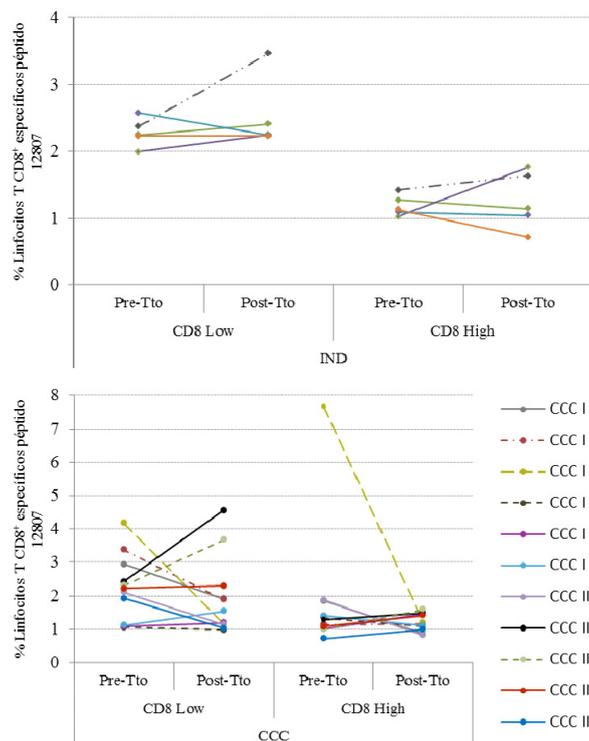
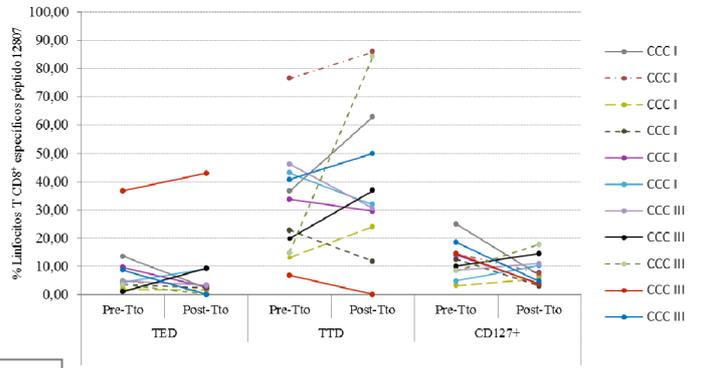
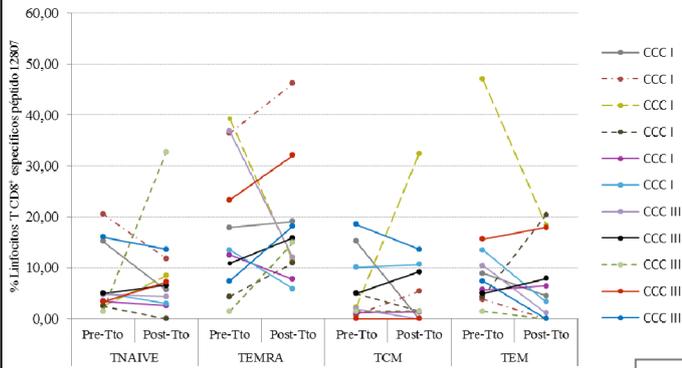
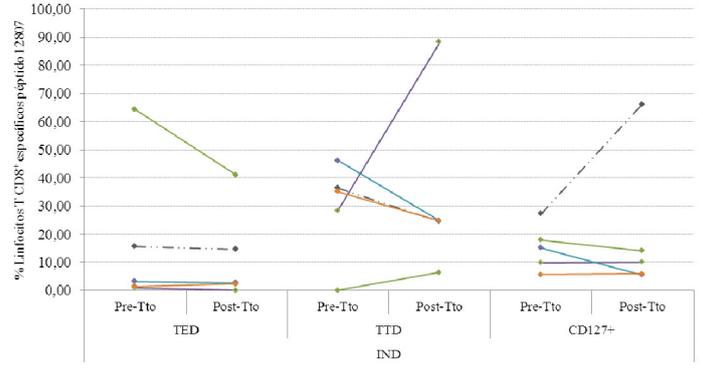
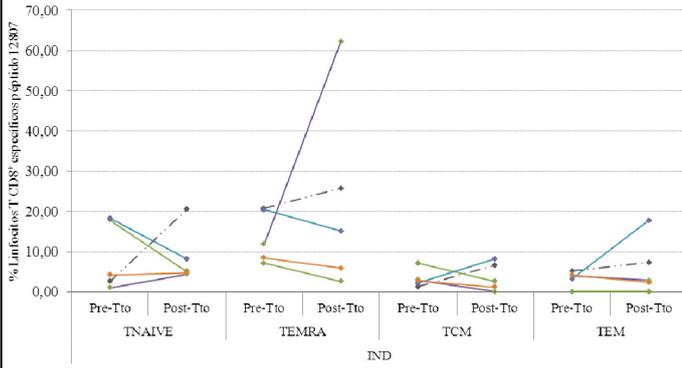


Figura R3.18.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR₂₄₄₉₋₄₅₇ en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. En la gráfica se muestra para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardíaca (CCC) de la enfermedad de Chagas el porcentaje de linfocitos TCD_{8LOW} y TCD_{8HIGH} epítipo-específicos determinados pre tratamiento (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤ 0,001.

Como se muestra en la figura R3.19, hay cambios tras el tratamiento con Benznidazol en el porcentaje correspondiente a cada una de las poblaciones (T_{NAIVE} , T_{EMRA} , T_{EM} , T_{CM} , T_{ED} , T_{TD} y $CD127^+$) PFR₂₄₄₉₋₄₅₇-específicas caracterizadas en cada individuo. En CD_{8HIGH} se observa una significativa disminución del porcentaje de células T_{EM} , así como un aumento en el porcentaje de células totalmente diferenciadas (T_{TD}) en pacientes en fase cardíaca de la enfermedad ($P \leq 0,05$).

Interesantemente se observa que en CD_{8LOW}, el paciente CCC (línea punteada verde) para el cual pre tratamiento se detectaba un alto porcentaje de células con fenotipo efector (T_{EMRA} y T_{EM}), muestra una marcada disminución del porcentaje células específicas para ambas subpoblaciones, así como un aumento del porcentaje de células T de memoria central.

CD8 Low



CD8 High

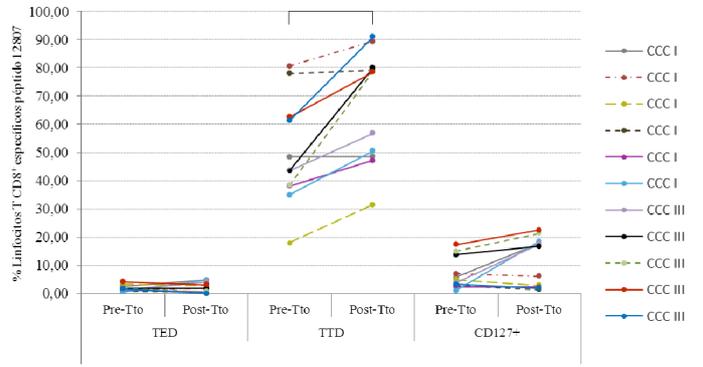
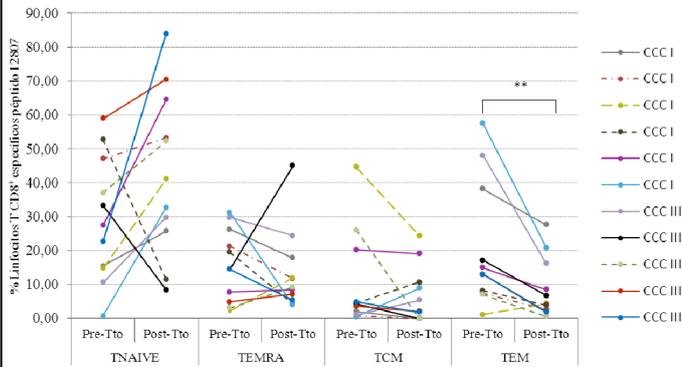
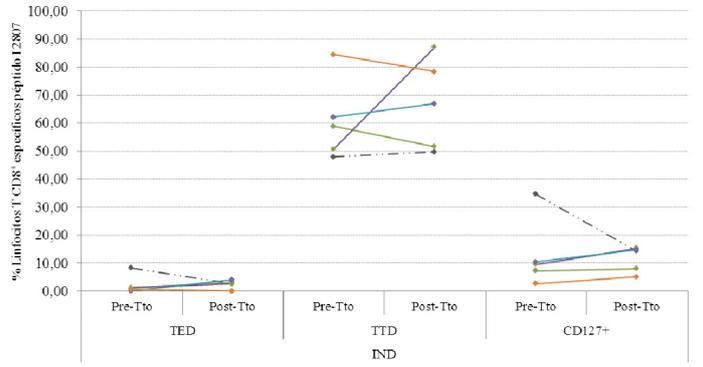
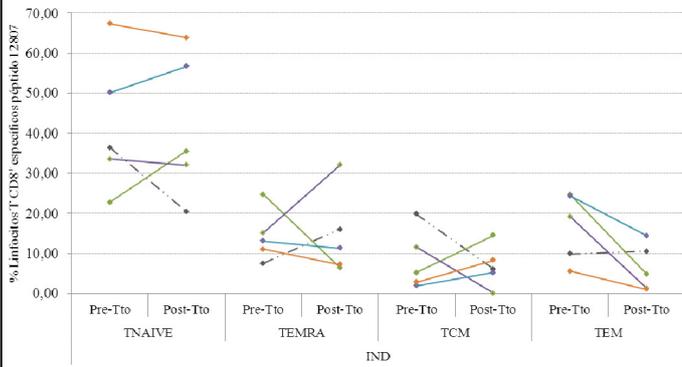


Figura R3.19.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR2₄₄₉₋₄₅₇ en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. Se muestra para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas, el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos dentro de las subpoblaciones T_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁺ CCR7⁺), T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁻ CCR7⁺), T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺), T_{EM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻ CCR7⁺), T_{ED} (CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺), T_{TD} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻) y CD127⁺, en condiciones pre tratamiento (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤ 0,001.

A nivel de expresión de la molécula de superficie CD57⁺ se observa que, en CD8_{HIGH} los pacientes en fase cardiaca muestran una disminución significativa del porcentaje de células de memoria PFR2₄₄₉₋₄₅₇-específicas no senescentes (CD44⁺CD57⁻) (P≤0,05) (Figura R3.20). Así mismo, en pacientes en fase CCC todos los pacientes ensayados mantienen un mayor porcentaje de células senescentes (CD44⁺CD57⁺) tanto en CD8_{LOW} como CD8_{HIGH} pre y pos-tratamiento patrón que no se observa en los pacientes en fase IND, en los cuales hay una mayor dispersión.

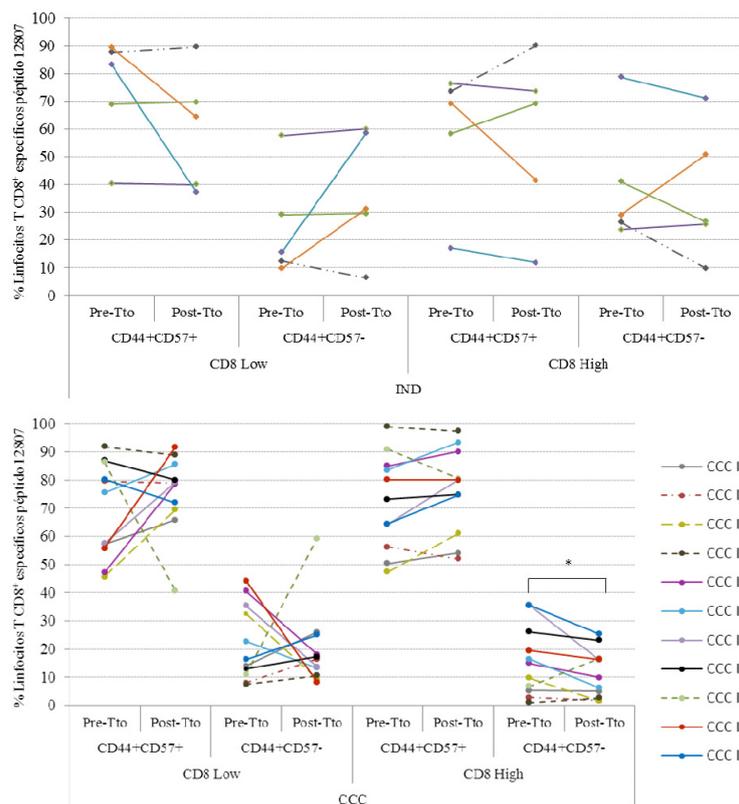


Figura R3.20.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR2₄₄₉₋₄₅₇ en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. En la gráfica se muestra, para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas, el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos dentro de las subpoblaciones CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻, pre (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤ 0,001.

4. 3.2.3.-Péptido PFR3₄₂₈₋₄₃₆ contenido en la proteína PFR3.

Caracterización fenotípica pre-tratamiento.

Los resultados obtenidos muestran que, linfocitos T CD8⁺ provenientes de pacientes con enfermedad de Chagas (IND y CCC) reconocen de manera diferencial con respecto a donantes sanos el epítipo PFR3₄₂₈₋₄₃₆ contenido en la proteína PFR3 de *T. cruzi*. Como se muestra en la figura R3.21, en linfocitos T CD8_{LOW} la frecuencia de linfocitos PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicos es 5 veces mayor ($P \leq 0,01$) en IND (rango de frecuencia 1,18-2,90 (2,08)) y CCC (rango de frecuencia 1,06-2,80 (1,87)) con respecto a donantes sanos (rango de frecuencia 0,22– 0,71 (0,40)). El porcentaje de linfocitos CD8_{HIGH} PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicos en individuos sanos se mantiene invariable (rango de frecuencia 0,11-0,66 (0,34) mientras que en los pacientes enfermedad de Chagas se observa un menor porcentaje de células PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicas, sin embargo a pesar que el porcentaje de células específicas disminuye ($P \leq 0,01$) (IND (rango de frecuencia 0,91-1,20 (1,07)) y CCC (rango de frecuencia 0,88-1,55 (1,15)) sigue siendo 3 veces superior con respecto a individuos sanos ($P \leq 0,01$) (figura R3.21).

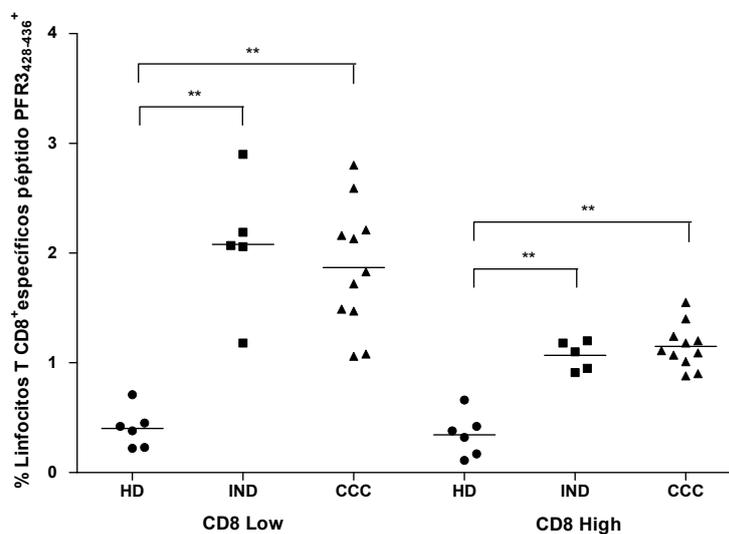


Figura R3.21.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR3₄₂₈₋₄₃₆ en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Chagas. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo empleando dextrámeros del péptido PFR3₄₂₈₋₄₃₆. Los resultados muestran los porcentajes obtenidos en 6 individuos sanos (HD), 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). El porcentaje de linfocitos epítipo-específicos fue evaluado dentro de las poblaciones CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de células TCD8⁺-específicas en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Los resultados obtenidos muestran que, en pacientes en fase CCC, se observa un perfil fenotípico de memoria efectora, encontrándose en CD8_{LOW} un mayor porcentaje de células PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicas de memoria efectora T_{EMRA} (CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻) con respecto a células T_{NAIVE} (P≤0,001) y en CD8_{HIGH} un menor porcentaje de células T_{CM} (CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺) *versus* T_{EM} (CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻) (P≤0,05) (figura R3.22).

En cuanto al fenotipo de diferenciación celular tanto en pacientes en fase IND como CCC (CD8_{LOW} CD8_{HIGH}) se observa un mayor porcentaje de células totalmente diferenciadas (T_{TD}) *versus* T_{ED} (P≤0,01 y P≤0,001), siendo esta población T_{TD} mayoritaria en linfocitos CD8_{LOW} en pacientes en fase IND con respecto a CCC (P≤0,05) (figura R3.22).

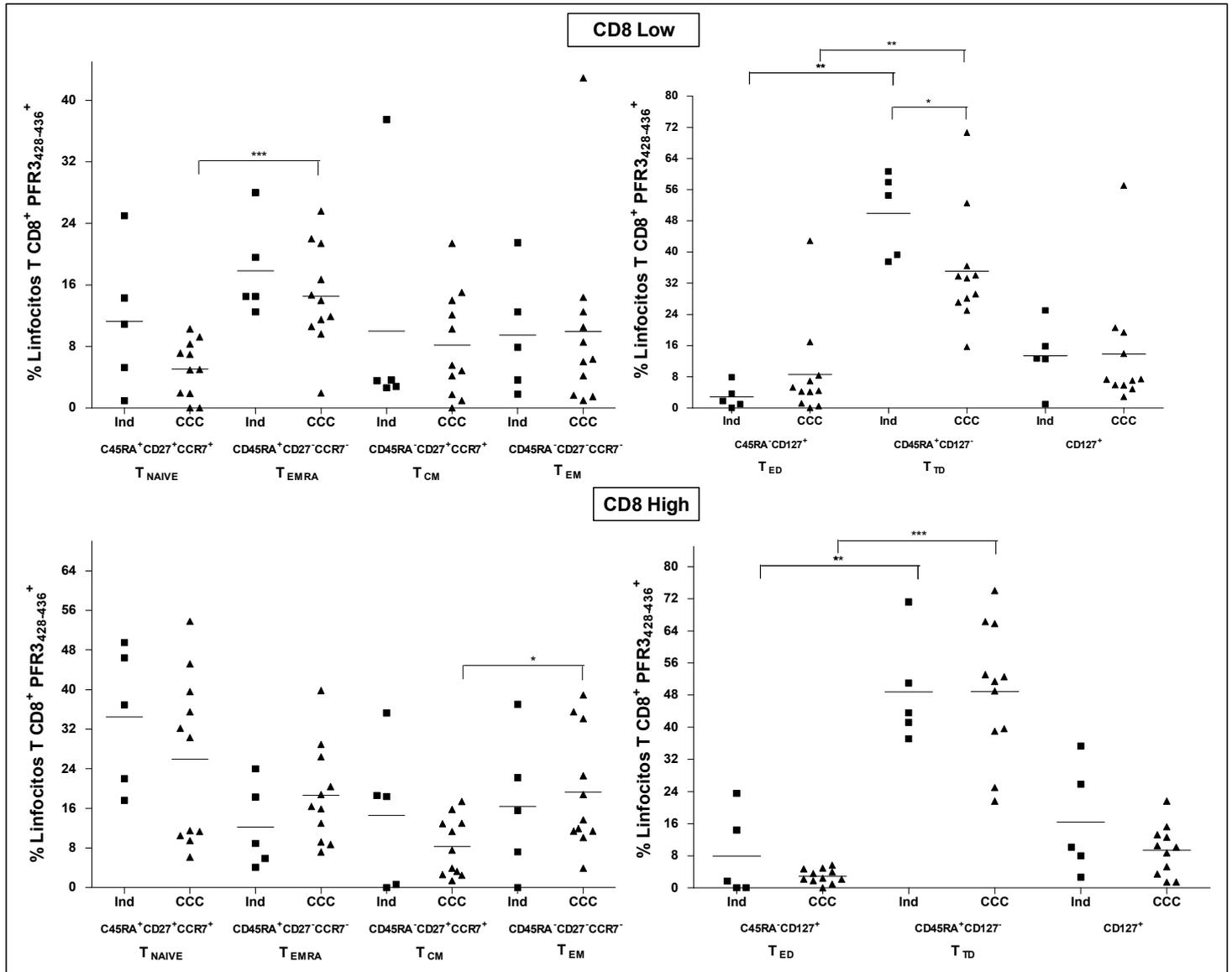


Figura R3.22.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítopo PFR3₄₂₈₋₄₃₆ en pacientes con enfermedad de Chagas. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo en linfocitos T CD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítopo-específicos. Se muestran los resultados obtenidos en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). Combinando anticuerpos monoclonales frente a las moléculas de superficie CD45RA, CCR7, CD27, CD127 se establecen las siguientes subpoblaciones: T_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺), T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻) células de memoria efectora RA⁺, T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺) células de memoria central, T_{EM} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻) células de memoria efectora, T_{ED} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁺) células en diferenciación temprana, T_{TD} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻) células totalmente diferenciadas. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

Por otro lado, la determinación del fenotipo de memoria de células PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicas que expresan la proteína de superficie CD57 muestra que, en CD8_{LOW} y CD8_{HIGH} los pacientes en fase CCC presenta un mayor porcentaje estadísticamente significativo de células CD44⁺CD57⁺ (células senescentes) con respecto a células CD44⁺CD57⁻ ($P \leq 0,001$). Mientras que en pacientes en fase IND (CD8_{HIGH}) hay un mayor porcentaje de células no senescentes (CD44⁺CD57⁻) *versus* pacientes en fase CCC ($P \leq 0,05$) (figura R3.23).

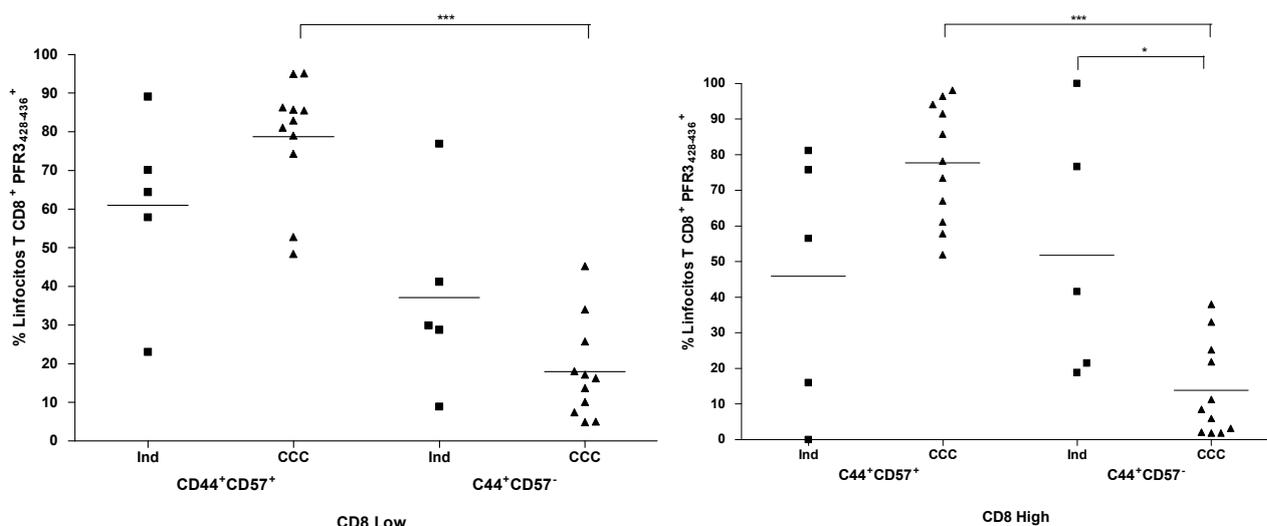


Figura R3.23.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR3₄₂₈₋₄₃₆ en pacientes con enfermedad de Chagas. La expresión de las moléculas de superficie CD44 y CD57 fue determinada mediante citometría de flujo en linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. En las gráficas se representan el porcentaje de células PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicas dentro de las subpoblaciones CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻, en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Caracterización fenotípica post-tratamiento con Benznidazol.

El porcentaje de linfocitos PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicos en pacientes con enfermedad de Chagas (IND y CCC) que han sido tratados con Benznidazol sigue siendo estadísticamente superior en pacientes *versus* controles sanos tanto en la población CD8_{LOW} como en CD8_{HIGH} ($P \leq 0,01$). Sin embargo, en la población CD8_{HIGH} se detecta para 2 pacientes en fase IND, 4 en fase CCC y 1 en fase CCC (CD8_{LOW}) una disminución del porcentaje de células PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicas a niveles detectados en controles sanos (figura R3.24).

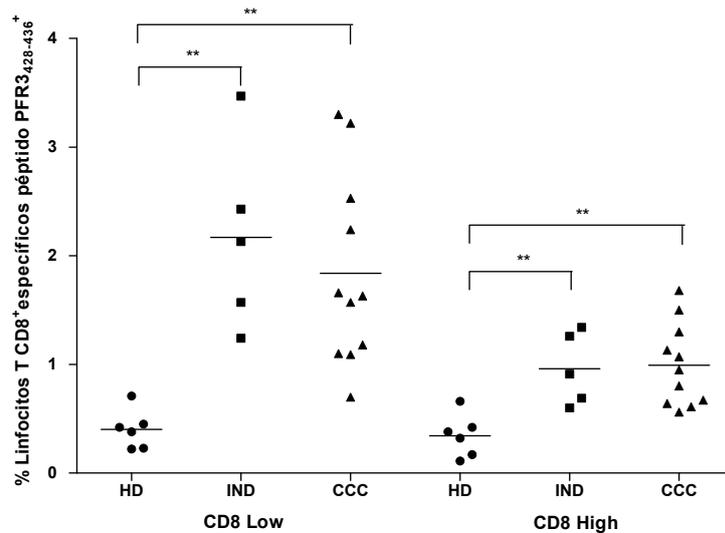


Figura R3.24.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR3₄₂₈₋₄₃₆ en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo empleando dextrámeros del péptido PFR3₄₂₈₋₄₃₆. Los resultados muestran los porcentajes obtenidos en 6 individuos sanos (HD), 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). El porcentaje de linfocitos epítipo-específicos fue evaluado dentro de las poblaciones CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de células TCD8⁺-específicas en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

La caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de células que reconocen el epítipo PFR3₄₂₈₋₄₃₆ tras el tratamiento con Benznidazol permitieron determinar que, en pacientes en fase CCC (CD8_{LOW}) se mantiene un mayor porcentaje de células PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicas de memoria efectora T_{EMRA} (CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺) con respecto a células T_{NAIVE} (P≤0,01) (figura R3.22), por otro lado, en CD8_{HIGH} no se observan diferencias entre el porcentaje de células T_{EM} con respecto a células T_{CM} tal como se encontraba en condiciones pre-tratamiento (figura R3.22). En dicha población CD8_{HIGH}, tanto en pacientes en fase IND como CCC se observa una gran dispersión del porcentaje de células epítipo-específicas detectadas dentro de cada subpoblación, observándose en ambos grupos de pacientes una mayor población de células T_{NAIVE}, sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas.

En cuanto al fenotipo de diferenciación celular tanto en pacientes en fase IND como CCC (CD8_{LOW}) se observa un mayor porcentaje de células totalmente diferenciadas (T_{TD}) versus T_{ED} (P≤0,05 y P≤0,001) (figura R3.26), sin embargo no hay diferencias en el porcentaje de células T_{TD} según el grado de patología tal como se observaba pre-tratamiento (figura R3.22). En CD8_{HIGH} se mantiene un mayor porcentaje

de células totalmente diferenciadas sin embargo, en pacientes en fase IND esta población no es estadísticamente superior con respecto a T_{ED} (figura R3.26).

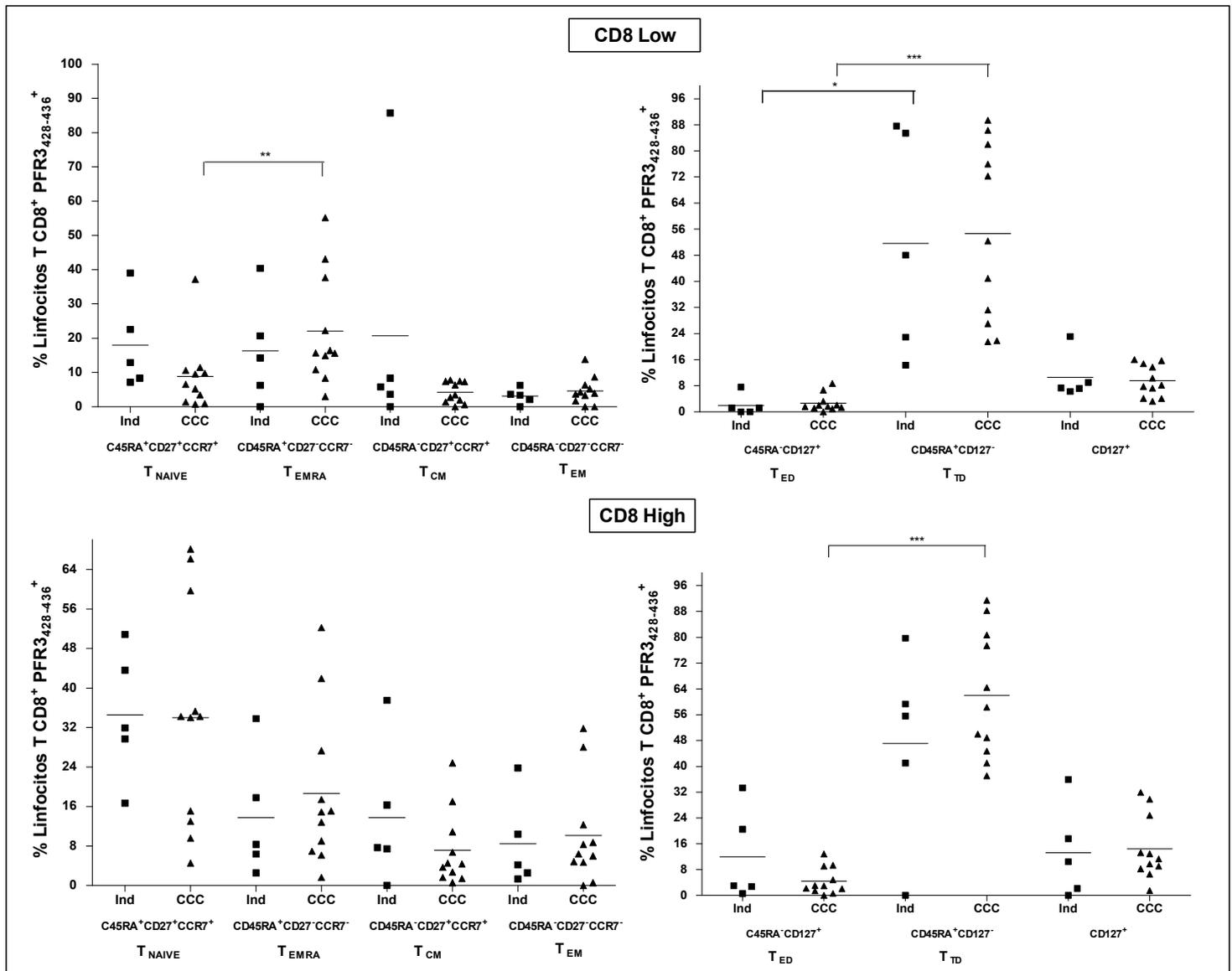


Figura R3.25.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR3₄₂₈₋₄₃₆ en pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo en linfocitos T CD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. Se muestran los resultados obtenidos en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). Combinando anticuerpos monoclonales frente a las moléculas de superficie CD45RA, CCR7, CD27, CD127 se establecen las siguientes subpoblaciones: T_{NAIVE} ($CD8^+CD45RA^+CD27^+CCR7^+$), T_{EMRA} ($CD8^+CD45RA^+CD27^-CCR7^+$) células de memoria efectora RA⁺, T_{CM} ($CD8^+CD45RA^-CD27^+CCR7^+$) células de memoria central, T_{EM} ($CD8^+CD45RA^-CD27^-CCR7^+$) células de memoria efectora, T_{ED} ($CD8^+CD45RA^-CD127^+$) células en diferenciación temprana, T_{TD} ($CD8^+CD45RA^+CD127^+$) células totalmente diferenciadas. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

La caracterización del fenotipo de memoria de células PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicas que expresan la proteína de superficie CD57 en pacientes tras ser tratados con Benznidazol muestra en la figura R3.23 que, en CD8_{LOW} y CD8_{HIGH} se mantiene un mayor porcentaje de células senescentes (CD44⁺CD57⁺) con respecto a células CD44⁺CD57⁻ siendo este significativamente estadístico en pacientes en fase CCC (P≤0,001). Dentro de la subpoblación CD8_{LOW} se observa que en IND hay un mayor porcentaje de células no senescentes (CD44⁺CD57⁻) con respecto a CCC (P≤0,05) perdiéndose esta diferencia en la población CD8_{HIGH} observada previo tratamiento con Benznidazol (figura R.3.23)

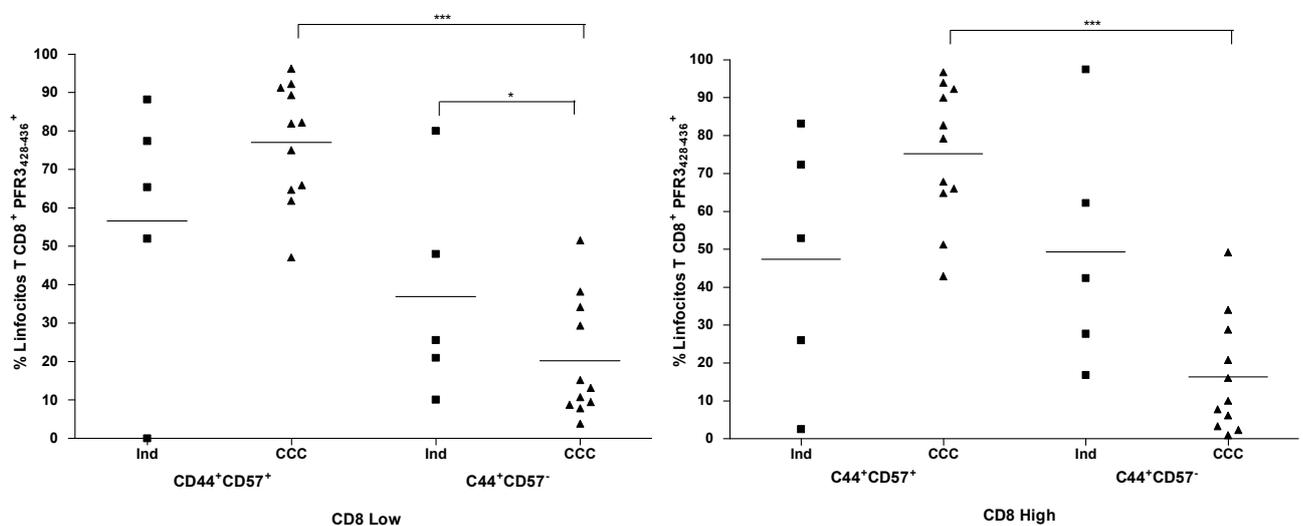


Figura R3.26.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR3₄₂₈₋₄₃₆ en pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. La expresión de las moléculas de superficie CD44 y CD57 fue determinada mediante citometría de flujo en linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. En las gráficas se representan el porcentaje de células PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicas dentro de las subpoblaciones CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻, en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardiaca (CCC). Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

Modificaciones fenotípicas inducidas por el tratamiento con Benznidazol.

Con el fin de evaluar el efecto del tratamiento con Benznidazol sobre el porcentaje de células PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicas se observa en la figura R3.27 la comparativa entre los resultados obtenidos pre (figura RII.21) y post-tratamiento (figura R3.24).

Como muestra la figura R3.27, si bien no puede determinarse una tendencia de disminución o aumento según el grado de patología, ya que no se observan cambios significativos en el porcentaje de células específicas detectadas en pacientes con enfermedad de Chagas (IND y CCC), si se observa que el tratamiento induce cambios sobre el porcentaje de células específicas a nivel de individuo.

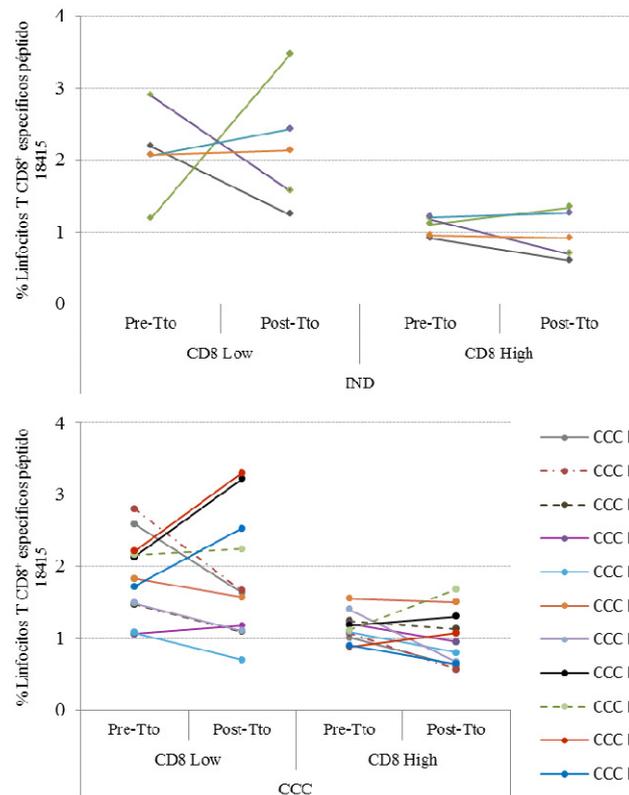
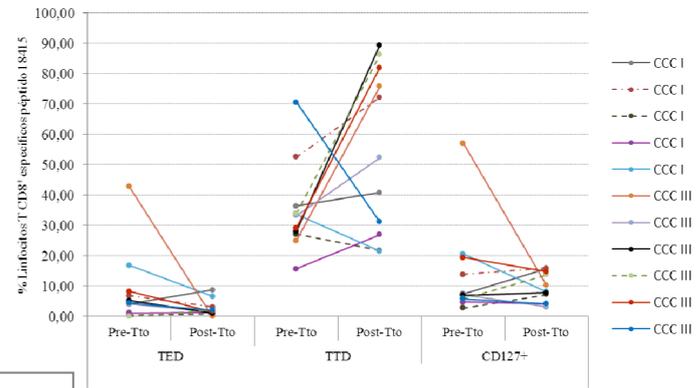
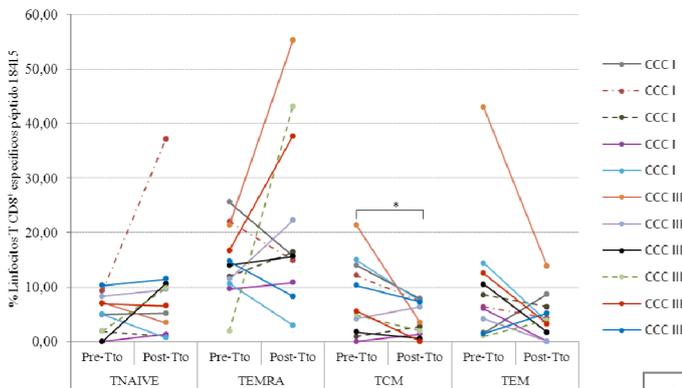
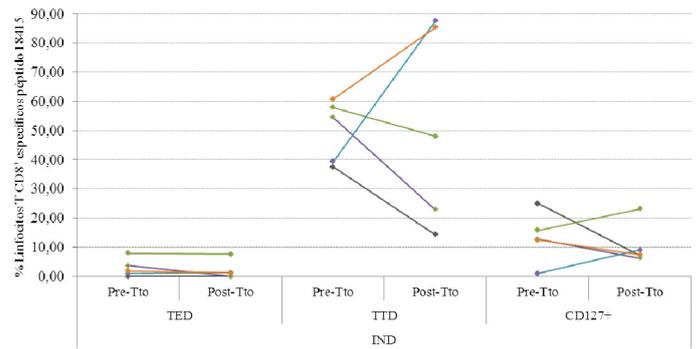
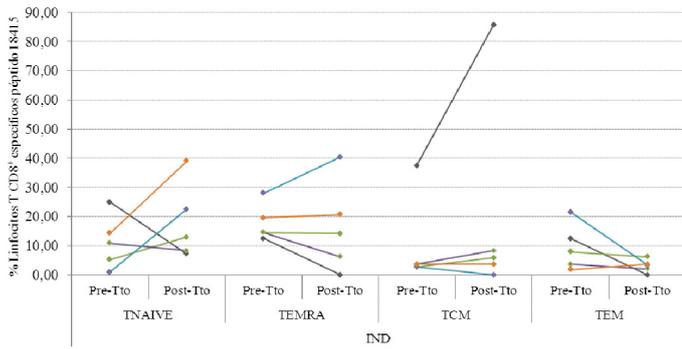


Figura R3.27.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR3₄₂₈₋₄₃₆ en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. En la gráfica se muestra para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos determinados pre tratamiento (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

Como se muestra en la figura R3.28, tras el tratamiento con Benznidazol hay cambios en el porcentaje correspondiente a cada una de las poblaciones PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicas caracterizadas en cada individuo (T_{NAIVE} , T_{EMRA} , T_{EM} , T_{CM} , T_{ED} , T_{TD} y $CD127^+$). En pacientes en fase cardiaca de la enfermedad, en CD8_{LOW} hay una significativa disminución del porcentaje de células memoria central T_{CM} ($P \leq 0,05$), mientras que, en CD8_{HIGH} disminuye significativamente el porcentaje de células de memoria efectora T_{EM} ($P \leq 0,05$), dada esta disminución se observó post tratamiento que no hay diferencias significativas entre la poblaciones T_{EM} y T_{CM} (figura RII.25) tal como se observaba en condiciones pre-tratamiento.

CD8 Low



CD8 High

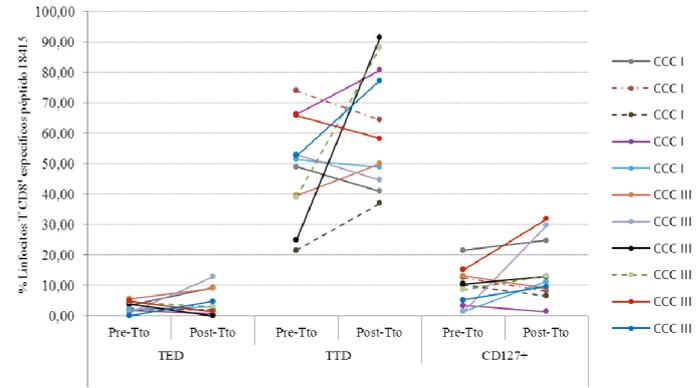
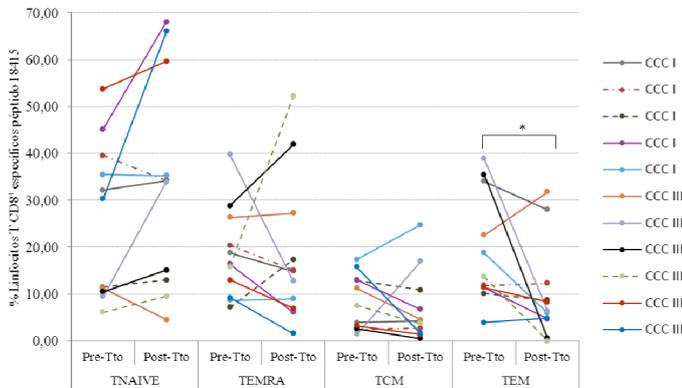
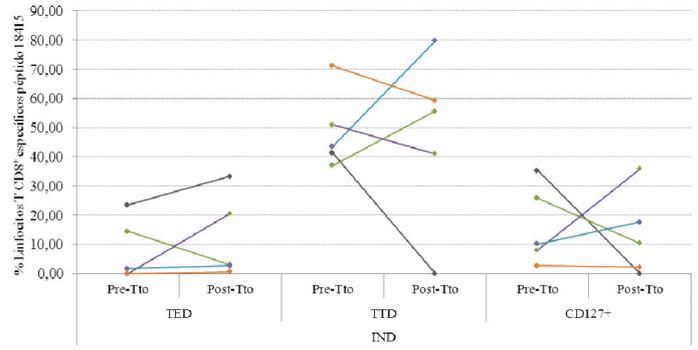
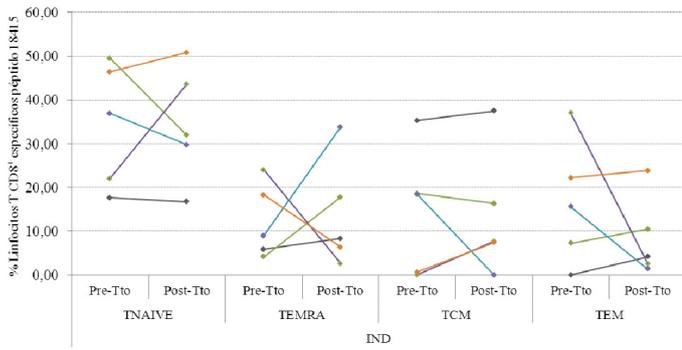


Figura R3.28.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR3₄₂₈₋₄₃₆ en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. Se muestra para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardíaca (CCC) de la enfermedad de Chagas, el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos dentro de las subpoblaciones T_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁺ CCR7⁻), T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁻ CCR7⁻), T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺), T_{EM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻ CCR7⁻), T_{ED} (CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺), T_{TD} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻) y CD127⁺, en condiciones pre tratamiento (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤ 0,001.

La caracterización y comparación del fenotipo de senescencia de linfocitos TCD8⁺ PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicos pre y post tratamiento con Benznidazol, muestra que el porcentaje de células específicas que expresan tanto CD44⁺CD57⁺ como CD44⁺CD57⁻ en algunos pacientes se ve modificado sin embargo estos cambios no son estadísticamente significativos ya que en CD8_{LOW} y CD8_{HIGH} se tiene la misma proporción de pacientes en los que se detecta aumento o disminución del porcentaje de células epítipo-específicas (CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻) tras el tratamiento (figura R3.29). Interesantemente en los pacientes en fase IND, se observa una mayor dispersión no teniéndose un perfil claramente senescente o no senescente contrario a lo observado en pacientes en fase CCC, en los que tanto en CD8_{LOW} como CD8_{HIGH} pre y post-tratamiento todos los individuos tienen mayor porcentaje de células senescentes (CD44⁺CD57⁺).

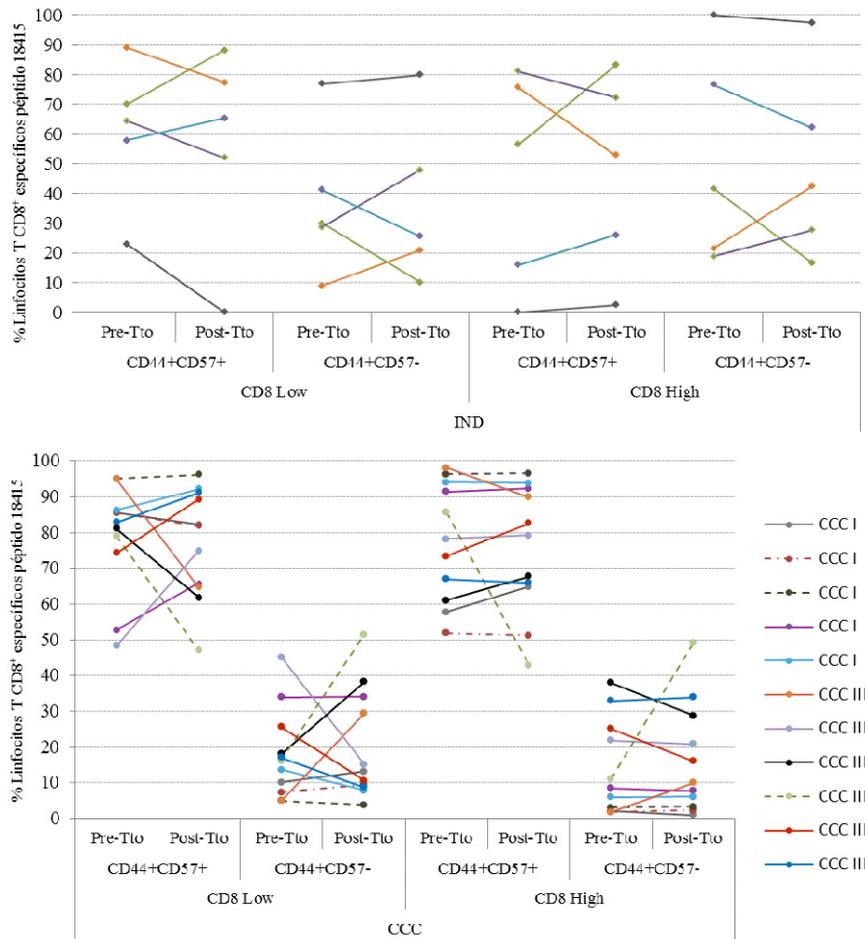


Figura R3.29.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo PFR3₄₂₈₋₄₃₆ en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. . En la gráfica se muestra, para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas, el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos dentro de las subpoblaciones CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻, pre (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤ 0,001.

4. 3.2.4.- Péptido 12822 contenido en la proteína TcCA-2

Caracterización fenotípica pre-tratamiento.

Los resultados correspondientes a los ensayos pre tratamiento con Benznidazol se detallan en sección 4.1.3 (Egui et al manuscrito en preparación). Brevemente, un mayor porcentaje de linfocitos T CD8_{LOW} 12822-específicos es observado en IND (media de frecuencia de 2,72%), con respecto a CCC (media de frecuencia 2,18) ($P \leq 0,05$), siendo la frecuencia de linfocitos T CD8_{LOW} 12822-específicos 4 veces mayor ($P \leq 0,01$) que el porcentaje observado en individuos sanos (media de frecuencia 0,60). El porcentaje de linfocitos CD8_{HIGH} 12822-específicos en individuos sanos se mantiene invariable (media de frecuencia 0,60) mientras que en los pacientes enfermedad de Chagas se observa un menor porcentaje de células 12822-específicas, no encontrándose diferencias entre IND (media de frecuencia de 1,20%,) y CCC (media de frecuencia de 1,42%,). A pesar que el porcentaje de células específicas disminuye en la subpoblación CD8_{HIGH} sigue siendo superior con respecto a los individuos sanos ($P \leq 0,01$) (figura 3B sección 4.1.3).

En cuanto a la caracterización del fenotipo de células de memoria se observa que en linfocitos 12822-específicos CD8_{LOW} y CD8_{HIGH} de pacientes en fase indeterminada el porcentaje de células que expresan el fenotipo CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺ (T_{NAIVE}) es superior con respecto a pacientes en fase cardiaca ($P \leq 0,01$), por otro lado la población de células CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺ (T_{CM}) es significativamente mayor en IND frente a CCC sólo en la subpoblación CD8_{LOW} ($P \leq 0,05$), mientras que, dentro de la subpoblación CD8_{HIGH} se observa que las células de memoria totalmente diferenciadas (CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻ T_{EMRA}) son significativamente menores en IND con respecto a CCC, no encontrándose diferencias según el grado de patología para las subpoblación CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻ (T_{EM}). En pacientes en fase CCC tanto en CD8_{LOW} como en CD8_{HIGH} se observa un fenotipo efector observándose una mayoritaria expresión tanto de células T_{EMRA} frente a las células T_{NAIVE} ($P \leq 0,001$), como de células T_{EM} frente a la población de células T_{CM} ($P \leq 0,01$). Asimismo se observó en IND y CCC tanto en CD8_{LOW} como CD8_{HIGH} una mayoritaria población caracterizada por un fenotipo CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻ (T_{TD}) ($P \leq 0,01$ y $P \leq 0,001$) con respecto a CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺ (T_{ED}). Mientras que, en CD8_{LOW} 12822-específicos, se observa que la

expresión de CD127 es mayoritaria en pacientes IND con respecto a CCC ($P \leq 0,05$) (figura 4 sección 4.1.3).

Así mismo, en estas células 12822-específicas se determinó un mayor porcentaje de células $CD44^+CD57^-$ (linfocitos T CD8 de memoria no senescentes) frente a $CD44^+CD57^+$ ($P \leq 0,01$ y $P \leq 0,001$) tanto en IND como en CCC. La expresión de $CD44^+CD57^-$ es diferencial entre IND y CCC siendo mayoritaria en IND ($P \leq 0,001$). Interesantemente en linfocitos TCD8_{HIGH} en CCC se observa mayor porcentaje de células de memoria senescentes $CD44^+CD57^+$ con respecto a pacientes en fase IND ($P \leq 0,001$) grupo en el cual se evidencia un mayor porcentaje de linfocitos no senescentes ($CD44^+CD57^-$) ($P \leq 0,001$) (figura 6 sección 4.1.3).

Caracterización fenotípica post-tratamiento con Benznidazol.

Los análisis post-tratamiento con Benznidazol muestran que, se mantienen las diferencias observadas pre-tratamiento entre pacientes con enfermedad de Chagas (IND y CCC) y controles sanos, siendo la frecuencia de linfocitos T CD8_{LOW} 12822-específicos 3 veces mayor ($P \leq 0,01$) en pacientes (IND media de frecuencia 2,17 y CCC media de frecuencia 2,08) que en individuos sanos (media de frecuencia 0,60), sin embargo no se observan las diferencias significativas encontradas en el porcentaje de células 12822-específicas entre IND y CCC pre-tratamiento (figura R3.30).

En linfocitos CD8_{HIGH} en los pacientes con enfermedad de Chagas se observa un menor porcentaje de células 12822-específicas, sin embargo este porcentaje se mantiene 3 veces superior que en individuos sanos (IND media de frecuencia de 1,59%, CCC media de frecuencia de 1,20% y HD media de frecuencia de 0,66%) ($P \leq 0,01$). En los pacientes en fase cardiaca (rango de frecuencia 0,49-2,22%) post-tratamiento se observa una disminución del porcentaje de células 12822-específicas teniendo pacientes con porcentajes inferiores a los detectados en individuos sanos (rango de frecuencia 0,60-0,72%) (Figura R3.30).

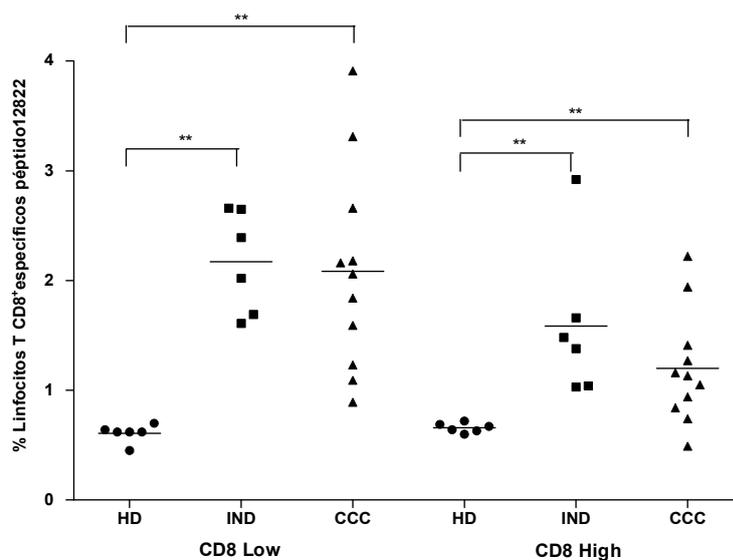


Figura R3.30.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítipo 12822 en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo empleando dextrámeros del péptido 12822. Los resultados muestran los porcentajes obtenidos en 6 individuos sanos (HD), 6 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). El porcentaje de linfocitos epítipo-específicos fue evaluado dentro de las poblaciones CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de células TCD8⁺-específicas en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

En cuanto a la caracterización del fenotipo de células de memoria post-tratamiento con Benznidazol se observa que, a diferencia de lo encontrado en condiciones pre-tratamiento, en linfocitos CD8_{LOW} 12822-específicos no hay diferencias en el porcentaje de células que expresan un fenotipo de células T_{NAIVE} entre pacientes en fase indeterminada con respecto a pacientes en fase cardíaca, sin embargo, en IND frente a CCC se mantiene un mayor porcentaje de células de memoria central (P≤0,05) al igual que en pacientes en fase CCC se mantiene un fenotipo efector observándose una mayoritaria expresión tanto de células T_{EMRA} frente a las células T_{NAIVE} (P≤0,05), como de células T_{EM} frente a la población de células T_{CM} (P≤0,01). Por otro lado, en CD8_{High} se pierden las diferencias observadas pre-tratamiento entre T_{NAIVE} y T_{EMRA} y entre IND y CCC dentro de ambas sub-poblaciones, manteniéndose solo en CCC un mayor porcentaje de células T_{EM} con respecto a T_{CM} (P≤0,05) (Figura R3.31)

Asimismo, se observó en IND y CCC tanto en CD8_{LOW} como CD8_{High} una mayoritaria población caracterizada por células totalmente diferenciadas CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻ (P≤0,01 y P≤0,001). Mientras que, en CD8_{LOW}, se pierden las

diferencias observadas en la expresión de CD127 entre pacientes IND con respecto a CCC (figura R3.31).

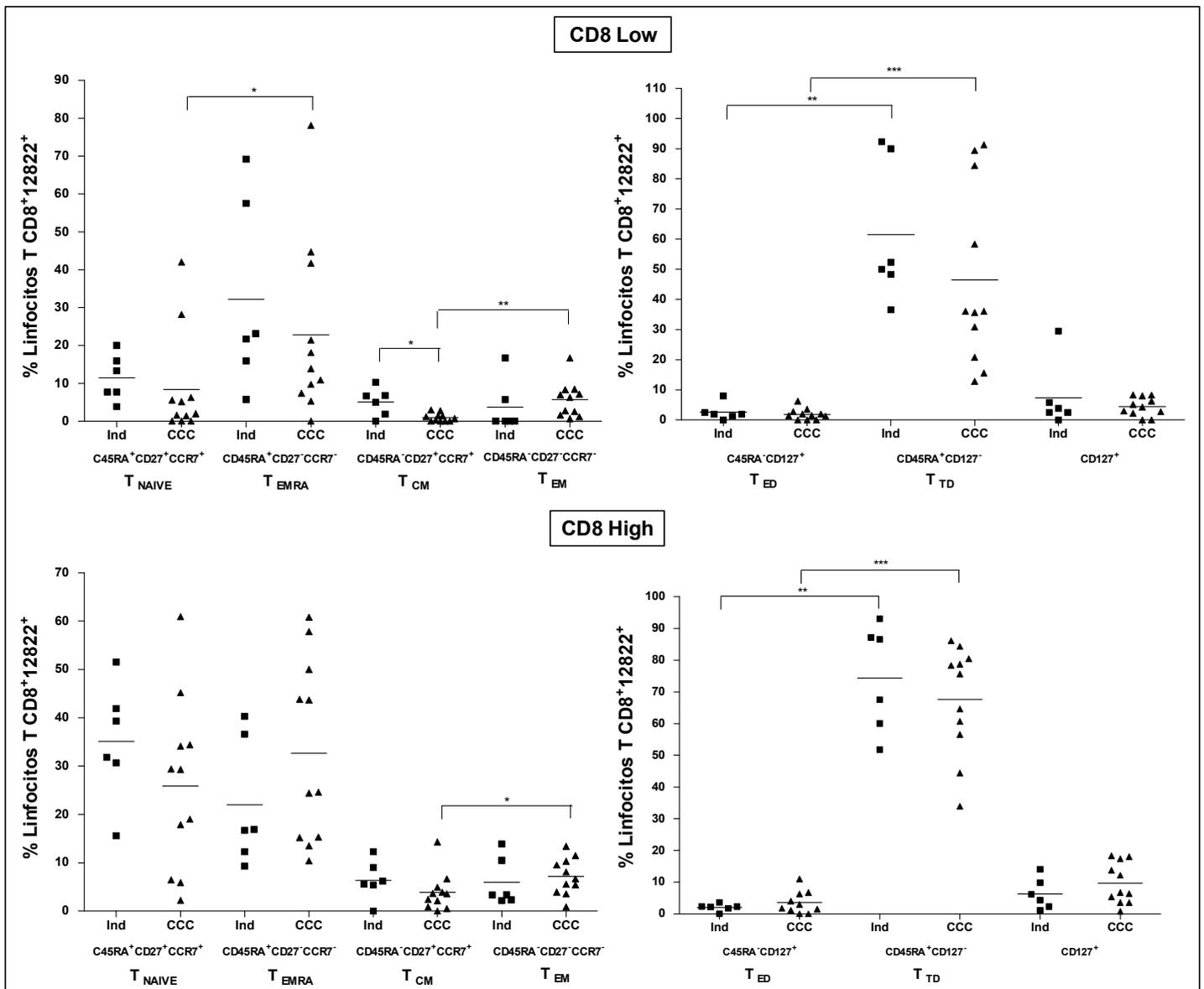


Figura R3.31.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítipo 12822 en pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo en linfocitos T $CD8_{LOW}$ y $CD8_{HIGH}$ epítipo-específicos. Se muestran los resultados obtenidos en 6 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). Combinando anticuerpos monoclonales frente a las moléculas de superficie CD45RA, CCR7, CD27, CD127 se establecen las siguientes subpoblaciones: T_{NAIVE} ($CD8^+CD45RA^+CD27^+CCR7^+$), T_{EMRA} ($CD8^+CD45RA^+CD27^-CCR7^+$) células de memoria efectora RA⁺, T_{CM} ($CD8^+CD45RA^-CD27^+CCR7^+$) células de memoria central, T_{EM} ($CD8^+CD45RA^-CD27^-CCR7^+$) células de memoria efectora, T_{ED} ($CD8^+CD45RA^-CD127^+$) células en diferenciación temprana, T_{TD} ($CD8^+CD45RA^+CD127^-$) células totalmente diferenciadas. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

En células 12822-específicas post-tratamiento con Benznidazol en CD8_{LOW} se mantiene un mayor porcentaje de linfocitos T CD8 de memoria no senescentes (CD44⁺CD57⁻) frente a CD44⁺CD57⁺ tanto en IND como en CCC ($P \leq 0,05$ y $P \leq 0,01$). No encontrándose diferencias entre pacientes según el grado de patología tal como se observaba en condiciones pre-tratamiento (Figura 6 sección 4.1.3). Interesantemente en linfocitos TCD8_{HIGH} se mantienen en CCC un mayor porcentaje de células de memoria senescentes CD44⁺CD57⁺ con respecto a pacientes en fase IND ($P \leq 0,05$) grupo en el cual se evidencia un mayor porcentaje de linfocitos no senescentes (CD44⁺CD57⁻) ($P \leq 0,01$) (figura R3.32).

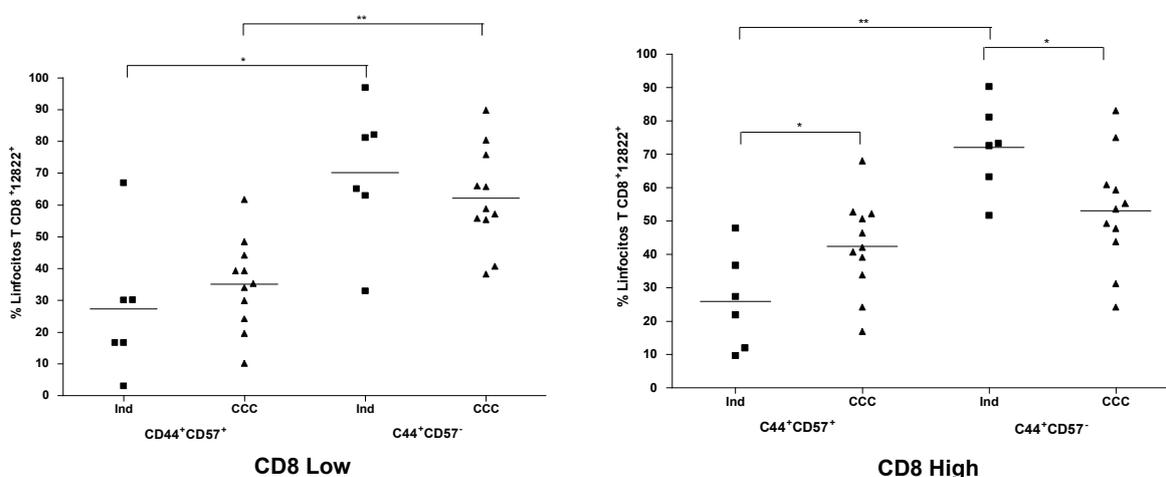


Figura R3.32.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo 12822 en pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. La expresión de las moléculas de superficie CD44 y CD57 fue determinada mediante citometría de flujo en linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. En las gráficas se representan el porcentaje de células 12822-específicas dentro de las subpoblaciones CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻, en 6 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardiaca (CCC). Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Modificaciones fenotípicas inducidas por el tratamiento con Benznidazol.

Los resultados obtenidos muestran que, el tratamiento con Benznidazol induce cambios sobre el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ 12822-específicos provenientes de pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada, observándose en CD8_{LOW} una disminución significativa ($P \leq 0,05$) del porcentaje de células específicas en condiciones post tratamiento. Contrariamente en CD8_{HIGH} se observa, un mayor porcentaje de linfocitos T CD8⁺ 12822-específicos tras el tratamiento con Benznidazol

($P \leq 0,05$) (figura R3.33). En pacientes en fase cardiaca no se observan cambios estadísticamente significativos tras el tratamiento farmacológico.

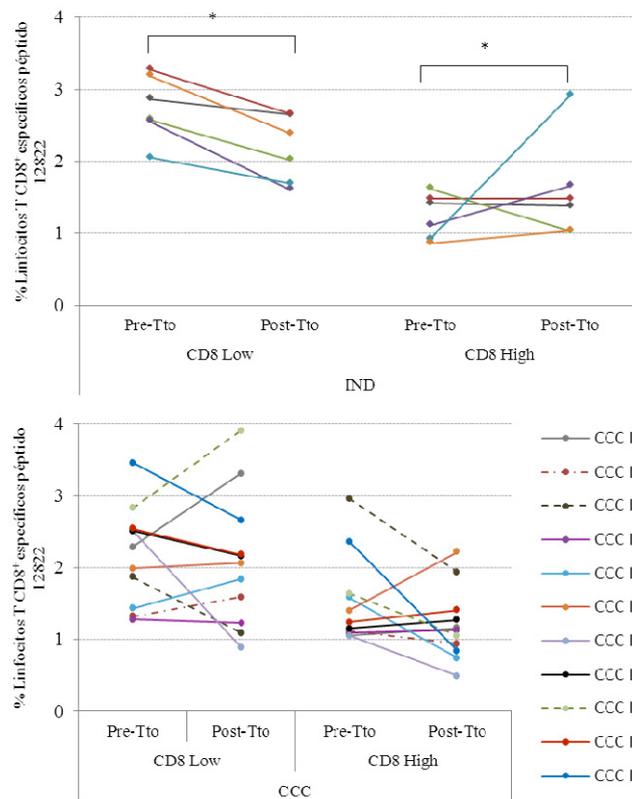


Figura R3.33.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítipo 12822 en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. En la gráfica se muestra para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos determinados pre tratamiento (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Las modificaciones post-tratamiento a nivel del fenotipo de memoria, y diferenciación de células TCD8⁺ 12822-específicas son observadas en la figura R3.34 en la cual se comparan los porcentajes de células péptido-específicas detectados en cada una de las subpoblaciones pre y post-tratamiento con Benznidazol. En pacientes en fase IND tras el tratamiento con Benznidazol se observa un menor porcentaje tanto de células T_{NAIVE} (CD8_{LOW}) como de células CD127⁺ (CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}) ($P \leq 0,05$), mientras que, en pacientes cardiacos se observa una disminución tanto en el porcentaje de células de memoria efectora T_{EMRA} (CD8_{LOW}) y T_{EM} (CD8_{HIGH}) ($P \leq 0,05$) como de células CD127⁺ (CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}) ($P \leq 0,01$ y $P \leq 0,05$).

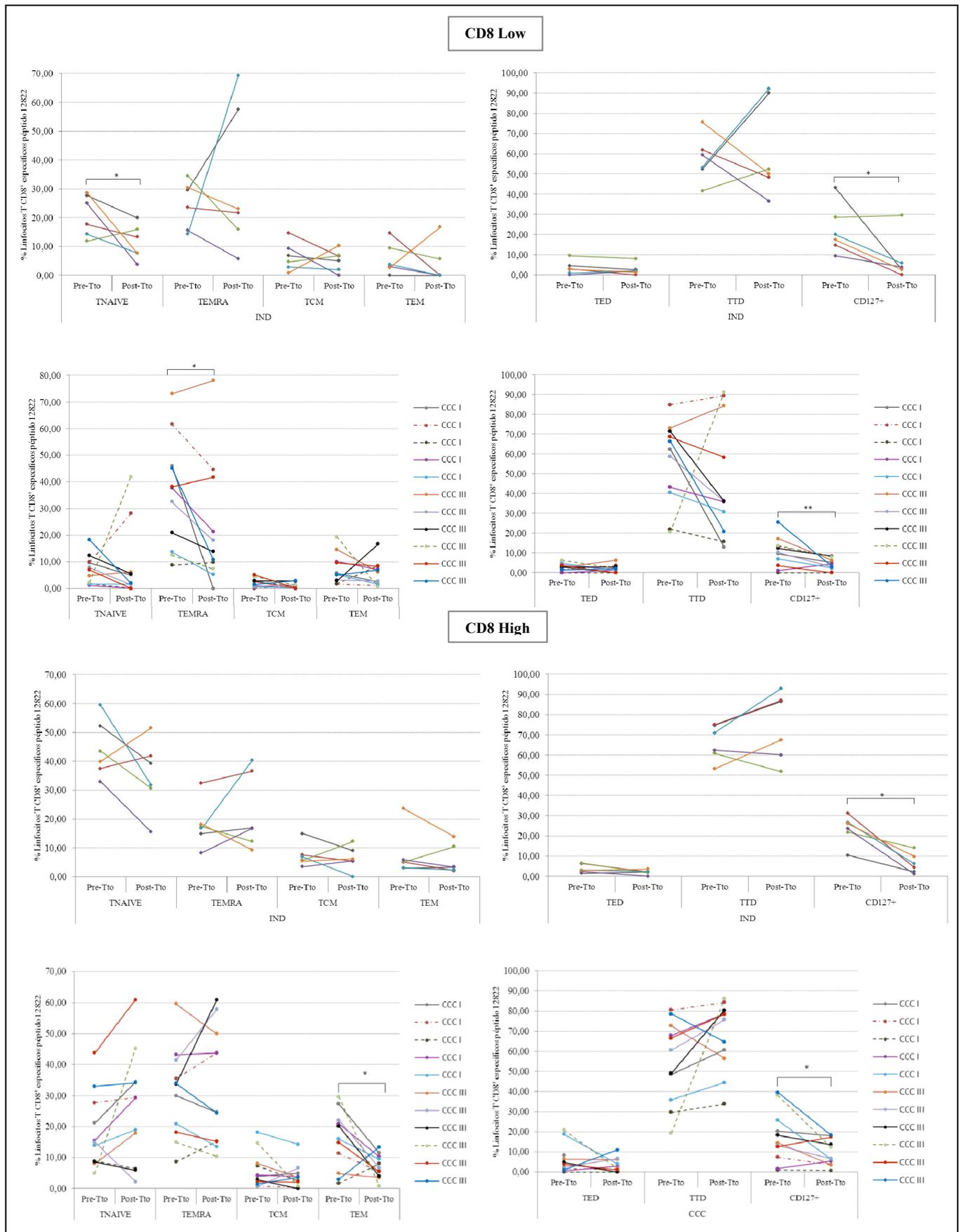


Figura R3.34.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítipo 12822 en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con

Benznidazol. Se muestra para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas, el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos dentro de las subpoblaciones T_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺), T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁺), T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺), T_{EM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁺), T_{ED} (CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺), T_{TD} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁺) y CD127⁺, en condiciones pre tratamiento (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

La caracterización y comparación del fenotipo de senescencia de linfocitos TCD8⁺ 12822-específicos pre y post tratamiento con Benznidazol permitió determinar que si bien hay cambios en el porcentaje de células específicas que expresan tanto CD44⁺CD57⁺ como CD44⁺CD57⁻ estos no son estadísticamente significativos (figura R3.35).

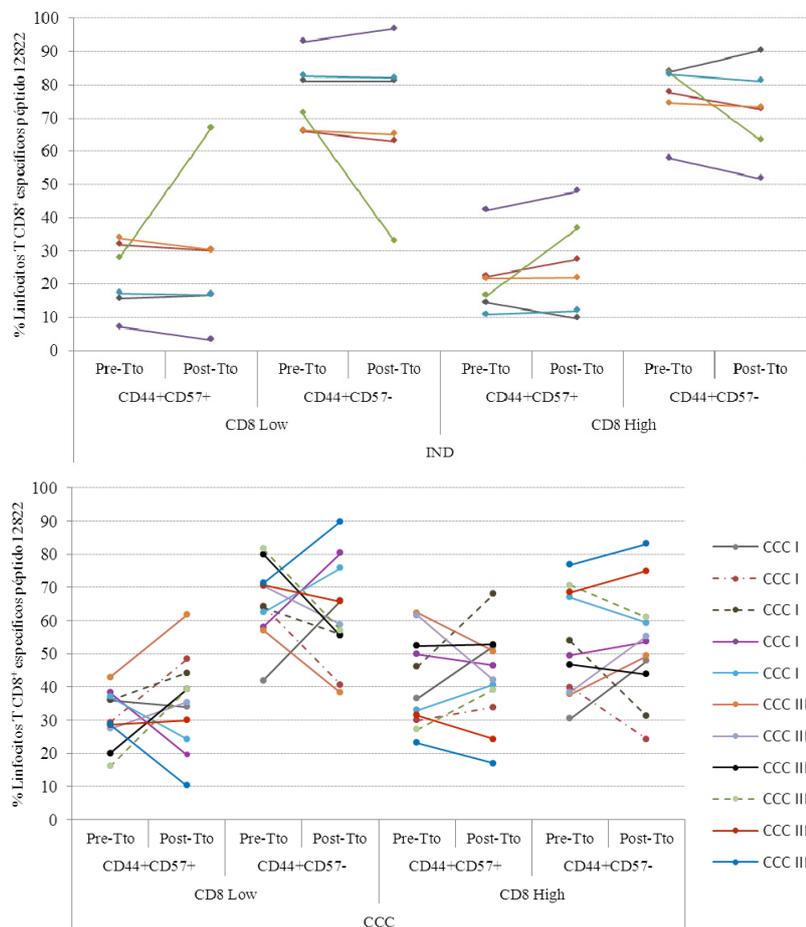


Figura R3.35.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo 12822 en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. . En la gráfica se muestra, para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas, el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos dentro de las subpoblaciones CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻, pre (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

4. 3.2.5.- Péptido 12827 contenido en la proteína TcCA-2

Caracterización fenotípica pre-tratamiento.

Los caracterización fenotípica pre tratamiento con Benznidazol en linfocitos T CD8⁺ 12827-específicos se detalla en la sección 4.1.3 (Egui et al manuscrito en preparación). Brevemente, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ 12827-específicos fue significativamente mayor en IND y CCC con respecto a individuos sanos tanto en CD8_{LOW} como CD8_{HIGH} (P≤0,01). Así mismo en ambos grupos de pacientes el porcentaje de células 12827-específicas es superior en la subpoblación CD8_{LOW} (P≤0,01). Cuando son evaluadas las poblaciones de memoria péptido-específicas se observa que el porcentaje de células que expresan CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺ (T_{NAIVE}) es superior en pacientes IND con respecto a CCC (P≤0,05), sin embargo no hay diferencias según el grado de patología en las poblaciones CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺ (T_{CM}), CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻ (T_{EMRA}) y no así en la subpoblación CD8_{High}CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻ (T_{EM}) en la que se observa un mayor porcentaje en CCC con respecto a IND (P≤0,05). Entre los IND observamos en CD8_{LOW} un fenotipo principalmente T_{EMRA} frente a T_{NAIVE} (P≤0,05) mientras que en CD8_{HIGH} se observa contrariamente un fenotipo principalmente T_{NAIVE} frente a T_{EMRA} (P≤0,05). En CCC se determina tanto en CD8_{LOW} y CD8_{HIGH} una mayoritaria expresión tanto de células T_{EMRA} frente a las células T_{NAIVE} (P≤0,001 y P≤0,05), como de T_{EM} frente a T_{CM} (P≤0,05 y P≤0,001). En cuanto al nivel de diferenciación se mantiene que en CD8_{LOW} y CD8_{HIGH} la expresión del fenotipo CD45RA⁺CD127⁻ (T_{TD}) en pacientes IND y CCC es significativamente mayor (P≤0,01 and P≤0,001) respecto a CD45RA⁻CD127⁺ (T_{ED}) mientras que no se observan diferencias según el grado de patología en la expresión del marcador CD127.

Así mismo, en estas células 12827-específicas se determinó un mayor porcentaje de células CD44⁺CD57⁻ frente a CD44⁺CD57⁺ (linfocitos T CD8 de memoria senescentes) (P≤0,01 y P≤0,001) tanto en IND como en CCC. En CCC en linfocitos TCD8_{HIGH} se observa mayor porcentaje de células de memoria senescentes CD44⁺CD57⁺ con respecto a pacientes en fase IND (P≤0,001) grupo en el cual se evidencia un mayor porcentaje de linfocitos no senescentes (CD44⁺CD57⁻) (P≤0,001).

Caracterización fenotípica post-tratamiento con Benznidazol.

Tras el tratamiento con Benznidazol el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ 12827-específicos se mantiene significativamente mayor en IND y CCC con respecto a individuos sanos tanto en CD8_{LOW} como CD8_{HIGH} ($P \leq 0,01$). En los pacientes en fase cardiaca el porcentaje de células 12827-específicas es superior en la subpoblación CD8_{LOW} ($P \leq 0,01$), sin embargo en este grupo de pacientes se observa post-tratamiento una disminución del porcentaje de células 12827-específicas teniendo pacientes (CCC rango de frecuencia 0,77-1,47%) con porcentajes inferiores a los detectados en individuos sanos (rango de frecuencia 0,55-0,87%) (figura R3.36).

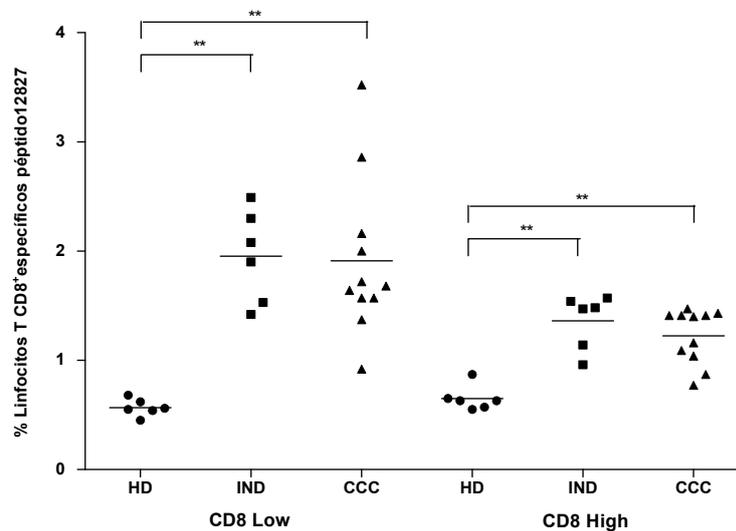


Figura R3.36.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítipo 12827 en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo empleando dextrámeros del péptido 12827. Los resultados muestran los porcentajes obtenidos en 6 individuos sanos (HD), 6 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardiaca (CCC). El porcentaje de linfocitos epítipo-específicos fue evaluado dentro de las poblaciones CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de células TCD8⁺-específicas en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Cuando son evaluadas las poblaciones de memoria péptido-específicas se observa que post-tratamiento en CD8_{LOW} el porcentaje de células que expresan CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺ (T_{NAIVE}) se mantiene significativamente superior en pacientes IND con respecto a CCC ($P \leq 0,05$), grupo en el cual se mantiene una mayoritaria población de células T_{EMRA} frente a las células T_{NAIVE} ($P \leq 0,001$), y no así de T_{EM} frente a T_{CM}. En CD8_{HIGH} no se observan diferencias entre las subpoblaciones T_{NAIVE} o T_{EMRA}

en ninguno de los grupos de pacientes, así mismo se pierden las diferencias encontradas pre-tratamiento entre IND y CCC en las subpoblaciones T_{NAIVE} y T_{EM} , manteniéndose solo en CCC una mayoritaria población de células efectoras de memoria (T_{EM}) con respecto a células de memoria central (T_{CM}) ($P \leq 0,05$) (figura R3.37).

En cuanto al nivel de diferenciación se mantiene en ambos grupos de pacientes dentro de las poblaciones $CD8_{LOW}$ y $CD8_{HIGH}$ un mayor porcentaje de células totalmente diferenciadas $CD45RA^+CD127^-$ ($P \leq 0,01$ and $P \leq 0,001$) (figura R3.37).

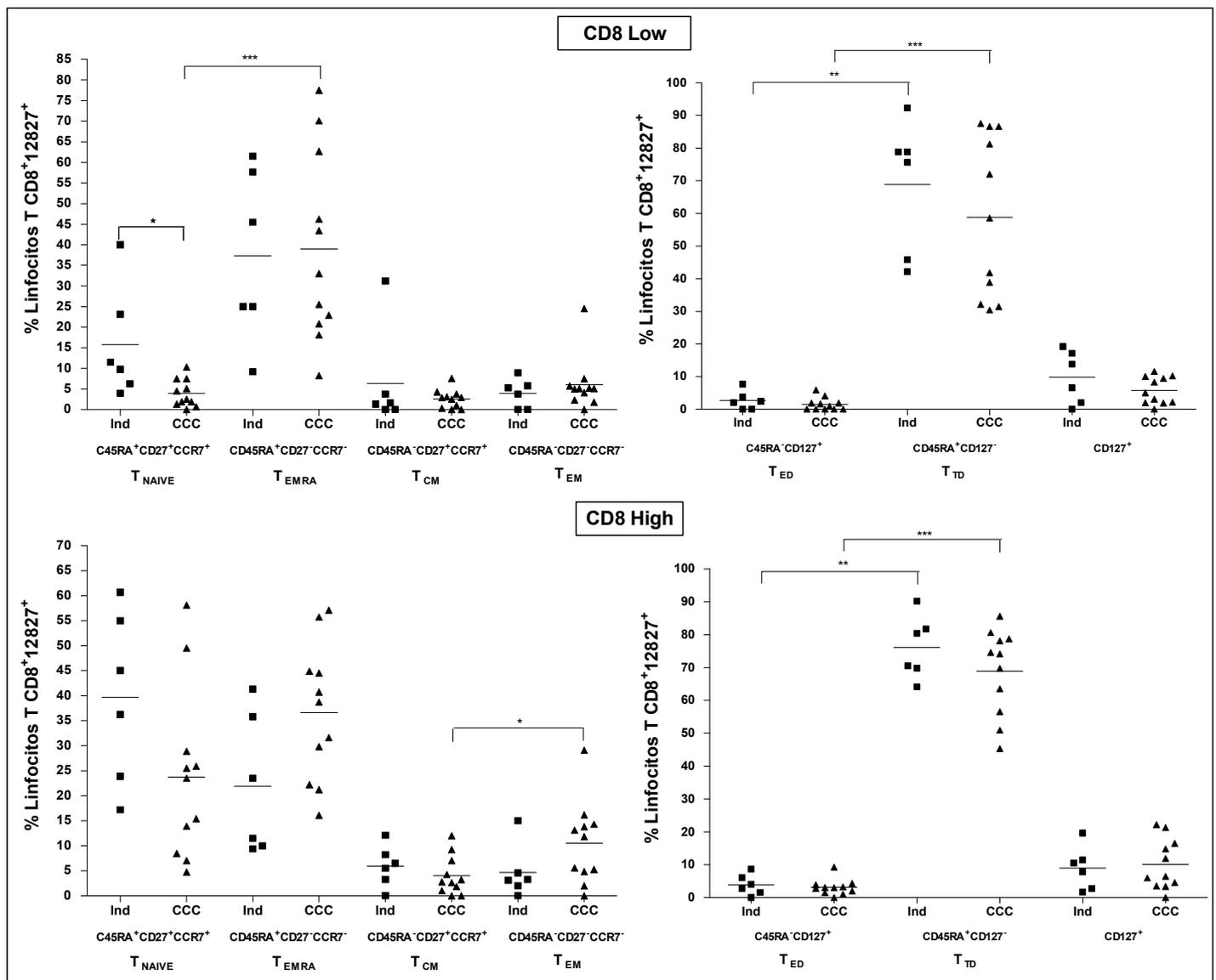


Figura R3.37.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítotope 12827 en pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo en linfocitos T $CD8_{LOW}$ y $CD8_{HIGH}$ epítotope-específicos. Se muestran los resultados obtenidos en 6 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardíaca (CCC). Combinando anticuerpos monoclonales frente a las moléculas de superficie $CD45RA$, $CCR7$, $CD27$, $CD127$ se establecen las siguientes subpoblaciones:

T_{NAIVE} ($CD8^+CD45RA^+ CD27^+ CCR7^-$), T_{EMRA} ($CD8^+CD45RA^+ CD27^- CCR7^-$) células de memoria efectora RA^+ , T_{CM} ($CD8^+CD45RA^-CD27^+CCR7^+$) células de memoria central, T_{EM} ($CD8^+CD45RA^-CD27^-CCR7^-$) células de memoria efectora, T_{ED} ($CD8^+CD45RA^-CD127^+$) células en diferenciación temprana, T_{TD} ($CD8^+CD45RA^+CD127^-$) células totalmente diferenciadas. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como $*P\leq 0,05$, $**P\leq 0,01$, $***P\leq 0,001$.

Tras el tratamiento con Benznidazol en linfocitos TCD8⁺ 12827-específicos se observan cambios con respecto a la expresión de CD57. En pacientes en fase IND ($CD8_{HIGH}$ y no en CD_{LOW}) y CCC ($CD8_{LOW}$) se mantiene un mayor porcentaje de células $CD44^+CD57^-$ frente a $CD44^+CD57^+$ (linfocitos T CD8 de memoria senescentes) ($P\leq 0,01$) (figura R3.38). Sin embargo, en $CD8_{HIGH}$ no se observan diferencias significativas según el grado de patología, entre las poblaciones $CD44^+CD57^-$ y $CD44^+CD57^+$ tal como se detectaba pre-tratamiento (Figura 6 sección 4.1.3).

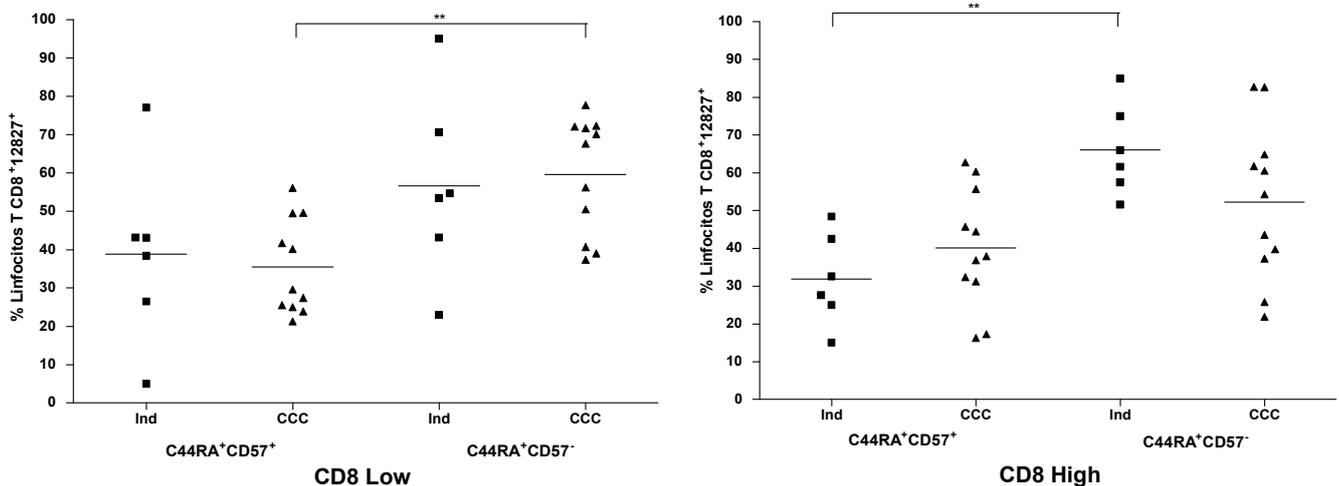


Figura R3.38.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo 12827 en pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. La expresión de las moléculas de superficie CD44 y CD57 fue determinada mediante citometría de flujo en linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. En las gráficas se representan el porcentaje de células 12827-específicas dentro de las subpoblaciones $CD44^+CD57^+$ y $CD44^+CD57^-$, en 6 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 11 en fase cardiaca (CCC). Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como $*P\leq 0,05$, $**P\leq 0,01$, $***P\leq 0,001$.

Modificaciones fenotípicas inducidas por el tratamiento con Benznidazol.

Los resultados obtenidos mostrados en la figura R3.39 indican que, la frecuencia de linfocitos T CD8_{LOW} 12827-específicos disminuyó significativamente en el grupo de pacientes indeterminados tras el tratamiento con Benznidazol ($P\leq 0,05$). En pacientes en fase cardiaca de la enfermedad los cambios observados post-tratamiento no son estadísticamente significativos.

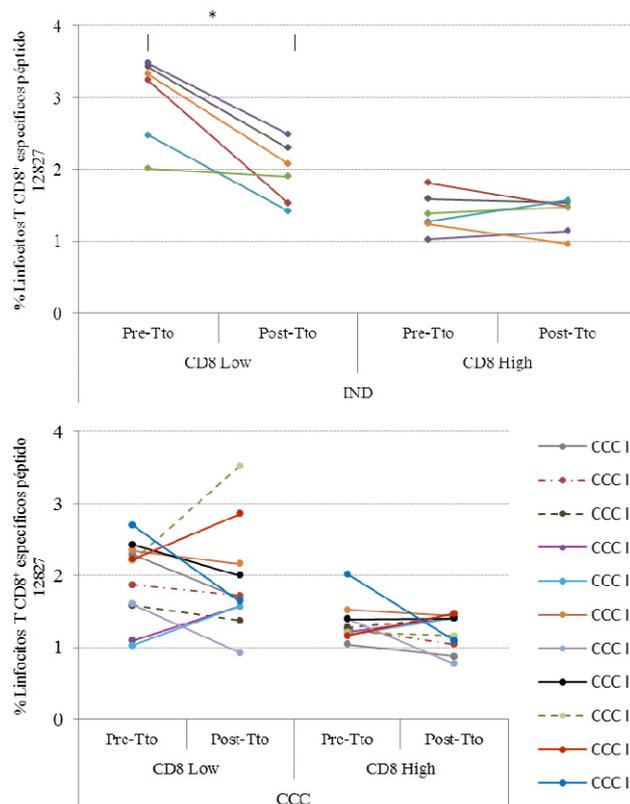
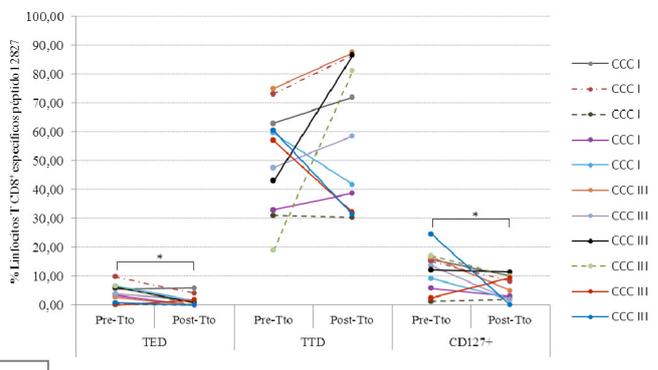
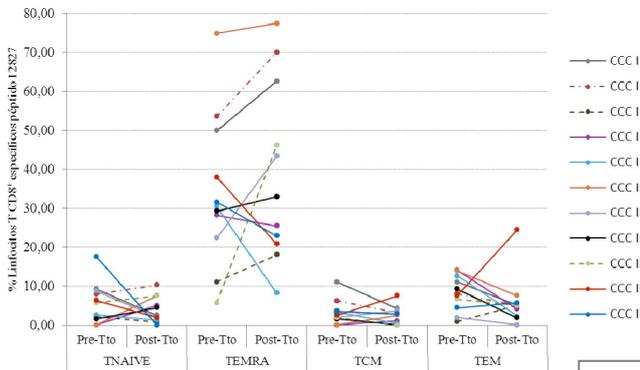
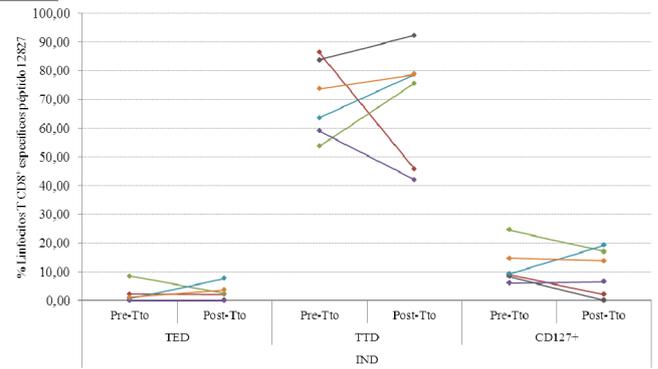
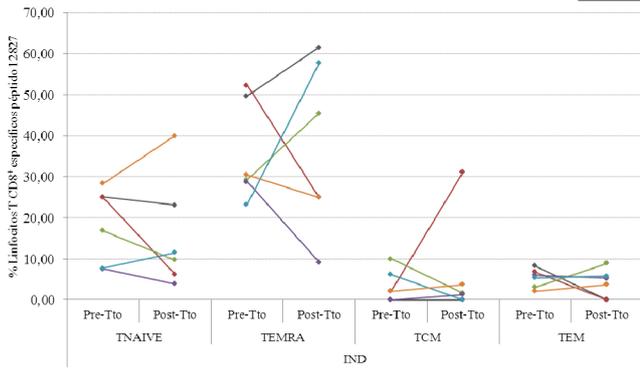


Figura R3.39.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítipo 12827 en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. En la gráfica se muestra para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos determinados pre tratamiento (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

En la figura R3.40 se observa que, existen cambios estadísticamente significativos post-tratamiento con Benznidazol a nivel del fenotipo de memoria y diferenciación de células TCD8⁺ 12827-específicas. En pacientes en fase IND estos cambios se evidencian en un aumento del porcentaje de células epítipes específicas CD8_{HIGH} totalmente diferenciadas (T_{TD}) así como en una disminución de células que expresan la proteína de superficie CD127⁺ ($P \leq 0,05$). Por otro lado, en pacientes en fase CCC en la subpoblación CD8_{LOW} detectamos post-tratamiento con Benznidazol un descenso tanto del porcentaje de células T_{ED} como de células CD127⁺ ($P \leq 0,05$). Mientras que, en CD8_{HIGH} se observa tanto una caída del porcentaje de células de memoria efectora (T_{EM}) como un incremento del porcentaje de células T_{TD} ($P \leq 0,05$ y $P \leq 0,01$).

CD8 Low



CD8 High

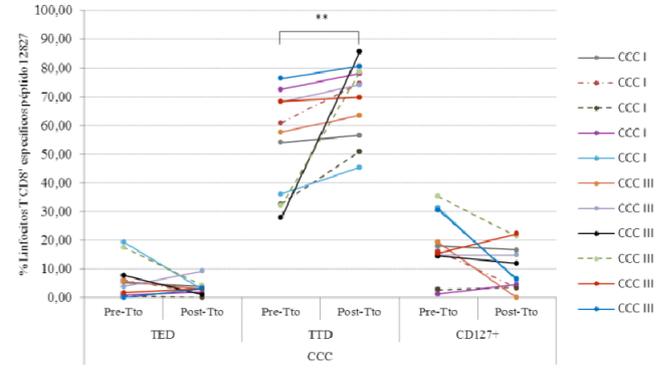
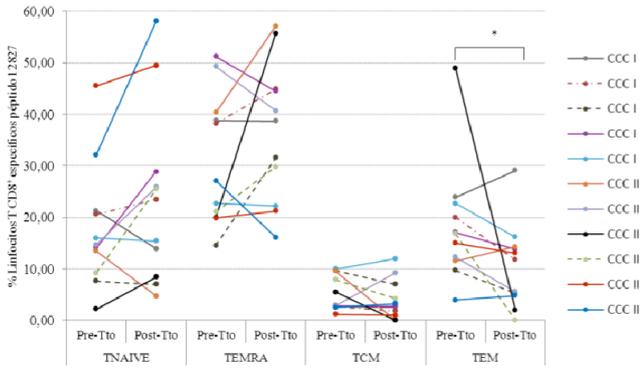
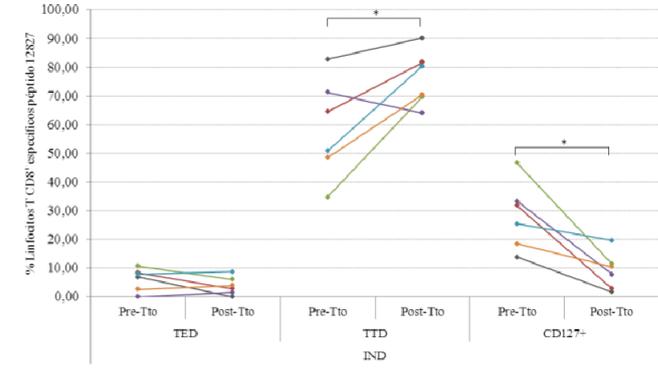
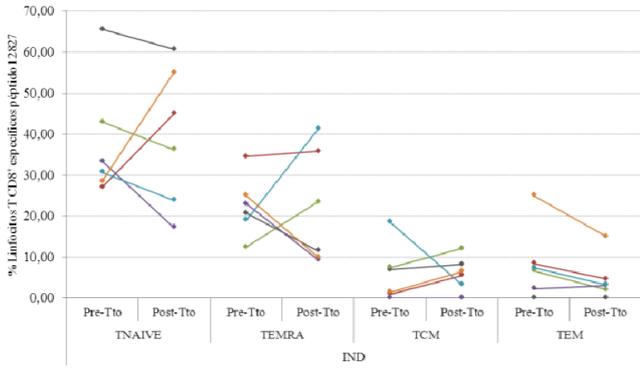


Figura R3.40.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítipo 12827 en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. Se muestra para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas, el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos dentro de las subpoblaciones T_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁺ CCR7⁻), T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁻ CCR7⁻), T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺), T_{EM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻ CCR7⁻), T_{ED} (CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺), T_{TD} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻) y CD127⁺, en condiciones pre tratamiento (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤ 0,001.

La caracterización fenotípica de células de memoria senescente 12827-específicas muestra que, tras el tratamiento con Benznidazol hay cambios a nivel de individuo (disminución o aumento) en el porcentaje de células que expresan la molécula de superficie CD57, provenientes de pacientes con enfermedad de Chagas tanto en fase IND como en fase CCC. Sin embargo estos cambios no son estadísticamente significativos dentro de las subpoblaciones caracterizadas CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻ (CD8_{LOW}/CD8_{HIGH}). En pacientes en fase IND, se observa tanto en CD8_{LOW} como CD8_{HIGH} pre y pos-tratamiento que los pacientes ensayados tienen un mayor porcentaje de células no senescentes (CD44⁺CD57⁻) *versus* CD44⁺CD57⁺.

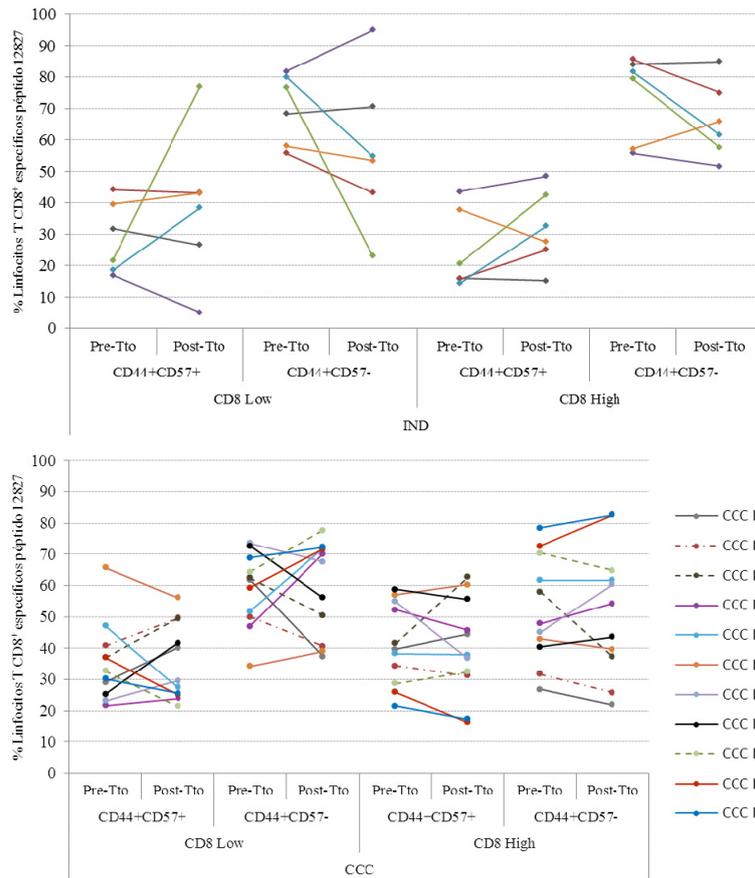


Figura R3.41.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo 12827 en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. . En la gráfica se muestra, para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas, el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos dentro de las subpoblaciones CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻, pre (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

4.3.2.6.- Péptido K1 contenido en la proteína KMP11.

Caracterización fenotípica pre-tratamiento.

En pacientes con enfermedad de Chagas (IND y CCC) y no en individuos sanos se detectan poblaciones péptido específicas, en ambas subpoblaciones T CD8 (LOW y HIGH) para el péptido K1 presente en el antígeno KMP11 de *T. cruzi* (figura R3.43). El porcentaje de linfocitos CD8_{HIGH} K1-específicos en individuos sanos se mantiene invariable mientras que en los pacientes enfermedad de Chagas se observa un menor porcentaje de células K1-específicas con respecto a CD8_{LOW}, a pesar que el porcentaje de células específicas disminuye este sigue siendo 2 veces superior con respecto a individuos sanos ($P \leq 0,05$ y $P \leq 0,001$). Sin embargo, como se muestra en la figura R3.43, en linfocitos T CD8_{HIGH} en fase IND se observan dos pacientes en los cuales no se detectan células K1-específicas, encontrando un porcentaje de células específicas (0,48 y 0,71%) comprendido dentro de los rangos detectados en los individuos sanos (rango de frecuencia 0,27– 0,69).

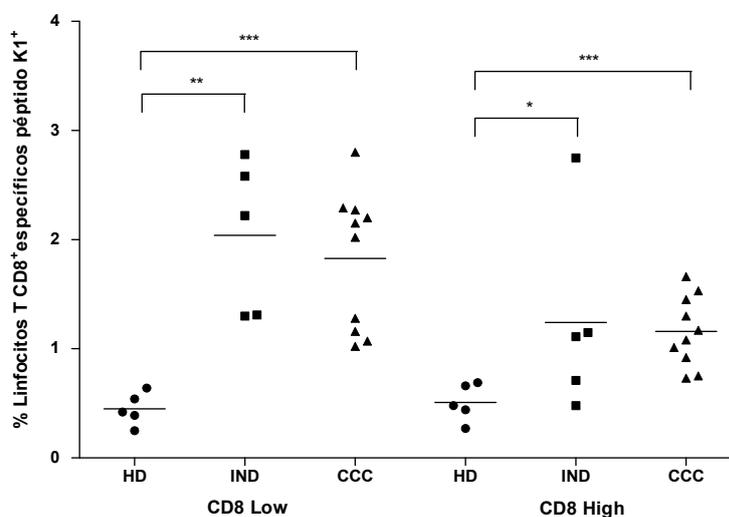


Figura R3.42.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítipo K1 en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Chagas. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo empleando dextrámeros del péptido K1. Los resultados muestran los porcentajes obtenidos en 5 individuos sanos (HD), 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 10 en fase cardiaca (CCC). El porcentaje de linfocitos epítipo-específicos fue evaluado dentro de las poblaciones CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de células TCD8⁺-específicas en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

La caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación muestra que, en pacientes tanto en fase IND ($CD8_{LOW}$) como en fase CCC ($CD8_{HIGH}$) se detecta un mayor porcentaje de células K1-específicas $CD45RA^+CD27^+CCR7^+$ (T_{NAIVE}) *versus* células T_{EMRA} ($P \leq 0,05$), así mismo en pacientes en fase IND dentro de la subpoblación $CD8_{HIGH}$ se observa un mayor porcentaje de células de memoria efectora $CD45RA^-CD27^-CCR7^-$ *versus* linfocitos T de memoria central ($P \leq 0,05$). En cuanto al nivel de diferenciación celular en ambos grupos de pacientes dentro de las poblaciones $CD8_{LOW}$ y $CD8_{HIGH}$ se observa un mayor porcentaje de células totalmente diferenciadas T_{TD} $CD45RA^+CD127^-$ *versus* T_{ED} ($P \leq 0,01$ and $P \leq 0,001$). Para ninguna de las subpoblaciones caracterizadas se observan diferencias significativas entre pacientes según el grado de patología de la enfermedad (figura R3.43).

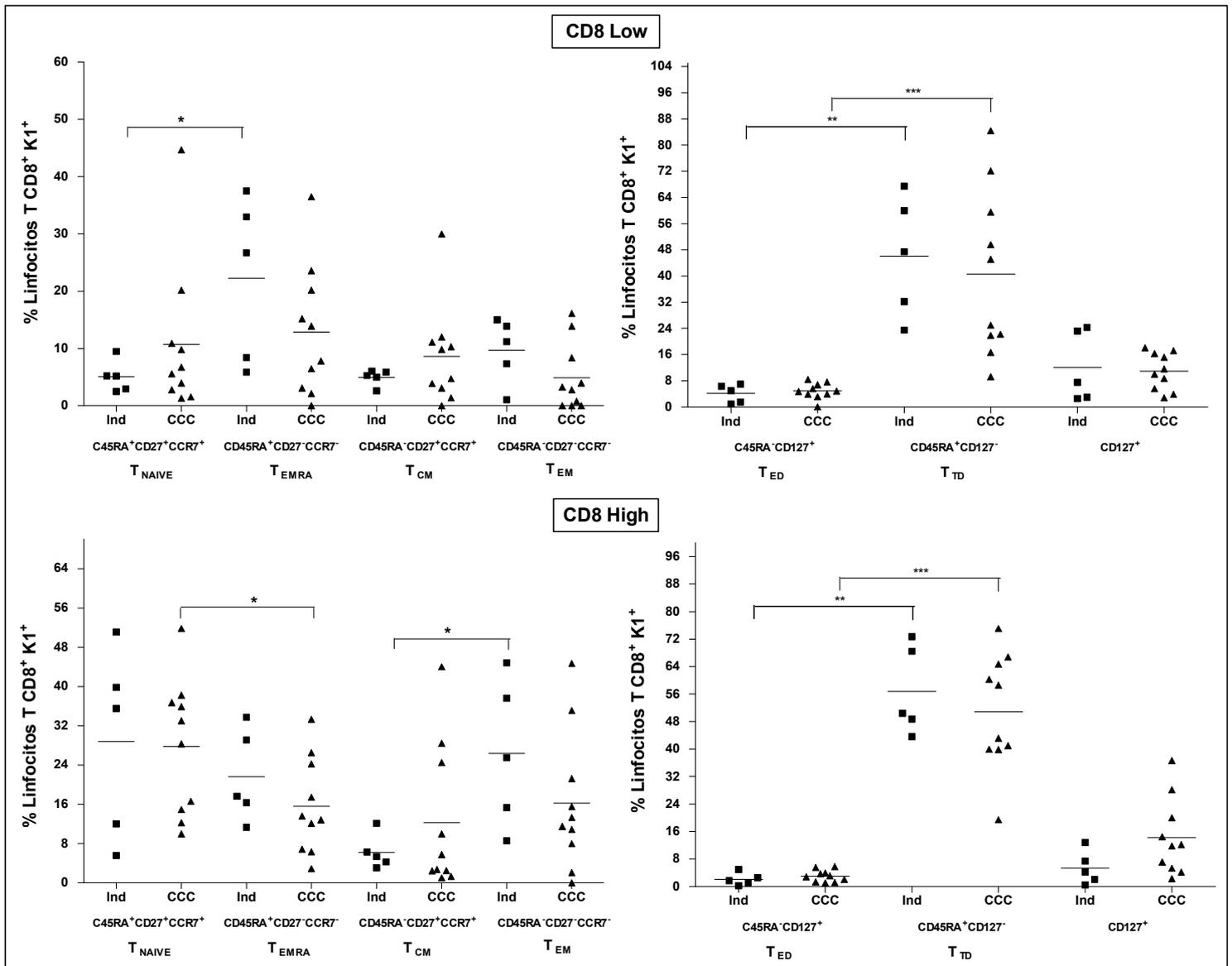


Figura R3.43.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítotope K1 en pacientes con enfermedad de Chagas. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo en linfocitos T CD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítotope-específicos. Se muestran los resultados obtenidos en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 10 en fase cardiaca (CCC). Combinando anticuerpos monoclonales frente a las moléculas de superficie CD45RA, CCR7, CD27, CD127 se establecen las siguientes subpoblaciones: T_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁺ CCR7⁻), T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁻ CCR7⁻) células de memoria efectora RA⁺, T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁻ CD27⁺ CCR7⁺) células de memoria central, T_{EM} (CD8⁺CD45RA⁻ CD27⁻ CCR7⁻) células de memoria efectora, T_{ED} (CD8⁺CD45RA⁻ CD127⁺) células en diferenciación temprana, T_{TD} (CD8⁺CD45RA⁺ CD127⁻) células totalmente diferenciadas. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

Los resultados representados en la figura R3.44 muestran que en Linfocitos TCD8⁺ K1-específicos se detecta un mayor porcentaje de linfocitos de memoria (CD44⁺CD57⁺) senescentes *versus* células no senescentes (CD44⁺CD57⁻) tanto en pacientes en fase IND (CD8_{LOW}) como en fase CCC (CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}) (P≤0,001 y P≤0,01). Entre pacientes IND y CCC no se encuentran diferencias significativas sin embargo, en los pacientes en fase CCC hay un mayor porcentaje de células CD44⁺CD57⁺ epítoto específicas.

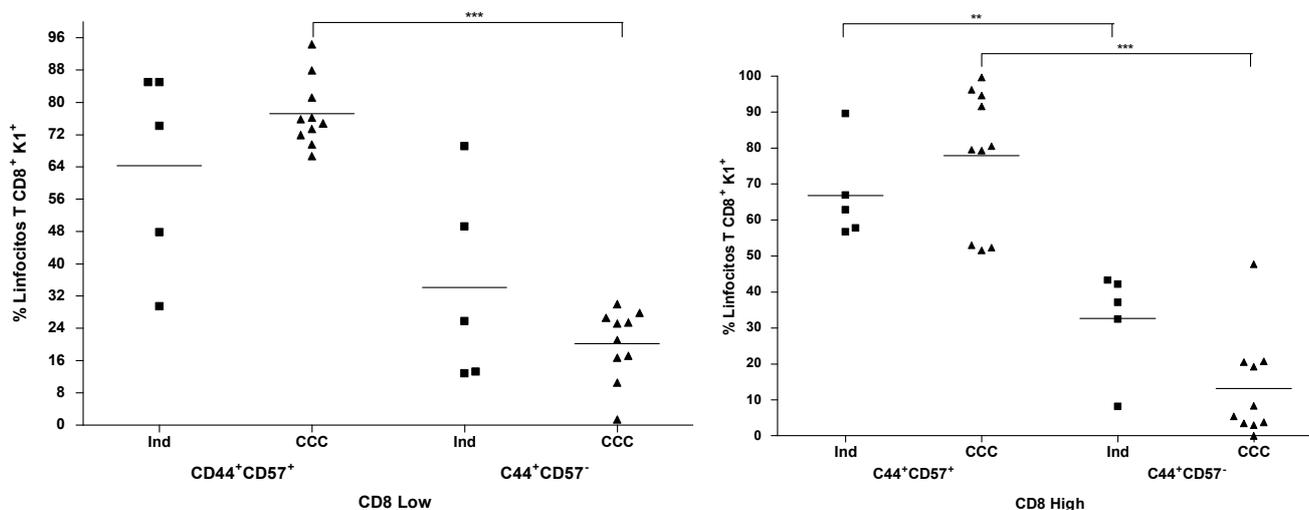


Figura R3.44.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítotope K1 en pacientes con enfermedad de Chagas. La expresión de las moléculas de superficie CD44 y CD57 fue determinada mediante citometría de flujo en linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítotope-específicos. En las gráficas se representan el porcentaje de células K1-específicas dentro de las subpoblaciones CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻, en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 10 en fase cardiaca (CCC). Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001.

Caracterización fenotípica post-tratamiento con Benznidazol.

En pacientes con enfermedad de Chagas (IND y CCC) que han sido tratados con Benznidazol se observa una disminución del porcentaje de células TCD8 K1-específicas. En la subpoblación CD8_{LOW} se mantiene que en en ambos grupos de pacientes el porcentaje de células específicas es estadísticamente superior *versus* controles sanos ($P \leq 0,01$) no así en CD8_{HIGH} donde se observa que no hay diferencias entre el porcentaje de células K1-específicas entre pacientes en fase IND e individuos sanos, manteniéndose esta diferencia entre pacientes en fase CCC *versus* HD ($P \leq 0,01$). En lo pacientes con enfermedad de Chagas se mantiene un mayoritario porcentaje de células específicas en la subpoblación CD8_{LOW} con respecto a CD8_{HIGH} población en la cual se observa que para 2 pacientes en fase IND y 2 en fase CCC se detectan porcentaje de células PFR3₄₂₈₋₄₃₆-específicas a nivel de los detectados en controles sanos (figura R3.45).

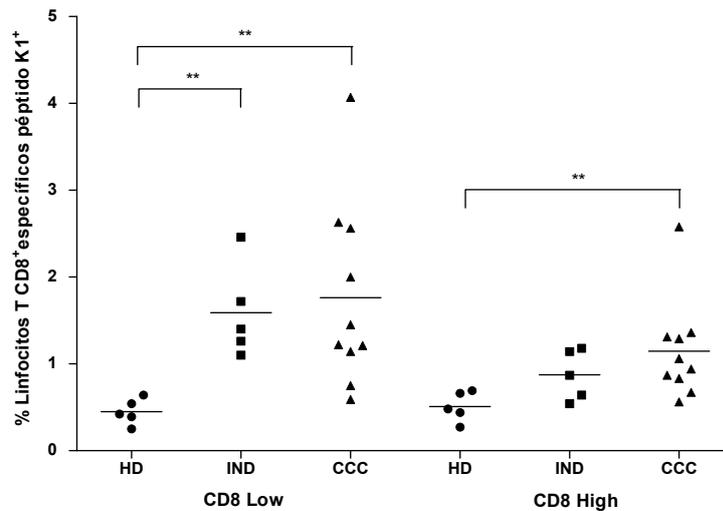


Figura R3.45.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítoto K1 en individuos sanos y pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo empleando dextrámeros del péptido K1. Los resultados muestran los porcentajes obtenidos en 5 individuos sanos (HD), 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 10 en fase cardíaca (CCC). El porcentaje de linfocitos epítoto-específicos fue evaluado dentro de las poblaciones CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de células TCD8⁺-específicas en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Tras el tratamiento con Benznidazol se observa que, en pacientes tanto en fase IND (CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}) como en fase CCC (CD8_{HIGH}) se mantiene un mayor porcentaje de células K1-específicas CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺ (T_{NAIVE}) *versus* células T_{EMRA} (P≤0,05), mientras que, en pacientes en fase IND dentro de la subpoblación CD8_{HIGH} no se observan diferencias entre el porcentaje de células de memoria efectora CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻ *versus* linfocitos T de memoria central tal como era detectado previo el tratamiento, sin embargo, se detecta un aumento del porcentaje de células K1-específicas de memoria efectora en pacientes en fase IND con respecto a CCC (figura R3.46).

Por otro lado el nivel de diferenciación celular en ambos grupos de pacientes dentro de las poblaciones CD8_{LOW} y CD8_{High}, se mantiene superior en la población de células totalmente diferenciadas T_{TD} CD45RA⁺CD127⁻ *versus* T_{ED} (P≤0,01 and P≤0,001) (figura R3.46).

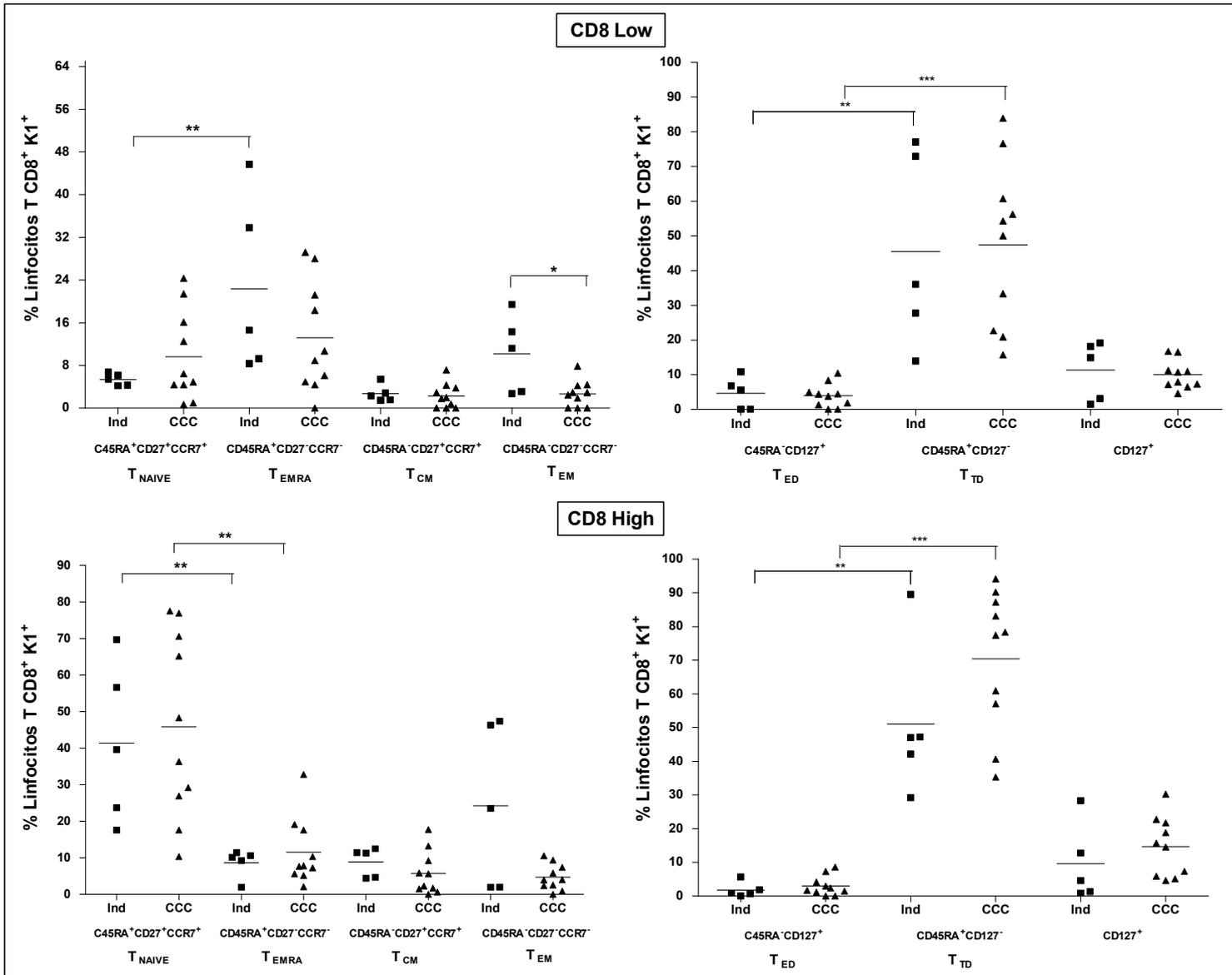


Figura R3.46.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítipo K1 en pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. Los datos fueron determinados mediante citometría de flujo en linfocitos T CD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. Se muestran los resultados obtenidos en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 10 en fase cardíaca (CCC). Combinando anticuerpos monoclonales frente a las moléculas de superficie CD45RA, CCR7, CD27, CD127 se establecen las siguientes subpoblaciones: T_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁺), T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻) células de memoria efectora RA⁺, T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺) células de memoria central, T_{EM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻) células de memoria efectora, T_{ED} (CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺) células en diferenciación temprana, T_{TD} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻) células totalmente diferenciadas. Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

La caracterización de las células que expresan las proteínas de superficie CD44 y CD57 en PBMC de pacientes tratados con Benznidazol muestra que, se mantiene un mayor porcentaje de linfocitos de memoria senescentes (CD44⁺CD57⁺) *versus* células no senescentes (CD44⁺CD57⁻) tanto en pacientes en fase IND como en fase CCC

(CD8_{LOW} y CD8_{HIGH}) ($P \leq 0,001$ y $P \leq 0,01$). Entre pacientes IND y CCC no se encuentran diferencias significativas sin embargo, se mantiene un mayor porcentaje de células CD44⁺CD57⁺ en pacientes en fase CCC (figura R3.47).

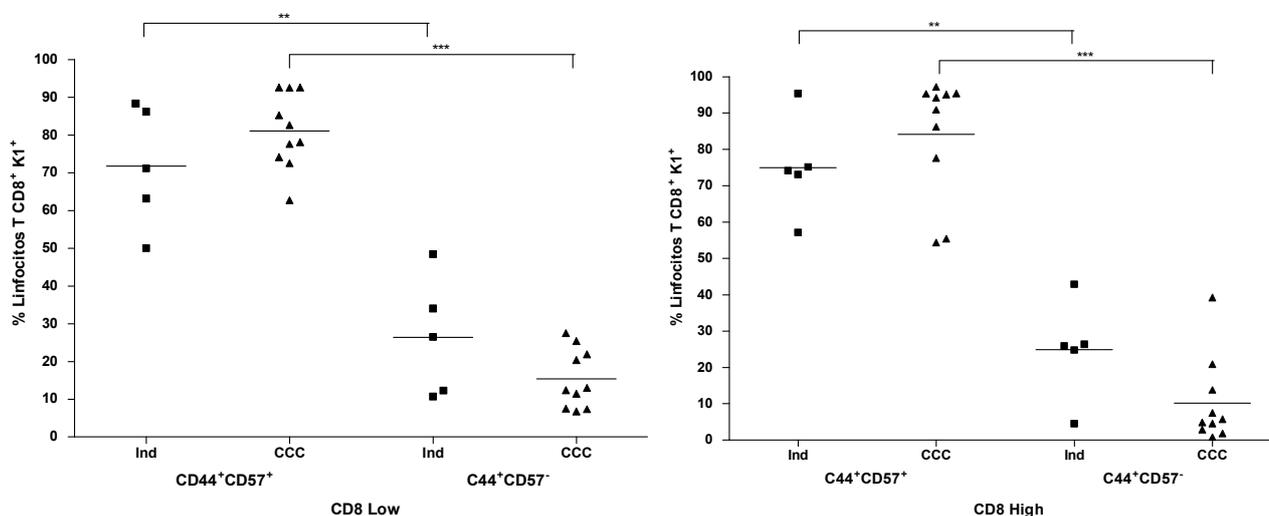


Figura R3.47.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo K1 en pacientes con enfermedad de Chagas tratados con Benznidazol. La expresión de las moléculas de superficie CD44 y CD57 fue determinada mediante citometría de flujo en linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos. En las gráficas se representan el porcentaje de células K1-específicas dentro de las subpoblaciones CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻, en 5 pacientes con enfermedad de Chagas en fase indeterminada (IND) y 10 en fase cardíaca (CCC). Las líneas horizontales representan la media del porcentaje de cada subpoblación en el grupo de pacientes ensayados. Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001.

Modificaciones fenotípicas inducidas por el tratamiento con Benznidazol.

La comparativa entre el porcentaje de células K1-específicas en condiciones pre y post-tratamiento con Benznidazol es representada en la figura R3.48. En pacientes tanto en fase IND (4 de 5 (CD8_{LOW}) y 3 de 5 (CD8_{HIGH})) como CCC (6 de 11 (CD8_{LOW}) y 7 de 11 (CD8_{HIGH})) se observa una disminución no significativa del porcentaje de células epítipes específicas.

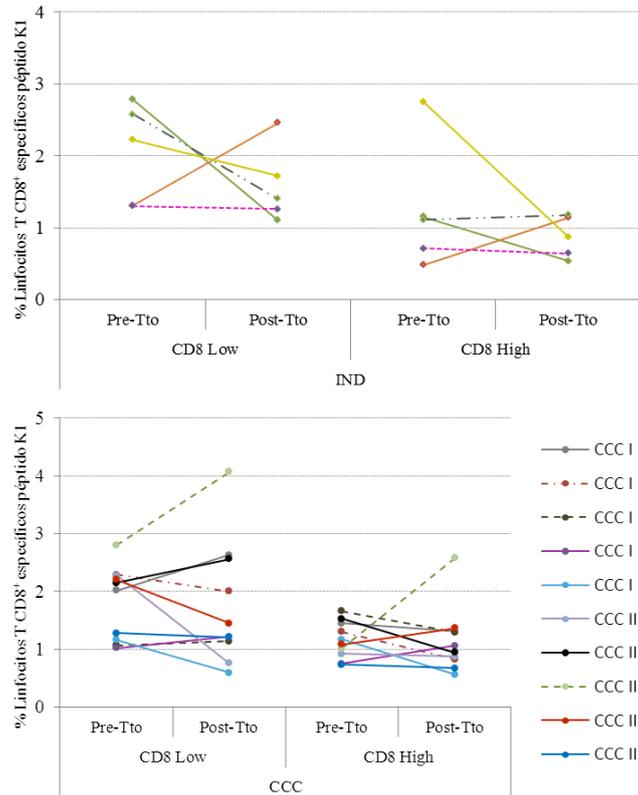
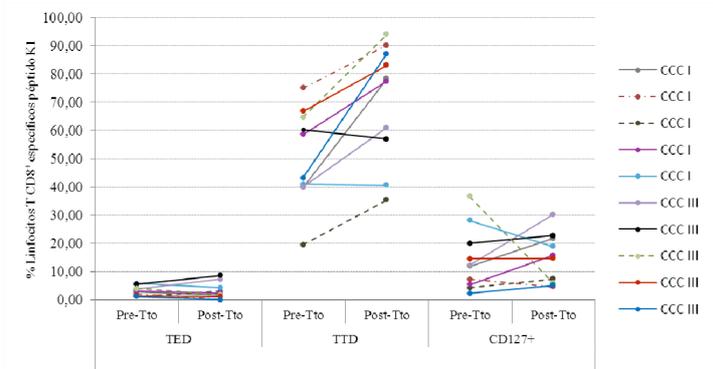
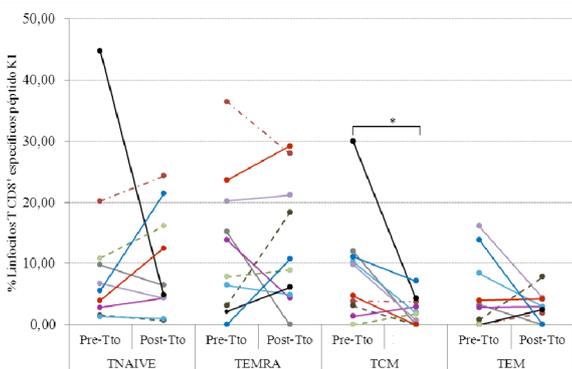
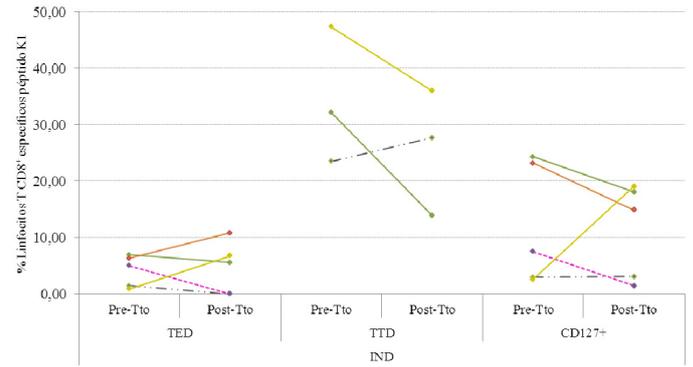
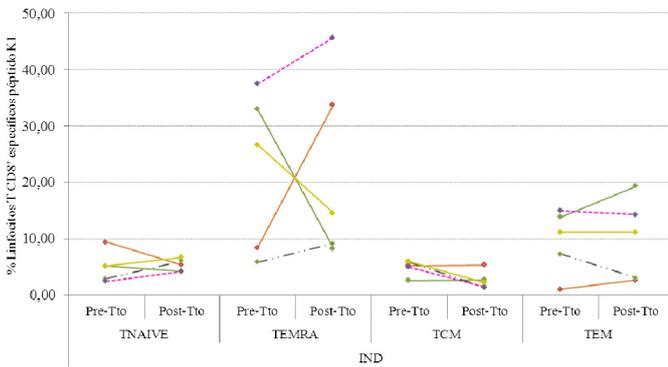


Figura R3.48.- Porcentaje de linfocitos T CD8 específicos del epítipo K1 en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. En la gráfica se muestra para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos determinados pre tratamiento (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

En la figura R3.49 se observa que, existen cambios estadísticamente significativos post-tratamiento con Benznidazol a nivel del fenotipo de memoria, y diferenciación de células TCD8⁺ K1-específicas en pacientes en fase CCC. Estos cambios se evidencian en CD8_{LOW} con el descenso del porcentaje de células epítipes específicas que muestran un fenotipo de memoria central T_{CM} ($P \leq 0,05$), mientras que, en CD8_{HIGH} aumenta el porcentaje de células T_{NAIVE}, disminuye el porcentaje de células de memoria efectora (T_{EM}) y aumenta el porcentaje de células totalmente diferenciadas ($P \leq 0,05$).

CD8 Low



CD8 High

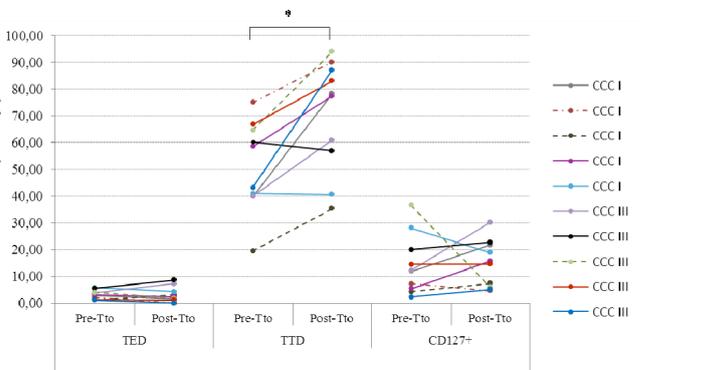
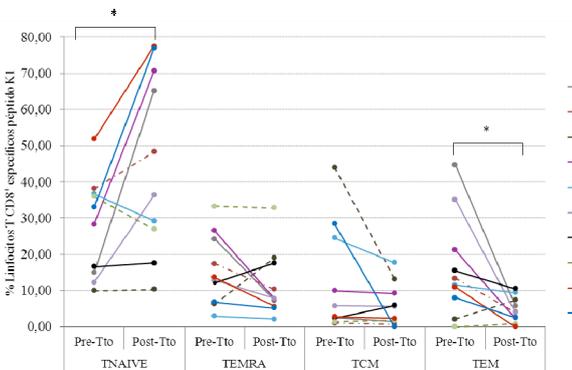
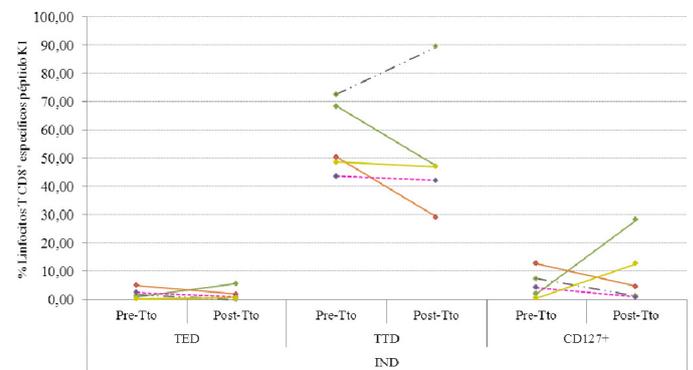
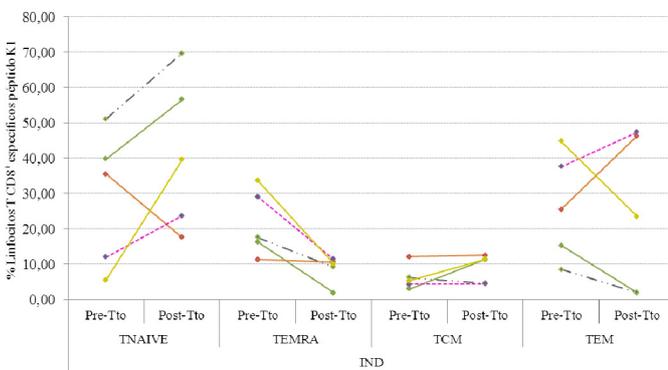


Figura R3.49.- Caracterización del fenotipo de memoria y diferenciación de linfocitos T CD8 específicos del epítipo K1 en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. Se muestra para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas, el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos dentro de las subpoblaciones T_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁺ CCR7⁺), T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺ CD27⁻ CCR7⁺), T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺), T_{EM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻ CCR7⁺), T_{ED} (CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺), T_{TD} (CD8⁺CD45RA⁺CD127⁻) y CD127⁺, en condiciones pre tratamiento (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤ 0,001.

La caracterización fenotípica de células de memoria senescente K1-específicas muestra que, tras el tratamiento con Benznidazol hay un aumento no significativo en el porcentaje de células de memoria que expresan la molécula de superficie CD57 (CD44⁺CD57⁺) en células provenientes de pacientes en fase IND (4 de 5 (CD8_{LOW} y CD8_{HIGH})) y en fase CCC (8 de 10 (CD8_{LOW} y CD8_{HIGH})) (figura R3.50).

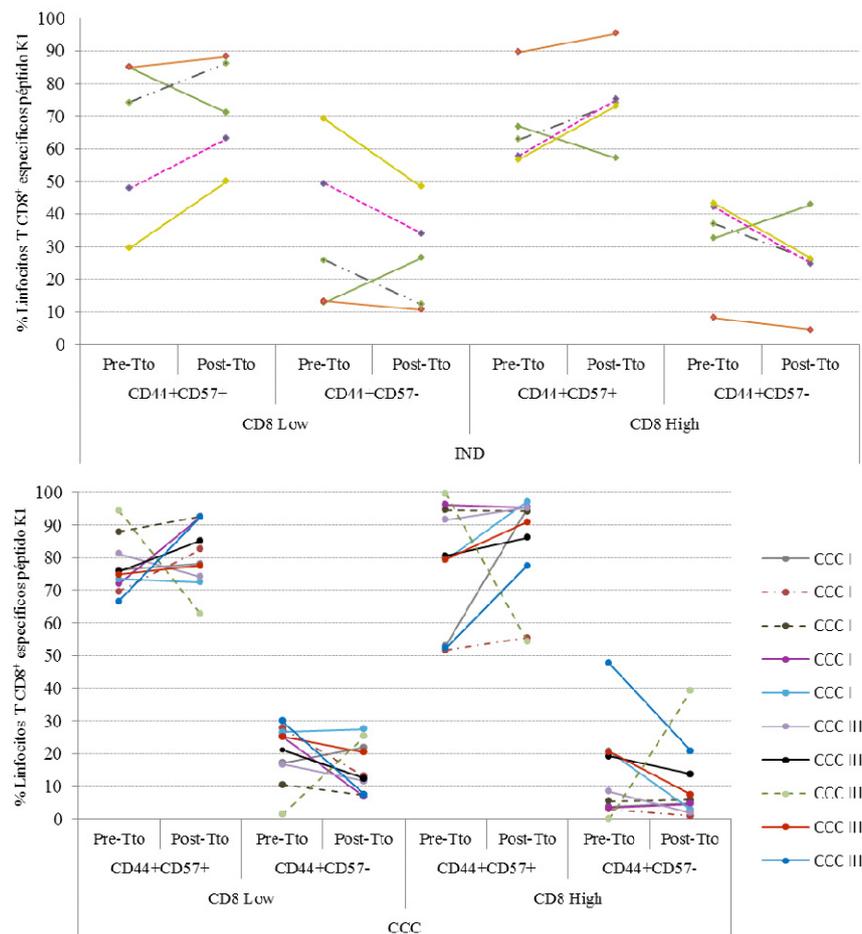


Figura R3.50.- Caracterización del fenotipo de células de memoria senescentes en linfocitos T CD8 específicos del epítipo K1 en pacientes con enfermedad de Chagas pre y post-tratamiento con Benznidazol. En la gráfica se muestra, para cada uno de los pacientes evaluados en fase indeterminada (IND) y fase cardiaca (CCC) de la enfermedad de Chagas, el porcentaje de linfocitos TCD8_{LOW} y TCD8_{HIGH} epítipo-específicos dentro de las subpoblaciones CD44⁺CD57⁺ y CD44⁺CD57⁻, pre (Pre-Tto) y post-tratamiento con Benznidazol (Post-Tto). Diferencias estadísticamente significativas son indicadas como *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤ 0,001.

5.-Discusión

5.1.- Identificación de epítopes CD8⁺ restringidos a la molécula HLA-A*02:01 contenidos en las proteínas HSP70, PFR2, PFR3 y TcCA-2 de T. cruzi.

El control de la infección por *T. cruzi* depende de mecanismos de la respuesta inmunológica celular y humoral del hospedador, basados en la secreción de anticuerpos líticos y en la activación linfocitaria tanto de células T CD4 como de células T CD8 (Teixeira, Nascimento et al. 2006). En el contexto de la respuesta inmunitaria celular los linfocitos T CD8 han demostrado ser cruciales en el control de la infección. En modelos murinos ha sido observado que la ausencia de linfocitos T CD8⁺ funcionales conlleva un incremento en la carga parasitaria en tejidos, y a la incapacidad de sobrevivir a la infección por *T. cruzi* (Martin and Tarleton 2004). Por otro lado, el predominio de linfocitos T CD8⁺ en infiltrados inflamatorios de tejidos infectados (Tarleton 2003) y su capacidad de inducir actividad citotóxica y secretora de IFN- γ ante el estímulo con el parásito, indican el importante rol de esta población de linfocitos T en la resistencia a *T. cruzi* (Martin and Tarleton 2005), sugiriendo que el papel protector de dichos linfocitos en la enfermedad de Chagas reside tanto en su actividad citotóxica como su capacidad secretora de citoquinas tipo Th1, especialmente INF- γ y TNF- α (Wizel, Nunes et al. 1997; Martin and Tarleton 2004).

Si bien han sido caracterizados antígenos del parásito capaces de inducir la activación de linfocitos T CD8, estos estudios han sido realizados principalmente en modelos murinos (Sepulveda, Hontebeyrie et al. 2000; Garg and Tarleton 2002; Dumonteil, Escobedo-Ortegon et al. 2004) siendo limitada la caracterización de antígenos en el contexto de MHC de clase I reconocidos por células provenientes de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica. En este sentido, los antígenos mejor caracterizados capaces de inducir una respuesta T CD8 específica en pacientes con enfermedad de Chagas están contenidos en las proteínas transialidasas de *T. cruzi*. En dichas proteínas han sido identificados péptidos capaces de inducir células T CD8⁺ antígeno-específicas productoras de INF- γ , que si bien pueden ser relevantes en el control de la infección aguda, no generan protección inmunológica frente a la infección por lo cual su potencial papel inmunoproliférico es limitado (Rosenberg, Martin et al. 2010). Por tanto, la identificación de epítopes capaces de inducir una respuesta inmune en el contexto de MHC I frente a células infectadas sigue resultando de crucial

importancia, no sólo para la generación de una inmunidad esterilizante, sino también en el posible diseño de una vacuna frente a dicho patógeno.

En este sentido, en este trabajo hemos identificado péptidos contenidos en proteínas inmunodominantes de *T. cruzi* tales como HSP70, PFR2, PFR3 y TcCA-2, capaces de inducir la activación de linfocitos T CD8 provenientes de PBMC de pacientes con enfermedad de Chagas, tanto en fase crónica indeterminada como en fase crónica cardíaca. Para ello, fueron empleados dos algoritmos bioinformáticos que permitieron predecir péptidos con motivos de unión teórica a la molécula HLA-A*0201 derivados de cada una de las proteínas a caracterizar. Este estudio ha sido enfocado particularmente en la respuesta desencadenada por epítopes restringidos a la molécula del MHC de clase I HLA-A*0201, dado que ésta es expresada aproximadamente por un 50% de la población mundial, incluyendo las zonas endémicas para la enfermedad de Chagas. Dichas herramientas bioinformáticas, fueron combinadas con ensayos de unión *in vitro* empleando células T2 y ensayos *in vivo* en modelos murinos, ya que ha sido demostrado que existe correlación entre la afinidad de unión por moléculas HLA de clase I y su inmunogenicidad (Sette, Vitiello et al. 1994).

La capacidad de unión e inmunogenicidad de los péptidos candidatos fue evaluada en esplenocitos provenientes de ratones transgénicos que expresan la molécula quimérica de clase I A2/K^b. Esta molécula contiene los dominios extracelulares $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la molécula presentadora humana HLA-A*0201 y el dominio $\alpha 3$ correspondiente a la molécula H2-K^b de ratón, permitiendo la unión a antígenos en el contexto de MHC HLA-A*0201 y su interacción óptima con el coreceptor CD8 murino. Por tanto, estos ratones presentan un repertorio T CD8⁺ restringido a HLA-A*0201 que solapa en gran parte con el encontrado en humanos (Wentworth, Vitiello et al. 1996), y por tanto permite estudiar el reconocimiento de antígenos restringidos a la molécula HLA-A*0201 humana utilizando modelos murinos. (Maranon, Thomas et al. 2001).

En general se observó una baja correlación entre los datos de unión teórica a la molécula HLA-A*02:01 y los porcentajes de unión obtenidos experimentalmente tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*. En este sentido, recientemente ha sido descrito un bajo coeficiente de correlación entre datos de unión teórica y experimental en el contexto de la molécula HLA-A*02:01 para ambos algoritmos empleados en este estudio (SYFPEITHI y RANKPEP) (Gowthaman, Chodisetti et al. 2010).

Dentro de las proteínas inmunogénicas en las cuales fueron identificados epítopes TCD8⁺ encontramos la proteína HSP70. Esta proteína de choque térmico de 70 kDa presente en todo tipo de organismos, está entre los antígenos inmunodominantes reconocidos por el sistema inmune en un amplio espectro de parasitosis (Young 1990). Esta capacidad inmunomoduladora de la HSP70 ha sido vinculada con su capacidad de interacción con células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas) (Singh-Jasuja, Hilf et al. 2001).

La inmunogenicidad de los péptidos candidatos contenidos en dicha proteína fue evaluada tanto en ratones transgénicos B6-A2/K^b inmunizados con HSP70 como en ratones infectados con *T. cruzi*. De esta manera se observó que el péptido HSP70₂₁₀₋₂₁₈ es reconocido por esplenocitos tanto de ratones inmunizados como infectados, lo cual podría indicar que éste es un péptido altamente inmunodominante, pudiendo estar implicado en la inducción de una respuesta protectora. En este sentido, ha sido demostrado que la inmunización de ratones con un vector vacuna que porta el gen codificante para la proteína HSP70 confiere protección frente a la infección experimental con *T. cruzi* (Planelles, Thomas et al. 2001; Morell, Thomas et al. 2006). Por otro lado, los péptidos HSP70₃₄₅₋₃₅₃ y HSP70₂₅₅₋₂₆₃ son capaces de inducir respuesta en las células provenientes de ratones inmunizados, mientras que el péptido HSP70₃₁₆₋₃₂₄ sólo es reconocido por células de ratones infectados. Estos datos sugieren que el contexto de la presentación antigénica puede ser condicionado por la eficiencia en la presentación de los epítopes.

Nuestros resultados muestran que, existe correlación entre los datos experimentales obtenidos en modelos murinos, y el reconocimiento antigénico por parte de PBMC provenientes de pacientes con enfermedad de Chagas, observándose que los dos péptidos seleccionados en modelos murinos (HSP70₂₁₀₋₂₁₈ y HSP70₃₁₆₋₃₂₄) son reconocidos por PBMC de pacientes con enfermedad de Chagas. En este sentido, el modelo experimental basado en el uso de ratones transgénicos humanizados B6-A2/K^b igualmente ha sido empleado para predecir la unión de péptidos restringidos a la molécula HLA-A*02:01 en estudios de tumores (Guevara-Patino, Engelhorn et al. 2006) y otros patógenos (Kotturi, Botten et al. 2009) (Guo, Wang et al. 2010) (Martin, Weatherly et al. 2006). Así mismo, estudios previos del laboratorio han mostrado las ventajas de este modelo experimental para la identificación de nuevos epítopes T CD8 derivados de antígenos de *T. cruzi*, encontrándose una buena correlación entre la

respuesta inmunológica inducida *in vivo* y *ex vivo* por células T CD8⁺ de pacientes con enfermedad de Chagas (Maranon, Thomas et al. 2001; Planelles, Thomas et al. 2001; Diez, Lopez et al. 2006). Así, hemos demostrado el reconocimiento de los epítopes HSP70₂₁₀₋₂₁₈ y HSP70₃₁₆₋₃₂₄ por PBMC de pacientes con enfermedad de Chagas, indicando que estos son procesados y eficientemente presentados en el contexto de la molécula HLA-A*02:01 durante la infección natural por *T. cruzi*.

Los dos péptidos seleccionados son capaces de inducir una activación linfocitaria multifuncional en células provenientes de pacientes en distintas fases de la enfermedad, detectándose tanto actividad citotóxica (secreción de granzima B) como secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IFN- γ y TNF α) en pacientes en fase IND y CCC de la enfermedad. La activación multifuncional de linfocitos T CD8 ha demostrado ser crucial en otras patologías tales como la infección generada por el virus HIV, donde se observa que las células T CD8⁺ que responden a la infección en pacientes en los que no hay progresión de la enfermedad se caracterizan por su capacidad multifuncional, viéndose esta capacidad afectada por la persistencia del antígeno en pacientes con infección progresiva, produciendo la pérdida secuencial de funciones efectoras en los linfocitos T CD8⁺ generando como consecuencia el predominio de una respuesta TCD8⁺ monofuncional en la fase avanzada de la enfermedad (Streeck, Brumme et al. 2008). Estos datos evidencian, que la capacidad de respuesta multifuncional de las células T CD8⁺ es indispensable para un mejor control de la infección, sin embargo la persistencia del antígeno puede alterar esta propiedad disminuyendo las funciones celulares y por tanto la capacidad de la respuesta generada.

En este sentido, ha sido descrito que la inmunoprotección inducida por linfocitos T CD8⁺ frente a *T. cruzi* está determinada no sólo por la citotoxicidad mediada por GzB, sino también por su potencial secretor de citoquinas principalmente IFN- γ y TNF α (Muller, Sobek et al. 2003) (Padilla, Bustamante et al. 2009). En consecuencia, los linfocitos TCD8⁺ HSP70₂₁₀₋₂₁₈ y HSP70₃₁₆₋₃₂₄-específicos presentan las características funcionales requeridas para inducir inmunoprotección frente a la infección. Interesantemente, nuestros resultados muestran que, 10 de los 12 pacientes (83%) ensayados reconocen al menos uno de los dos epítopes seleccionados. Dicha frecuencia de reconocimiento es considerablemente alta con respecto a los porcentajes indicados para otros antígenos derivados de *T. cruzi* tales como, KMP11 (2/12 (17 %)) (Diez, Lopez et al. 2006), CaBP (4/37 (11 %)) (Laucella, Postan et al. 2004), cruzipaina (4/8 (

50 %)), FL-160 (5/8 (63 %)) (Fonseca, Moins-Teisserenc et al. 2005), y transialidasas (18/45 (40 %)) (Alvarez, Postan et al. 2008). Así los péptidos HSP70₂₁₀₋₂₁₈ y HSP70₃₁₆₋₃₂₄ son epítopes ampliamente reconocidos pudiendo constituir una útil herramienta para el seguimiento de la respuesta T CD8⁺ *T* cruzi-específica.

En este estudio igualmente planteamos la identificación de epítopes T CD8⁺ restringidos a la molécula HLA-A*0201 contenidos en la proteínas PFR2 y PFR3 dado que, estas proteínas paraflagelares de *T. cruzi* han mostrado ser altamente inmunogénicas jugando un papel crítico en la inducción de una respuesta celular protectora (Miller, Wrightsman et al. 1997; Wrightsman, Luhrs et al. 2002; Morell, Thomas et al. 2006). En este sentido, trabajos previamente descritos muestran que, en ratones infectados se generan linfocitos T CD8⁺ frente a epítopes presentes en la proteína PFR2, siendo protectora la inmunización con vacunas que portan el gen codificante de PFR2 (Morell, Thomas et al. 2006). Igualmente, la inmunización de ratones con el vector que porta los genes PFR2 o PFR3 fusionados a HSP70 induce una duradera respuesta humoral, detectándose altos niveles de anticuerpos anti-PFR2 o anti-PFR3 de isotipo IgG2a, así como un significativo aumento de la expresión de las citoquinas IL-2, IL12, TNF α e IFN- γ y una fuerte activación de linfocitos T citotóxicos.

Así, siguiendo la estrategia previamente descrita para la identificación de epítopes en la proteína HSP70 empleamos algoritmos bioinformáticos que permitieron la predicción de 26 y 30 péptidos candidatos, con motivos de unión teórica a la molécula HLA-A*02:01, contenidos en las proteínas PFR2 y PFR3 respectivamente. Para estos 56 péptidos candidatos, fue determinada la capacidad de unión *in vitro* en células T2, observándose que 3 péptidos contenidos en la proteína PFR2 (PFR2₁₉₋₂₈, PFR2₁₅₆₋₁₆₃, PFR2₄₄₉₋₄₅₇) y 3 en la PFR3 (PFR3₄₂₈₋₄₃₆, PFR3₄₇₅₋₄₈₂, PFR3₄₈₁₋₄₈₉) muestran los índices de unión *in vitro* más altos dentro de los péptidos candidatos ensayados.

La inmunogenicidad de estos 6 péptidos candidatos fue evaluada en ratones transgénicos B6-A2/K^b inmunizados con el vector que porta los genes PFR2 o PFR3 fusionados a HSP70 observándose que, dos de los seis péptidos candidatos (PFR2₄₄₉₋₄₅₇ y PFR3₄₈₁₋₄₈₉) son altamente inmunodominantes. Por el contrario en los PBMC de pacientes con enfermedad de Chagas en fase IND y en fase CCC se observa que, 5 de los seis péptidos candidatos que mostraron alta afinidad de unión *in vitro* (PFR2₁₉₋₂₈, PFR2₁₅₆₋₁₆₃, PFR2₄₄₉₋₄₅₇, PFR3₄₂₈₋₄₃₆, y PFR3₄₈₁₋₄₈₉) son reconocidos, procesados y presentados en el contexto de la infección natural por *T. cruzi*, por lo que,

contrariamente a lo observado en los péptidos contenidos en la proteína HSP70, no hay una buena correlación entre los datos de unión a HLA obtenidos *in silico* y en modelos murinos con respecto al reconocimiento en pacientes con enfermedad de Chagas.

En los pacientes ensayados (IND y CCC) se observa que la activación linfocitaria tras el reconocimiento antigénico, induce un perfil de secreción de citoquinas del tipo pro-inflamatoria (IFN- γ y TNF- α), no detectándose secreción de IL-4 e IL-10. Así mismo en dichos pacientes se observa actividad citotóxica mediada por GzB y altos niveles de secreción de IL-6, la cual es una citoquina pleiotropica que ha sido vinculada a la inhibición de la expansión y funcionalidad de las linfocitos T reguladores (van der Aar, de Groot et al. 2011).

En este sentido, en modelos de infección experimental la secreción de IFN- γ ha sido correlacionada con protección inmunológica frente a la infección (Miyahira 2008). Así mismo, ha sido descrita una correlación inversamente proporcional entre la frecuencia y la funcionalidad de linfocitos T de CD8⁺ productores de IFN- γ y el grado de severidad de la enfermedad de Chagas (Laucella, Postan et al. 2004). Interesantemente, nuestros resultados muestran mayores niveles de secreción de citoquinas en pacientes en fase indeterminada de la enfermedad así como una correlación entre la actividad citotóxica de linfocitos T CD8⁺ péptido-específicos (secreción de GzB) y el grado de patología de la enfermedad, observándose secreción de esta proteína solo en pacientes en fase crónica indeterminada y no en fase crónica cardiaca. Esto podría estar vinculado a que la persistencia del antígeno puede alterar la capacidad de respuesta multifuncional de linfocitos T CD8⁺ antígeno-específicos disminuyendo las funciones celulares, y por tanto la capacidad de la respuesta generada, por lo que los epítomos derivados-PFR3/PFR2 podrían ser moléculas atractivas para el seguimiento de patología de la enfermedad de Chagas.

Por otro lado, en este trabajo igualmente fue demostrada la expresión de las proteínas PFR2 y PFR3 en la forma amastigote de *T. cruzi*. Hasta ahora la expresión de dichas proteínas había sido asociada solo a las formas flageladas del parásito (epimastigotes y tripomastigotes). Este relevante dato permite comprender como un antígeno intracelular que está asociado con una estructura aparentemente ausente en la forma parasitaria puede inducir una respuesta inmunitaria en el contexto de MHC de clase I. Hasta la fecha, había sido propuesto que la degradación del flagelo y de la

proteína PFR durante la diferenciación de la forma tripomastigote a amastigote dejaba expuestos componentes flagelares que podrían ser reconocidos por el sistema inmunológico del hospedador (Portman and Gull 2010).

Finalmente fueron identificados 4 epítopes TCD8⁺ antígeno-específicos en la proteína TcCA-2 de *T. cruzi* la cual se caracteriza por contener repeticiones imperfectas en su extremo N-terminal, factor común para muchas proteínas antigénicas inmunodominantes de patógenos protozoarios y para la cual no había sido descrito su reconocimiento en el contexto de MHC I (Ibanez, Affranchino et al. 1988; Buscaglia, Alfonso et al. 1999). En esta proteína los análisis *in silico* permitieron identificar 8 epítopes con motivos de unión teórica a la molécula HLA-A*02:01. Sin embargo, sólo 4 de ellos (12819, 12822, 12827 y 12828) fueron reconocidos por PBMC de pacientes con enfermedad de Chagas. En este sentido los péptidos 12822 y 12827 son capaces de inducir una activación multifuncional comprendida con actividad citotóxica mediada por GzB y secreción de citoquinas (IFN- γ , TNF α , e IL-6) mientras que para el epítope 12819 sólo se determinan linfocitos T CD8⁺ citotóxicos no secretores de citoquinas.

Nuestros resultados nos permitieron identificar 11 nuevos epítopes restringidos a la molécula HLA-A*02:01 y contenidos en las proteínas HSP70 (HSP70₂₁₀₋₂₁₈ y HSP70₃₁₆₋₃₂₄), PFR2 (PFR2₁₉₋₂₈, PFR2₁₅₆₋₁₆₃ y PFR2₄₄₉₋₄₅₇), PFR3 (PFR3₄₂₈₋₄₃₆ y PFR3₄₈₁₋₄₈₉) y TcCA-2 (12819, 12822, 12827 y 12828), que son reconocidos, procesados y presentados en el contexto de la infección natural de *T. cruzi*. En todos los epítopes identificados se observa un mayor nivel de secreción de citoquinas en pacientes en fase indeterminada por lo que, existe una correlación inversamente proporcional entre el nivel de secreción de citoquinas y el grado de patología de la enfermedad.

Si bien HLA-A*02:01 es el alelo de clase I mayoritariamente expresado en la población (Krausa, Brywka et al. 1995), es de nuestro interés evaluar la respuesta inducida por nuestros epítopes en el contexto de otros alelos HLA de clase I, y así determinar si hay promiscuidad en el reconocimiento antigénico de dichos epítopes lo cual, conllevaría a la inducción de respuesta en células de pacientes con enfermedad de Chagas negativos para el HLA-A*02:01, aumentando así, la frecuencia de la población que responde frente a estos antígenos. En este sentido, ha sido descrito que el péptido K1 contenido en la proteína KMP11 de *T. cruzi*, altamente reconocido por pacientes con

enfermedad de Chagas (HLA-A*02:01), es un epítotope promiscuo que puede ser reconocido por otros alelos de HLA-A (Lasso, Mesa et al. 2010).

5.2.- Actividad de la enzima Indolamina-2.3-dioxigenasa (IDO) en pacientes con enfermedad de Chagas y modificaciones post-tratamiento con Benznidazol.

En este trabajo es descrito por primera vez un perfil tolerogénico en células presentadoras de antígenos (APC) de pacientes con enfermedad de Chagas, que se correlaciona con el grado de patología de la enfermedad. Así, en pacientes sintomáticos con alteraciones cardíacas o digestivas se observa una actividad estadísticamente superior de la enzima indolamina-2.3-dioxigenasa (IDO) con respecto a pacientes en fase indeterminada, encontrándose una correlación positiva entre el grado de patología y la actividad IDO, que podría ser reflejo del perfil de infiltración de las células presentadoras de antígenos en los tejidos infectados de pacientes crónicos. Interesantemente, en monocitos derivados de células dendríticas de pacientes con enfermedad de Chagas, ha sido descrito que la estimulación con la proteína HSP70 de *T. cruzi* induce un alto nivel de secreción de IL-10 y un bajo nivel de IL-12 indicando un perfil tolerogénico en la fase crónica de la enfermedad (Cuellar, Santander et al. 2008). En este sentido, estudios recientes han mostrado una correlación positiva entre la persistencia de *T. cruzi* en tejidos infectados y la sintomatología clínica de la enfermedad (Marcon, de Albuquerque et al. 2011). Así mismo, ha sido descrito un alto nivel de expresión de la enzima IDO en macrófagos de ratón en respuesta a *T. cruzi* y en células dendríticas humanas en respuesta a *Leishmania* (Knubel, Martinez et al. 2010) (Donovan, Tripathi et al. 2012) así como una actividad supresora de células Treg en lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea, donde existe una correlación entre la expresión local de IDO y Foxp3 (Bourreau, Ronet et al. 2009). Igualmente, ha sido descrita una supresión inmunitaria mediada por IDO en ganglios linfáticos de drenaje de ratones infectados con *Leishmania major* (Makala, Baban et al. 2011), sugiriendo que *in vivo* IDO se induce localmente tanto en los tejidos infectados como en ganglios linfáticos de drenaje, generando un sesgo en la respuesta de células T específicas del parásito, es por ello que los tratamientos de inhibición de IDO podrían ser una útil herramienta para inducir una respuesta inmunológica local protectora frente al parásito.

En concordancia con datos encontrados en pacientes con otras patologías infecciosas (Zangerle, Widner et al. 2002; Darcy, Davis et al. 2011), nuestros resultados demuestran que, el tratamiento con benznidazol es seguido por una disminución de la actividad IDO. En este sentido, la sobreexpresión de IDO en la infección crónica y en procesos inflamatorios está mediada por una ruta no canónica de NF- κ B que implica la proteína MAP quinasa activada por el mitógeno p38 (MAPK p38) y el factor de transcripción NF- κ B, en una vía dependiente de la proteína quinasa $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (Puccetti and Grohmann 2007). El benznidazol inhibe la activación de NF- κ B y la actividad de MAPK p38 (Manarin, Pascutti et al. 2010) por lo tanto, tiene el potencial de interferir directamente en la sobreexpresión de IDO inducida por parásitos en los pacientes tratados. Los pacientes con enfermedad de Chagas incluidos en este estudio recibieron tratamiento con benznidazol durante 60 días, al momento del primer seguimiento (T1, 3 meses) dicho tratamiento habría culminado sin embargo, no se observó una disminución significativa en la actividad IDO sino hasta un año post- tratamiento; por ello, no es probable que la disminución de la actividad IDO encontrada se deba exclusivamente a un efecto directo del benznidazol sobre NF- κ B y MAPK p38. Por el contrario, es probable que la progresiva disminución de la carga parasitaria inducida por el fármaco, esté cambiando el perfil tolerogénico inicial de las células presentadoras de antígeno infiltradas, por un perfil inductor de respuesta que podría promover una respuesta inmunitaria protectora.

La persistencia de los parásitos en los tejidos en la infección crónica puede crear un círculo vicioso, dado que la inducción de la actividad IDO podría evitar la inducción de una fuerte y bien orientada respuesta inmunológica local, por lo que, una respuesta subóptima sería incapaz de controlar el parásito en los tejidos, lo que a su vez promueve actividad IDO. En consecuencia, la disminución estable de actividad IDO inducida por el tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas sintomáticos, proporcionaría una evidencia inmunológica de los beneficios de este tratamiento durante la fase crónica de la enfermedad; por ello, la determinación de la actividad IDO podría constituir un biomarcador de eficacia terapéutica en pacientes sintomáticos.

Por otro lado, hasta la fecha, son pocos los estudios que evalúan las consecuencias neuropsicológicas de la infección por *T. cruzi*, lo cual refleja poco interés en el estudio de estos aspectos, a pesar que, algunos estudios recientes han demostrado una alta incidencia de síntomas depresivos en pacientes con enfermedad de Chagas

(Jackson, Castillo et al. 2012), que han sido asociados con la sintomatología digestiva independientemente de los parámetros de calidad de vida (Ozaki, Guariento et al. 2011). En este sentido, en modelos murinos de infección con *T. cruzi* han sido observados comportamientos depresivos relacionados directamente con la actividad IDO (Vilar-Pereira, Silva et al. 2012) dado que, la actividad IDO conlleva a una disminución de la concentración de triptófano en el cerebro, siendo este aminoácido necesario para la síntesis de serotonina, el cual es un neurotransmisor crítico para un estado anímico no depresivo (Myint, Schwarz et al. 2009). En este sentido, en modelos murinos se observa que el tratamiento con benznidazol mejora el comportamiento depresivo observado en los animales infectados (Vilar-Pereira, Silva et al. 2012). Por ello, resulta necesario ahondar en la relación entre una elevada actividad IDO en pacientes sintomáticos y la depresión asociada a la patología chagásica.

5.3.- Caracterización funcional de linfocitos TCD8⁺ específicos de antígenos de T. cruzi post tratamiento con benznidazol.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo, fue evaluar en pacientes en fase crónica IND y CCC de la enfermedad de Chagas, el efecto del tratamiento con benznidazol sobre el perfil funcional de los linfocitos T CD8 específicos de los epítopes más relevantes contenidos en las proteínas HSP70 (HSP70₂₁₀₋₂₁₈), PFR2 (PFR2₄₄₉₋₄₅₇), PFR3 (PFR3₄₂₈₋₄₃₆) y TcCA-2 (12822 y 12827). Los resultados obtenidos mostraron que, el tratamiento farmacológico modula la respuesta de linfocitos T CD8 específicos de antígenos de *T. cruzi*. Así, se observa tanto una disminución y/o negativización de la frecuencia de linfocitos T citotóxicos, como del nivel de secreción de IFN- γ , TNF- α e IL-6 en los pacientes en lo que se observaba una respuesta positiva antes del tratamiento farmacológico. Estos resultados podrían indicar que el tratamiento con benznidazol induce una disminución de la carga parasitaria, disminuyendo así el nivel de antígeno necesario para activar una respuesta T efectora. En algunos pacientes en fase CCC que presentaban respuesta negativa antes del tratamiento se observa un aumento de la respuesta citotóxica (GzB) y/o secretora de citoquinas (IL-6, IFN- γ y TNF- α) así como la secreción de la citoquina pro-inflamatoria IL-17 no detectada en condiciones pre-tratamiento en ninguno de los pacientes ensayados, estos datos resultan interesantes dado que, estudios en linfocitos de pacientes con enfermedad de Chagas IND y CCC han

mostrado que los pacientes con patologías cardíacas tienen menor expresión de IL-17 y menor frecuencia de linfocitos T cooperadores productores de IL-17. Así, una alta expresión de esta citoquina es correlacionada con una mejor función cardíaca (Magalhaes, Villani et al. 2013). Así mismo, esta nueva respuesta celular inducida podría estar vinculada a una mayor liberación de antígenos parasitarios dada la acción del benznidazol, lo cual podría deberse a una sensibilidad mayor al fármaco o bien a una alta carga parasitaria en estos pacientes, antes del tratamiento.

En este sentido, resultados similares han sido encontrados en PBMC de pacientes en fase IND, estimulados con antígenos de *T. cruzi*, en los cuales se observa un año post tratamiento con benznidazol, una disminución en el nivel de secreción de IFN- γ (Laucella, Mazliah et al. 2009). Así mismo, en macrófagos murinos activados con LPS ha sido observado que el tratamiento *in vitro* con benznidazol conlleva a la disminución de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α (Revelli, Le Page et al. 1999).

5.4.- Caracterización fenotípica de linfocitos T CD8⁺ específicos de péptidos contenidos en las proteínas HSP70, PFR2, PFR3, TcCA-2 y KMP11 pre y post tratamiento con benznidazol.

En la fase crónica de la patología Chagásica, ha sido sugerido que la sintomatología clínica observada, está vinculada de una manera directa a la eficiencia de la respuesta desencadenada. Así, una mayor severidad clínica ha sido descrita en pacientes con una baja frecuencia de células T CD8⁺ específicas de *T. cruzi* productoras de INF- γ , en relación a pacientes asintomáticos y con sintomatología leve (Laucella, Postan et al. 2004; Albareda, Olivera et al. 2009). En este sentido, nuestros resultados mostraron que existe correlación entre la activación funcional de linfocitos T CD8 específicos de antígenos de *T. cruzi* y el grado de patología de la enfermedad, observándose una mayor respuesta TCD8 específica frente a los epítopes HSP70₂₁₀₋₂₁₈, PFR2₄₄₉₋₄₅₇, PFR3₄₂₈₋₄₃₆, 12822 y 12827 de *T. cruzi* en pacientes en fase IND. Estas diferencias encontradas a nivel de la respuesta inmunológica, han sido asociadas con una disminución de la población de linfocitos TCD8⁺ vírgenes y un incremento en la frecuencia de células T CD8⁺ de memoria altamente diferenciados (CD45RA⁺CD27⁻CD28⁻) y apoptóticos que presentan características senescentes (Albareda, Laucella et

al. 2006), sugiriendo que la infección crónica por *T. cruzi* lleva a un agotamiento del sistema inmune como consecuencia de la persistencia antigénica lo cual afecta la capacidad del sistema inmunológico para controlar la infección, conllevando así a la progresión de la enfermedad. Así, ha sido demostrado que infecciones persistentes conllevan a una alteración funcional progresiva en la respuesta de linfocitos T CD8⁺ que se caracteriza por la pérdida de capacidad de proliferación y supervivencia en ausencia del antígeno, esto implica una baja expresión de receptores de IL-7 (CD127) e IL-15 (CD122) así como una disminución en la secreción de las citoquinas IL-2, TNF- α e INF γ (Wherry, Barber et al. 2004; Shin and Wherry 2007). Dichas capacidades son características de células con fenotipo de memoria central las cuales tienen alta capacidad proliferativa en ausencia del antígeno pudiendo persistir por largo tiempo.

En este trabajo, fue llevada a cabo la caracterización fenotípica de las células T CD8 específicas de los antígenos más relevantes contenidos en las proteínas HSP70 (HSP70₂₁₀₋₂₁₈), PFR2 (PFR2₄₄₉₋₄₅₇), PFR3 (PFR3₄₂₈₋₄₃₆) y TcCA-2 (12822 y 12827) para ello empleamos dextrámeros específicos de cada uno de los epítopes ensayados. En este sentido, cabe destacar que fueron detectados linfocitos TCD8 específicos para todos los péptidos ensayados en los pacientes en fase IND y CCC y no en controles sanos. No encontrándose diferencias significativas en el reconocimiento del dextrámero según el grado de patología. Así mismo fueron empleados anticuerpos frente a las moléculas de superficie CD45RA, CCR7, CD27 y CD127, lo cual nos permitió discriminar entre las poblaciones TCD8⁺_{NAIVE} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺CCR7⁻), TCD8⁺ de memoria efectora T_{EM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻), TCD8⁺ de memoria efectora terminalmente diferenciadas T_{EMRA} (CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻CCR7⁻), TCD8⁺ de memoria central T_{CM} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺), TCD8⁺ en diferenciación temprana T_{ED} (CD8⁺CD45RA⁻CD127⁺) y TCD8⁺ en diferenciación tardía T_{TD} (CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻).

Los resultados obtenidos muestran un perfil fenotípico diferencial según el grado de patología. Así, en pacientes en fase indeterminada se observa una mayor proporción de células con un fenotipo T_{NAIVE} con respecto a pacientes en fase cardiaca donde predomina un fenotipo de memoria efectora T_{EM} y T_{EMRA}, las cuales se caracterizan por ser dependientes del antígeno para su persistencia y por poseer baja capacidad proliferativa (Pantaleo and Harari 2006).

Esta mayor proporción de células T_{NAIVE} en IND *versus* CCC fue estadísticamente significativa para los epítopes HSP70₂₁₀₋₂₁₈, 12822 y 12827 mientras

que el porcentaje de células con fenotipo de memoria efectora fue estadísticamente menor en IND con respecto a CCC para los epítopes 12807, 12822 y 12827. Si bien, en el resto de los epítopes se mantiene un patrón similar estas diferencias no son estadísticamente significativas. Un fenotipo particular se observa en los linfocitos TCD8 K1-específicos en los cuales hay una mayor proporción de células T_{NAIVE} y menor proporción de células efectoras en CCC con respecto a IND.

El fenotipo efector observado en los pacientes en fase CCC no se corresponde con una respuesta funcional efectora frente a los epítopes ensayados, lo cual podría ser reflejo de una alteración funcional de estos linfocitos. En modelos murinos han sido observados resultados similares encontrándose linfocitos T CD8 que expresan marcadores de superficie característicos de un fenotipo memoria efectora, sin embargo su función efectora en respuesta a una activación antigénica se ve atenuada (Leavey and Tarleton 2003).

Nuestros resultados corroboran que tal como ha sido mencionado, el grado de patología parece estar vinculado con una disminución de la población de linfocitos $TCD8^+_{NAIVE}$, así como a síntomas de agotamiento clonal. En este sentido, determinamos la expresión del marcador de superficie CD57, en células de memoria ($CD44^+$) ya que, la expresión de dicha molécula en células $TC8^+$, $TC4^+$ y NK, inducida por una estimulación antigénica crónica, está asociada con un fenotipo de senescencia replicativa, el cual es indicativo de sucesivas divisiones celulares que conllevan a un acortamiento telomérico que induce una menor capacidad proliferativa celular (Brenchley, Karandikar et al. 2003). Así, en células T $CD8^+$ específicas de HIV ha sido observada una disminución en la capacidad proliferativa vinculada a la expresión de la molécula de superficie CD57.

Interesantemente, nuestros resultados muestran un mayor porcentaje estadísticamente significativo de células no senescentes ($CD57^-$), en pacientes en fase IND *versus* CCC para todos los epítopes a excepción del K1 en el cual, además se observa que en ambos grupos de pacientes (IND y CCC) hay mayor proporción de células $CD57^+$ patrón que no se encuentra para ningún otro epítopo.

Por otro lado se detectan en ambos grupos de pacientes (IND y CCC), linfocitos T $CD8^+$ específicos de cada uno de los epítopes ensayados que expresan un fenotipo de memoria central. Esta población se mantiene independiente del antígeno a pesar de la persistencia del parásito, así mismo se observa la expresión del receptor de IL-7

(CD127) necesario para el mantenimiento antigénico independiente (Bixby and Tarleton 2008). No encontrándose diferencias significativas según el grado de patología.

En cuanto al grado de diferenciación celular se observa que, tanto en IND como en CCC hay un mayor porcentaje de células totalmente diferenciadas. La selección de estas poblaciones se hizo combinando la expresión de CD127 y CD45RA dado que, numerosos trabajos han demostrado que la expresión de la molécula de superficie CD127 permite discriminar entre células T CD8⁺ de memoria y células efectoras en diferentes etapas de diferenciación, así la expresión de esta molécula se asocia con una etapa de diferenciación temprana, mientras que su ausencia indica un estado de diferenciación avanzado (Boettler, Panther et al. 2006) (Kaech, Tan et al. 2003) (Harari, Enders et al. 2009) por lo que, la combinación de las moléculas de expresión CD127 y CD45RA permite evaluar las etapas de diferenciación en células T CD8 de memoria específicas del antígeno. Cabe destacar que otros estudios en los cuales la diferenciación celular ha sido determinado en base a la expresión de CD27 y CD28 (CD28⁺CD27⁺, diferenciación temprana y CD28⁻CD27⁻, diferenciación tardía), muestran una mayor población de células totalmente diferenciadas en pacientes con sintomatología cardíaca asociando este fenotipo a la patología clínica (Albareda, Laucella et al. 2006).

Por otro lado en modelos murinos, ha sido evidenciado que posterior al tratamiento con benznidazol, cuando el antígeno es totalmente eliminado, las células TCD8⁺ presentes muestran un fenotipo característico de células de memoria central, contrario al fenotipo de memoria efectora determinado en ratones con infección crónica no tratados con el fármaco. Esto indica que, el aclaramiento antigénico aún tras una prolongada exposición al parásito genera cambios fenotípicos en los linfocitos TCD8⁺ dando como resultado el desarrollo y mantenimiento de una población de células T de memoria central (Bustamante, Bixby et al. 2008). En este sentido, nuestros resultados por-tratamiento muestran que, el benznidazol es capaz de modular el fenotipo observándose para todos los epítopes ensayados una significativa disminución de porcentaje de células T CD8⁺ de memoria efectora en pacientes en fase cardíaca. Así mismo, para los epítopes HSP70₂₁₀₋₂₁₈, 12827 y K1 se observa un aumento significativo en el porcentaje de células T_{TD}. En general, post el tratamiento con benznidazol se observan cambios fenotípicos variables y dependientes del epítipo y paciente evaluado.

6.-Conclusiones

1. Se han identificado 11 nuevos epítopes restringidos a la molécula HLA-A*02:01 contenidos en las proteínas HSP70 (HSP70₂₁₀₋₂₁₈ y HSP70₃₁₆₋₃₂₄), PFR2 (PFR2₁₉₋₂₈, PFR2₁₅₆₋₁₆₃ y PFR2₄₄₉₋₄₅₇), PFR3 (PFR3₄₂₈₋₄₃₆ y PFR3₄₈₁₋₄₈₉) y TcCA-2 (12819, 12822, 12827 y 12828) de *T. cruzi*, que son reconocidos, procesados y presentados en el contexto de la infección natural de *T. cruzi*.
2. Los epítopes identificados inducen una respuesta multifuncional, secretora de citoquinas e inductora de actividad citotóxica, en linfocitos T CD8⁺ circulantes de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica.
3. Dichos epítopes, inducen un perfil de citoquinas del tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-6). Además, se observa una correlación inversamente proporcional, entre el nivel de secreción de estas citoquinas y el grado de patología de la enfermedad.
4. Los epítopes contenidos en las proteínas PFR2 (PFR2₁₉₋₂₈, PFR2₁₅₆₋₁₆₃ y PFR2₄₄₉₋₄₅₇) y PFR3 (PFR3₄₂₈₋₄₃₆ y PFR3₄₈₁₋₄₈₉) de *T. cruzi*, inducen una respuesta citotóxica epítope-específica diferencial según el grado de patología, observándose secreción de GzB sólo en pacientes en fase crónica indeterminada de la enfermedad.
5. En pacientes con enfermedad de Chagas se observa una actividad de la enzima indolamina-2.3-dioxigenasa (IDO) estadísticamente superior con respecto a individuos sanos. Adicionalmente, existe una correlación positiva entre los niveles de actividad IDO y el grado de patología en la fase crónica de la enfermedad.
6. El tratamiento con benznidazol induce una ruptura de la tolerancia inmunológica vinculada al incremento de la actividad IDO inducida por la infección con *T. cruzi*. La disminución de dicha actividad enzimática en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica sintomática, tras el tratamiento, proporciona una evidencia inmunológica de los efectos inducidos por el fármaco en esta fase de la enfermedad. Por ello, la determinación de la actividad IDO podría constituir un biomarcador de eficacia terapéutica en pacientes sintomáticos.

7. El fenotipo de los linfocitos T CD8⁺ específicos para los epítopes más relevantes contenidos en las proteínas HSP70 (HSP70₂₁₀₋₂₁₈), PFR2 (PFR2₄₄₉₋₄₅₇), PFR3 (PFR3₄₂₈₋₄₃₆) y TcCA-2 (12822 y 12827) identificados mediante el uso de dextrámeros, presentan un perfil fenotípico diferencial según el grado de patología. Así, en pacientes en fase indeterminada se observa una mayor proporción de células con un fenotipo T_{NAIVE} con respecto a pacientes en fase cardíaca donde predomina un fenotipo de memoria efectora T_{EM} y T_{EMRA}. Así mismo, en fase cardíaca se observa un mayor porcentaje de células senescentes, lo que podría estar vinculado a la persistente activación del sistema inmunitario de esta fase de la infección.
8. En los linfocitos T CD8⁺ circulantes de pacientes con enfermedad de Chagas, para los cuales fue observada una activación funcional, el tratamiento con benznidazol induce una disminución tanto en la frecuencia de células T CD8⁺ citotóxicas como en el nivel de secreción de citoquinas frente a los epítopes identificados. Por el contrario, en algunos pacientes en fase crónica cardíaca, para los cuales no se observaba respuesta tras el tratamiento con benznidazol se evidencia la inducción de actividad citotóxica y secretora de citoquinas frente a varios de los epítopes a estudio.
9. Tras el tratamiento con benznidazol, en pacientes en fase crónica indeterminada y cardíaca, se observan modificaciones en el fenotipo de células de memoria T CD8⁺ antígeno-específicas y en el porcentaje de células senescentes y no-senescentes. Estos cambios fenotípicos son variables y dependientes del epítope y paciente evaluado.

7.-Bibliografía

- Abel, L. C., L. K. Iwai, et al. (2005). "T cell epitope characterization in tandemly repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 protein." Microbes Infect **7**(11-12): 1184-1195.
- Abrahamsohn, I. A. (1998). "Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection." Braz J Med Biol Res **31**(1): 117-121.
- Abramo Orrego, L., J. C. Lansetti, et al. (1980). "[Hemoculture as a diagnostic method in Chagas disease]." Medicina (B Aires) **40 Suppl 1**: 56-62.
- Akbar, A. N. and S. M. Henson (2011). "Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity?" Nat Rev Immunol **11**(4): 289-295.
- Alarcon de Noya, B., Z. Diaz-Bello, et al. (2010). "Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela." J Infect Dis **201**(9): 1308-1315.
- Albareda, M. C., S. A. Laucella, et al. (2006). "*Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients." Int Immunol **18**(3): 465-471.
- Albareda, M. C., G. C. Olivera, et al. (2009). "Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4+ T cells to immune senescence." J Immunol **183**(6): 4103-4108.
- Albareda, M. C., G. C. Olivera, et al. (2009). "Chronic Human Infection with *Trypanosoma cruzi* Drives CD4+ T Cells to Immune Senescence." J Immunol.
- Aliberti, J. C., J. T. Souto, et al. (2001). "Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection." Am J Pathol **158**(4): 1433-1440.
- Alvarez, M. G., M. Postan, et al. (2008). "HLA Class I-T Cell Epitopes from trans-Sialidase Proteins Reveal Functionally Distinct Subsets of CD8 T Cells in Chronic Chagas Disease." PLoS Negl Trop Dis **2**(9): e288.
- Alvarez, M. G., M. Postan, et al. (2008). "HLA Class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8+ T cells in chronic Chagas disease." PLoS Negl Trop Dis **2**(9): e288.
- Alves, M., M. Abuin, et al. (1987). "Molecular strategies of parasitic invasion." **42**: 323-332.
- Andrade, A. L., C. M. Martelli, et al. (2004). "Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi*-infected adolescents after a six-year follow-up." Am J Trop Med Hyg **71**(5): 594-597.
- Andrews, N. W. and W. Colli (1982). "Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells." J Protozool **29**(2): 264-269.
- Appay, V., R. A. van Lier, et al. (2008). "Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues." Cytometry A **73**(11): 975-983.
- Araujo, F. F., J. A. Gomes, et al. (2007). "Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease." Front Biosci **12**: 2797-2806.
- Avila, H. A., D. S. Sigman, et al. (1991). "Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease." Mol Biochem Parasitol **48**(2): 211-221.
- Barcan, L., C. Luna, et al. (2005). "Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease." Liver Transpl **11**(9): 1112-1116.

- Bastin, P., T. Sherwin, et al. (1998). "Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility." *Nature* **391**(6667): 548.
- Becker, T. C., E. J. Wherry, et al. (2002). "Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells." *J Exp Med* **195**(12): 1541-1548.
- Bern, C., D. L. Martin, et al. (2011). "Acute and congenital Chagas disease." *Adv Parasitol* **75**: 19-47.
- Bern, C. and S. P. Montgomery (2009). "An estimate of the burden of Chagas disease in the United States." *Clin Infect Dis* **49**(5): e52-54.
- Bern, C., S. P. Montgomery, et al. (2008). "Chagas disease and the US blood supply." *Curr Opin Infect Dis* **21**(5): 476-482.
- Bixby, L. M. and R. L. Tarleton (2008). "Stable CD8+ T cell memory during persistent *Trypanosoma cruzi* infection." *J Immunol* **181**(4): 2644-2650.
- Bjorkdahl, O., K. A. Barber, et al. (2003). "Characterization of CC-chemokine receptor 7 expression on murine T cells in lymphoid tissues." *Immunology* **110**(2): 170-179.
- Boettler, T., E. Panther, et al. (2006). "Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8+ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection." *J Virol* **80**(7): 3532-3540.
- Bourreau, E., C. Ronet, et al. (2009). "Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*." *Infect Immun* **77**(4): 1465-1474.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braz, L. M., V. Amato Neto, et al. (2008). "Reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in immunosuppressed patients: contributions for the laboratorial diagnosis standardization." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **50**(1): 65-66.
- Brenchley, J. M., N. J. Karandikar, et al. (2003). "Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells." *Blood* **101**(7): 2711-2720.
- Brener, Z., Z. Andrade, et al. (2000). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Brener, Z. and R. T. Gazzinelli (1997). "Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease." *Int Arch Allergy Immunol* **114**(2): 103-110.
- Briceno, L. and W. Mosca (1996). "Defective production of interleukin 2 in patients with Chagas' disease. Purified IL-2 augments in vitro response in patients with chagasic cardiomyopathy." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **91**(5): 601-607.
- Britten, C. M., R. G. Meyer, et al. (2002). "The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays." *J Immunol Methods* **259**(1-2): 95-110.
- Britto, C., M. A. Cardoso, et al. (1993). "A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **88**(1): 171-172.
- Britto, C., C. Silveira, et al. (2001). "Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96**(6): 823-826.

- Britto, C. C. (2009). "Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations." Mem Inst Oswaldo Cruz **104 Suppl 1**: 122-135.
- Burleigh, B. A. and N. W. Andrews (1995). "The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells." Annu Rev Microbiol **49**: 175-200.
- Buscaglia, C. A., J. Alfonso, et al. (1999). "Tandem amino acid repeats from *Trypanosoma cruzi* shed antigens increase the half-life of proteins in blood." Blood **93**(6): 2025-2032.
- Bustamante, J. M., L. M. Bixby, et al. (2008). "Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease." Nat Med **14**(5): 542-550.
- Byrne, G. I., L. K. Lehmann, et al. (1986). "Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular Chlamydia psittaci replication in T24 cells." Infect Immun **53**(2): 347-351.
- Campbell, D. A., S. J. Westenberger, et al. (2004). "The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics." Curr Mol Med **4**(6): 549-562.
- Cano, R. C., E. R. Rubiolo, et al. (1985). "Levels of apolipoproteins and cholesterol of low and high density lipoproteins in asymptomatic Chagas disease." Medicina (B Aires) **45**(3): 269-272.
- Cazorla, S. I., P. D. Becker, et al. (2008). "Oral vaccination with Salmonella enterica as a cruzipain-DNA delivery system confers protective immunity against *Trypanosoma cruzi*." Infect Immun **76**(1): 324-333.
- Cimo, P. L., W. E. Luper, et al. (1993). "Transfusion-associated Chagas' disease in Texas: report of a case." Tex Med **89**(12): 48-50.
- Cordero, E. M., L. G. Gentil, et al. (2008). "Expression of GP82 and GP90 surface glycoprotein genes of *Trypanosoma cruzi* during in vivo metacyclogenesis in the insect vector *Rhodnius prolixus*." Acta Trop **105**(1): 87-91.
- Cortez, M., M. R. Silva, et al. (2006). "*Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice." Microbes Infect **8**(1): 36-44.
- Cuellar, A., S. P. Santander, et al. (2008). "Monocyte-derived dendritic cells from chagasic patients vs healthy donors secrete differential levels of IL-10 and IL-12 when stimulated with a protein fragment of *Trypanosoma cruzi* heat-shock protein-70." Immunol Cell Biol **86**(3): 255-260.
- da Matta Guedes, P. M., F. R. Gutierrez, et al. (2010). "IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis." PLoS Negl Trop Dis **4**(2): e604.
- Darcy, C. J., J. S. Davis, et al. (2011). "An observational cohort study of the kynurenine to tryptophan ratio in sepsis: association with impaired immune and microvascular function." PLoS One **6**(6): e21185.
- de Andrade, A. L., F. Zicker, et al. (1996). "Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection." Lancet **348**(9039): 1407-1413.
- de Araujo-Jorge, T. C. (1989). "The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction." Mem Inst Oswaldo Cruz **84**(4): 441-462.
- de Araujo, F. F., A. B. da Silveira, et al. (2011). "Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease." Hum Pathol **42**(2): 299-301.
- de Araujo, F. F., D. M. Vitelli-Avelar, et al. (2011). "Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease." PLoS Negl Trop Dis **5**(5): e992.

- de Meis, J., A. Morrot, et al. (2009). "Differential regional immune response in Chagas disease." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(7): e417.
- Deane, L. M. (1964). "Animal Reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil." *Rev Bras Malariol Doencas Trop* **16**: 27-48.
- Dias, J. C. (2009). "Elimination of Chagas disease transmission: perspectives." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(4): 41-45.
- Diez, H., M. C. Lopez, et al. (2006). "Evaluation of IFN-gamma production by CD8 T lymphocytes in response to the K1 peptide from KMP-11 protein in patients infected with *Trypanosoma cruzi*." *Parasite Immunol* **28**(3): 101-105.
- DNDi (2013). "Informe de Chagas." *Clinical Research Platform*.
- Donovan, M. J., V. Tripathi, et al. (2012). "Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induced by Leishmania infection of human dendritic cells." *Parasite Immunol* **34**(10): 464-472.
- Duffy, T., M. Bisio, et al. (2009). "Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(4): e419.
- Dumonteil, E., J. Escobedo-Ortegon, et al. (2004). "Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA vaccines in mice." *Infect Immun* **72**(1): 46-53.
- Duranti, M., L. Camargo, et al. (2012). "Evidence for T Cell Help in the IgG Response against Tandemly Repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 Protein in Chronic Chagas Disease Patients." *J Parasitol Res* **2012**: 635873.
- Dutra, W. O. and K. J. Gollob (2008). "Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease." *Curr Opin Infect Dis* **21**(3): 287-292.
- Dutton, R. W., L. M. Bradley, et al. (1998). "T cell memory." *Annu Rev Immunol* **16**: 201-223.
- Effros, R. B. (2003). "Replicative senescence: the final stage of memory T cell differentiation?" *Curr HIV Res* **1**(2): 153-165.
- Fabbro, D. L., M. L. Streiger, et al. (2007). "Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution." *Rev Soc Bras Med Trop* **40**(1): 1-10.
- Fernandez-Villegas, A., M. J. Pinazo, et al. (2011). "Short-term follow-up of chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers." *BMC Infect Dis* **11**: 206.
- Ferraz, M. L., R. T. Gazzinelli, et al. (2009). "Absence of CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, or B lymphocytes has different effects on the efficacy of posaconazole and benznidazole in treatment of experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(1): 174-179.
- Ferreira, C. S., P. C. Martinho, et al. (2001). "Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas disease." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **43**(3): 161-162.
- Ferreira, R. C., B. M. Ianni, et al. (2003). "Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**(3): 407-411.
- Fiuza, J. A., R. T. Fujiwara, et al. (2009). "Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(9): e512.
- Flechas, I. D., A. Cuellar, et al. (2009). "Characterising the KMP-11 and HSP-70 recombinant antigens' humoral immune response profile in chagasic patients." *BMC Infect Dis* **9**: 186.

- Fonseca, S. G., H. Moins-Teisserenc, et al. (2005). "Identification of multiple HLA-A*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8+ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients." Microbes Infect **7**(4): 688-697.
- Fores, R., I. Sanjuan, et al. (2007). "Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation." Bone Marrow Transplant **39**(2): 127-128.
- Fouts, D. L., G. A. Stryker, et al. (1998). "Evidence for four distinct major protein components in the paraflagellar rod of *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem **273**(34): 21846-21855.
- Fujigaki, S., K. Saito, et al. (2001). "Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism." Eur J Immunol **31**(8): 2313-2318.
- Galvão, C., R. Carcavallo, et al. (2003). "A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes." Zootaxa **202**: 1-36.
- García-Alvarez, A., M. Sitges, et al. (2010). "Chagas cardiomyopathy: the potential of diastolic dysfunction and brain natriuretic peptide in the early identification of cardiac damage." PLoS Negl Trop Dis **4**(9).
- Garg, N. and R. L. Tarleton (2002). "Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection." Infect Immun **70**(10): 5547-5555.
- Gascon, J., C. Bern, et al. (2009). "Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries." Acta Trop.
- Gascon, J., C. Bern, et al. (2010). "Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries." Acta Trop **115**(1-2): 22-27.
- Gascon, J. and M. J. Pinazo (2008). "[Controlling vertical transmission of *Trypanosoma cruzi*: the biggest challenge for imported disease in Spain]." Enferm Infecc Microbiol Clin **26**(10): 607-608.
- Gazzinelli, R. T., V. M. Leme, et al. (1990). "Identification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T cells and immune sera from patients with Chagas' disease." Infect Immun **58**(5): 1437-1444.
- Gazzinelli, R. T., I. P. Oswald, et al. (1992). "The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta." Eur J Immunol **22**(10): 2501-2506.
- Giambiagi-deMarval, M., T. Souto-Padron, et al. (1996). "Characterization and cellular distribution of heat-shock proteins HSP70 and HSP60 in *Trypanosoma cruzi*." Exp Parasitol **83**(3): 335-345.
- Gomes, Y. M., V. M. Lorena, et al. (2009). "Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?" Mem Inst Oswaldo Cruz **104** Suppl 1: 115-121.
- Gowthaman, U., S. B. Chodisetti, et al. (2010). "Evaluation of different generic in silico methods for predicting HLA class I binding peptide vaccine candidates using a reverse approach." Amino Acids **39**(5): 1333-1342.
- Guevara-Patino, J. A., M. E. Engelhorn, et al. (2006). "Optimization of a self antigen for presentation of multiple epitopes in cancer immunity." J Clin Invest **116**(5): 1382-1390.
- Guhl, F. (2000). "Programas en la eliminación de la transmisión de la enfermedad de Chagas en Colombia." Medicina **22**(2): 53.

- Guo, Y. J., K. Y. Wang, et al. (2010). "Identification of an HLA-A*0201-restricted CD8(+) T-cell epitope encoded within Leptospiral immunoglobulin-like protein A." Microbes Infect **12**(5): 364-373.
- Hamann, D., P. A. Baars, et al. (1997). "Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells." J Exp Med **186**(9): 1407-1418.
- Harari, A., F. B. Enders, et al. (2009). "Distinct profiles of cytotoxic granules in memory CD8 T cells correlate with function, differentiation stage, and antigen exposure." J Virol **83**(7): 2862-2871.
- Harari, A., F. Vallelian, et al. (2004). "Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load." Eur J Immunol **34**(12): 3525-3533.
- Hislop, A. D., N. H. Gudgeon, et al. (2001). "EBV-specific CD8+ T cell memory: relationships between epitope specificity, cell phenotype, and immediate effector function." J Immunol **167**(4): 2019-2029.
- Houghten, R. A. (1985). "General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(15): 5131-5135.
- Ibanez, C. F., J. L. Affranchino, et al. (1988). "Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs." Mol Biochem Parasitol **30**(1): 27-33.
- Jackson, Y., S. Castillo, et al. (2012). "Metabolic, mental health, behavioural and socioeconomic characteristics of migrants with Chagas disease in a non-endemic country." Trop Med Int Health **17**(5): 595-603.
- Jannin, J. and L. Villa (2007). "An overview of Chagas disease treatment." Mem Inst Oswaldo Cruz **102** Suppl 1: 95-97.
- Jin, D., L. Zhang, et al. (2008). "The inflammatory Th 17 subset in immunity against self and non-self antigens." Autoimmunity **41**(2): 154-162.
- Jones, L. A., L. T. Chin, et al. (1990). "Peripheral clonal elimination of functional T cells." Science **250**(4988): 1726-1729.
- Kaech, S. M., J. T. Tan, et al. (2003). "Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells." Nat Immunol **4**(12): 1191-1198.
- Knubel, C. P., F. F. Martinez, et al. (2010). "Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*." FASEB J **24**(8): 2689-2701.
- Kondo, T., H. Takata, et al. (2009). "Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17." J Immunol **182**(4): 1794-1798.
- Kotturi, M. F., J. Botten, et al. (2009). "A multivalent and cross-protective vaccine strategy against arenaviruses associated with human disease." PLoS Pathog **5**(12): e1000695.
- Krausa, P., M. Brywka, 3rd, et al. (1995). "Genetic polymorphism within HLA-A*02: significant allelic variation revealed in different populations." Tissue Antigens **45**(4): 223-231.
- Kurtz, J. (2004). "Memory in the innate and adaptive immune systems." Microbes Infect **6**(15): 1410-1417.
- Kuschnir, E., H. Sgammini, et al. (1985). "[Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy]." Arg Bras Cardiol **45**(4): 249-256.

- Laemmli, U. K. (1975). "Characterization of DNA condensates induced by poly(ethylene oxide) and polylysine." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(11): 4288-4292.
- Lake, J. A., V. F. de la Cruz, et al. (1988). "Evolution of parasitism: kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(13): 4779-4783.
- Lasso, P., D. Mesa, et al. (2010). "Frequency of specific CD8+ T cells for a promiscuous epitope derived from *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein in chagasic patients." Parasite Immunol **32**(7): 494-502.
- Laucella, S. A., D. P. Mazliah, et al. (2009). "Changes in *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy." Clin Infect Dis **49**(11): 1675-1684.
- Laucella, S. A., M. Postan, et al. (2004). "Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease." J Infect Dis **189**(5): 909-918.
- Leavey, J. K. and R. L. Tarleton (2003). "Cutting edge: dysfunctional CD8+ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection." J Immunol **170**(5): 2264-2268.
- Lent, C. M., J. Ono, et al. (1979). "Identification of serotonin within vital-stained neurons from leech ganglia." J Neurochem **32**(5): 1559-1563.
- Levine, B., J. Kalman, et al. (1990). "Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure." N Engl J Med **323**(4): 236-241.
- Lima-Costa, M. F., C. C. Cesar, et al. (2010). "Plasma B-type natriuretic peptide as a predictor of mortality in community-dwelling older adults with Chagas disease: 10-year follow-up of the Bambui Cohort Study of Aging." Am J Epidemiol **172**(2): 190-196.
- Lorena, V. M., I. M. Lorena, et al. (2010). "Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*." Scand J Immunol **72**(6): 529-539.
- Lu, L. and H. Cantor (2008). "Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells." Cell Mol Immunol **5**(6): 401-406.
- Lula, J. F., M. O. Rocha, et al. (2009). "Plasma concentrations of tumour necrosis factor-alpha, tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and FasLigand/CD95L in patients with Chagas cardiomyopathy correlate with left ventricular dysfunction." Eur J Heart Fail **11**(9): 825-831.
- Luquetti, A. O., J. C. Dias, et al. (2005). "[Diagnosis and treatment of congenital infection caused by *Trypanosoma cruzi* in Brazil]." Rev Soc Bras Med Trop **38 Suppl 2**: 27-28.
- Maga, J. A. and J. H. LeBowitz (1999). "Unravelling the kinetoplastid paraflagellar rod." Trends Cell Biol **9**(10): 409-413.
- Magalhaes, L. M., F. N. Villani, et al. (2013). "High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease." J Infect Dis **207**(4): 661-665.
- Makala, L. H., B. Baban, et al. (2011). "Leishmania major attenuates host immunity by stimulating local indoleamine 2,3-dioxygenase expression." J Infect Dis **203**(5): 715-725.
- Manarin, R., M. F. Pascutti, et al. (2010). "Benznidazole blocks NF-kappaB activation but not AP-1 through inhibition of IKK." Mol Immunol **47**(15): 2485-2491.

- Maranon, C., L. Planelles, et al. (2000). "HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis." Int Immunol **12**(12): 1685-1693.
- Maranon, C., M. C. Thomas, et al. (2001). "The immunization of A2/K(b) 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 **38**(4): 279-287.
- Marcon, G. E., D. M. de Albuquerque, et al. (2011). "*Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients." Mem Inst Oswaldo Cruz **106**(1): 85-91.
- Martin, D. and R. Tarleton (2004). "Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection." Immunol Rev **201**: 304-317.
- Martin, D. L. and R. L. Tarleton (2005). "Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection." J Immunol **174**(3): 1594-1601.
- Martin, D. L., D. B. Weatherly, et al. (2006). "CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes." PLoS Pathog **2**(8): e77.
- Martin, F., C. Puertas, et al. (1997). "Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigenic epitope implicated in the infectivity of fibroblast LLC-MK2 cells." Parasitol Res **83**(3): 226-232.
- Martin, F., J. M. Requena, et al. (1993). "Cytoplasmic-nuclear translocation of the Hsp70 protein during environmental stress in *Trypanosoma cruzi*." Biochem Biophys Res Commun **196**(3): 1155-1162.
- Martins-Melo, F. R., C. H. Alencar, et al. (2012). "Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007." PLoS Negl Trop Dis **6**(2): e1508.
- Masopust, D., S. M. Kaech, et al. (2004). "The role of programming in memory T-cell development." Curr Opin Immunol **16**(2): 217-225.
- Mayer, M. P. and B. Bukau (2005). "Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism." Cell Mol Life Sci **62**(6): 670-684.
- Melo Coutinho, C. M., G. H. Cavalcanti, et al. (1998). "*Trypanosoma cruzi*: detection of a surface antigen cross-reactive to human C-reactive protein." Exp Parasitol **90**(2): 143-153.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." Nat Rev Immunol **4**(10): 762-774.
- Miles, M. A., M. D. Feliciangeli, et al. (2003). "American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies." Bmj **326**(7404): 1444-1448.
- Millar, A. E. and S. J. Kahn (2000). "The SA85-1.1 protein of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase superfamily is a dominant T-cell antigen." Infect Immun **68**(6): 3574-3580.
- Miller, M. J., R. A. Wrightsman, et al. (1997). "Protection of mice against *Trypanosoma cruzi* by immunization with paraflagellar rod proteins requires T cell, but not B cell, function." J Immunol **158**(11): 5330-5337.
- Miyahira, Y. (2008). "*Trypanosoma cruzi* infection from the view of CD8+ T cell immunity--an infection model for developing T cell vaccine." Parasitol Int **57**(1): 38-48.
- Moncayo, A. (2003). "Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries." Mem Inst Oswaldo Cruz **98**(5): 577-591.

- Moncayo, A. and A. C. Silveira (2009). "Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104 Suppl 1**: 17-30.
- Montiel, G. and G. Díaz (2002). "Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*." *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños* **37**(1-2): 57-63.
- Morell, M., M. C. Thomas, et al. (2006). "The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection." *Vaccine* **24**(49-50): 7046-7055.
- Mosca, W. and L. Briceño (2000). "Etiopatogenia de la enfermedad de Chagas una nueva perspectiva." *Arch hosp Vargas* **42**(1): 11-16.
- Mueller, Y. M., S. C. De Rosa, et al. (2001). "Increased CD95/Fas-induced apoptosis of HIV-specific CD8(+) T cells." *Immunity* **15**(6): 871-882.
- Muller, U., V. Sobek, et al. (2003). "Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway." *Eur J Immunol* **33**(1): 70-78.
- Munn, D. H. and A. L. Mellor (2007). "Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance." *J Clin Invest* **117**(5): 1147-1154.
- Munn, D. H., M. D. Sharma, et al. (2005). "GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase." *Immunity* **22**(5): 633-642.
- Murali-Krishna, K. and R. Ahmed (2000). "Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells." *J Immunol* **165**(4): 1733-1737.
- Murcia, L., B. Carrilero, et al. (2012). "Nifurtimox chemotherapy: collateral effects in treated *Trypanosoma cruzi* infected patients." *Rev Esp Quimioter* **25**(1): 74-75.
- Murcia, L., B. Carrilero, et al. (2013). "Risk factors and primary prevention of congenital Chagas disease in a nonendemic country." *Clin Infect Dis* **56**(4): 496-502.
- Murcia, L., B. Carrilero, et al. (2010). "Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country." *J Antimicrob Chemother* **65**(8): 1759-1764.
- Myint, A. M., M. J. Schwarz, et al. (2009). "Neuropsychiatric disorders related to interferon and interleukins treatment." *Metab Brain Dis* **24**(1): 55-68.
- Neira, I., F. A. Silva, et al. (2003). "Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells." *Infect Immun* **71**(1): 557-561.
- Norris, K. A. (1998). "Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance." *Infect Immun* **66**(6): 2460-2465.
- O'Garra, A., P. L. Vieira, et al. (2004). "IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage." *J Clin Invest* **114**(10): 1372-1378.
- Olson, C. L., K. C. Nadeau, et al. (1994). "Molecular and biochemical comparison of the 70-kDa heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*." *J Biol Chem* **269**(5): 3868-3874.
- Ouyang, W., J. K. Kolls, et al. (2008). "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation." *Immunity* **28**(4): 454-467.
- Ozaki, Y., M. E. Guariento, et al. (2011). "Quality of life and depressive symptoms in Chagas disease patients." *Qual Life Res* **20**(1): 133-138.
- Padilla, A. M., J. M. Bustamante, et al. (2009). "CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection." *Curr Opin Immunol* **21**(4): 385-390.

- Pantaleo, G. and A. Harari (2006). "Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases." Nat Rev Immunol **6**(5): 417-423.
- Pasion, S. G., G. W. Brown, et al. (1994). "Periodic expression of nuclear and mitochondrial DNA replication genes during the trypanosomatid cell cycle." J Cell Sci **107** (Pt 12): 3515-3520.
- Perez-Mazliah, D. E., M. G. Alvarez, et al. (2013). "Sequential combined treatment with allopurinol and benznidazole in the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a pilot study." J Antimicrob Chemother **68**(2): 424-437.
- Planelles, L., M. Thomas, et al. (2002). "*Trypanosoma cruzi* heat-shock protein-70 kDa, alone or fused to the parasite KMP11 antigen, induces functional maturation of murine dendritic cells." Immunol Cell Biol **80**(3): 241-247.
- Planelles, L., M. C. Thomas, et al. (2001). "DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection." Infect Immun **69**(10): 6558-6563.
- Planelles, L., M. C. Thomas, et al. (2003). "Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice." Clin Exp Immunol **131**(1): 41-47.
- Pogue, R. R., J. Eron, et al. (1995). "Amino-terminal alteration of the HLA-A*0201-restricted human immunodeficiency virus pol peptide increases complex stability and in vitro immunogenicity." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8166-8170.
- Portman, N. and K. Gull (2010). "The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function." Int J Parasitol **40**(2): 135-148.
- Prata, A. (2001). "Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease." Lancet Infect Dis **1**(2): 92-100.
- Prioli, R. P., J. S. Mejia, et al. (1991). "On the interaction of *Trypanosoma cruzi* neuraminidase and human lipoproteins." Eur J Epidemiol **7**(4): 344-348.
- Puccetti, P. and U. Grohmann (2007). "IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation." Nat Rev Immunol **7**(10): 817-823.
- Rangel-Aldao, R., G. Comach, et al. (1986). "*Trypanosoma cruzi*: polypeptide markers of epimastigotes and trypomastigotes." Mol Biochem Parasitol **20**(1): 25-32.
- Rassi, A., Jr., A. Rassi, et al. (2012). "American trypanosomiasis (Chagas disease)." Infect Dis Clin North Am **26**(2): 275-291.
- Rassi, A., Jr., A. Rassi, et al. (2010). "Chagas disease." Lancet **375**(9723): 1388-1402.
- Rassi Jr, A., A. Rassi, et al. (2009). "Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification." Mem Inst Oswaldo Cruz **104** Suppl 1: 152-158.
- Requena-Mendez, A., M. C. Lopez, et al. (2013). "Evaluating Chagas disease progression and cure through blood-derived biomarkers: a systematic review." Expert Rev Anti Infect Ther **11**(9): 957-976.
- Requena, J. M., A. Jimenez-Ruiz, et al. (1992). "Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase." Mol Biochem Parasitol **53**(1-2): 201-211.
- Revelli, S., C. Le Page, et al. (1999). "Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages." Clin Exp Immunol **118**(2): 271-277.
- Rezende J. M., M. H. (2000). "Forma digestiva da Doença de Chagas".

- Ribeiro, A. L. and M. O. Rocha (1998). "[Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis]." Rev Soc Bras Med Trop **31**(3): 301-314.
- Ribeiro, A. L., M. M. Teixeira, et al. (2006). "Brain natriuretic peptide based strategy to detect left ventricular dysfunction in Chagas disease: a comparison with the conventional approach." Int J Cardiol **109**(1): 34-40.
- Rogers, P. R., C. Dubey, et al. (2000). "Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen." J Immunol **164**(5): 2338-2346.
- Roggero, E., A. Perez, et al. (2002). "Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities." Clin Exp Immunol **128**(3): 421-428.
- Rosemberg, S., C. J. Chaves, et al. (1992). "Fatal meningoencephalitis caused by reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with AIDS." Neurology **42**(3 Pt 1): 640-642.
- Rosenberg, C. S., D. L. Martin, et al. (2010). "CD8+ T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of *Trypanosoma cruzi* infection but are not required for resistance." J Immunol **185**(1): 560-568.
- Ruiz, R. C., S. Favoreto, Jr., et al. (1998). "Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity." Biochem J **330** (Pt 1): 505-511.
- Ryan, K. A., T. A. Shapiro, et al. (1988). "A knotted free minicircle in kinetoplast DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(16): 5844-5848.
- Sabbaj, S., S. L. Heath, et al. (2007). "Functionally competent antigen-specific CD127(hi) memory CD8+ T cells are preserved only in HIV-infected individuals receiving early treatment." J Infect Dis **195**(1): 108-117.
- Sadat-Sowti, B., P. Debre, et al. (1994). "An inhibitor of cytotoxic functions produced by CD8+CD57+ T lymphocytes from patients suffering from AIDS and immunosuppressed bone marrow recipients." Eur J Immunol **24**(11): 2882-2888.
- Sallusto, F., J. Geginat, et al. (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." Annu Rev Immunol **22**: 745-763.
- Sallusto, F., A. Lanzavecchia, et al. (2010). "From vaccines to memory and back." Immunity **33**(4): 451-463.
- Sambrook, J., T. Maniatis, et al. (1989). "Molecular cloning." A laboratory manual. 2nd Ed.
- Savino, W., D. M. Villa-Verde, et al. (2007). "Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*." Cytokine Growth Factor Rev **18**(1-2): 107-124.
- Schenone, H., Jr., H. Gonzalez, et al. (1982). "Experimental infection of rats with *Trypanosoma cruzi* by oral route." Bol Chil Parasitol **37**(1-2): 2-9.
- Schijman, A. G., J. Altcheh, et al. (2003). "Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction." J Antimicrob Chemother **52**(3): 441-449.
- Schijman, A. G., M. Bisio, et al. (2011). "International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients." PLoS Negl Trop Dis **5**(1): e931.
- Schluns, K. S., W. C. Kieper, et al. (2000). "Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo." Nat Immunol **1**(5): 426-432.

- Schofield, C. J., J. Jannin, et al. (2006). "The future of Chagas disease control." Trends Parasitol **22**(12): 583-588.
- Seder, R. A., P. A. Darrah, et al. (2008). "T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design." Nat Rev Immunol **8**(4): 247-258.
- Segura, E. L., E. N. Cura, et al. (1974). "Antigenic makeup of subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*." J Protozool **21**(4): 571-574.
- Sepulveda, P., M. Hontebeyrie, et al. (2000). "DNA-Based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection." Infect Immun **68**(9): 4986-4991.
- Sette, A., J. Sidney, et al. (1994). "Peptide binding to the most frequent HLA-A class I alleles measured by quantitative molecular binding assays." Mol Immunol **31**(11): 813-822.
- Sette, A., A. Vitiello, et al. (1994). "The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes." J Immunol **153**(12): 5586-5592.
- Shevach, E. M. (2001). "Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells." J Exp Med **193**(11): F41-46.
- Shin, H., S. D. Blackburn, et al. (2007). "Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection." J Exp Med **204**(4): 941-949.
- Shin, H. and E. J. Wherry (2007). "CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection." Curr Opin Immunol **19**(4): 408-415.
- Silva, J. S., F. S. Machado, et al. (2003). "The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease." Front Biosci **8**: s314-325.
- Silva, J. S., G. N. Vespa, et al. (1995). "Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages." Infect Immun **63**(12): 4862-4867.
- Silva, L. H. P. a. N., V. (1953). "Sobre una cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulente para o camundongo branco." Folia Clin. Biol. **23**: 197-203.
- Simpson, L. (1979). "Isolation of maxicircle component of kinetoplast DNA from hemoflagellate protozoa." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(4): 1585-1588.
- Simpson, L., A. M. Simpson, et al. (1980). "The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa." Am J Trop Med Hyg **29**(5 Suppl): 1053-1063.
- Singh-Jasuja, H., N. Hilf, et al. (2001). "The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system." Biol Chem **382**(4): 629-636.
- Soeiro Mde, N., M. M. Paiva, et al. (2000). "*Trypanosoma cruzi*: acute infection affects expression of alpha-2-macroglobulin and A2MR/LRP receptor differently in C3H and C57BL/6 mice." Exp Parasitol **96**(2): 97-107.
- Sosa-Estani, S. and E. L. Segura (2006). "Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina." Curr Opin Infect Dis **19**(6): 583-587.
- Souto-Padron, T., M. B. Reyes, et al. (1989). "*Trypanosoma cruzi* proteins which are antigenic during human infections are located in defined regions of the parasite." Eur J Cell Biol **50**(2): 272-278.
- Souza, P. E., M. O. Rocha, et al. (2004). "Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity." Infect Immun **72**(9): 5283-5291.

- Streeck, H., Z. L. Brumme, et al. (2008). "Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8+ T cells." PLoS Med **5**(5): e100.
- Strout, R. G. (1962). "A method for concentrating hemoflagellates." J Parasitol **48**: 100.
- Stuart, K., R. Brun, et al. (2008). "Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases." J Clin Invest **118**(4): 1301-1310.
- Surh, C. D. and J. Sprent (2008). "Homeostasis of naive and memory T cells." Immunity **29**(6): 848-862.
- Talvani, A., M. O. Rocha, et al. (2004). "Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy." Clin Infect Dis **38**(7): 943-950.
- Talvani, A., M. O. Rocha, et al. (2005). "Brain natriuretic peptide measurement in Chagas heart disease: marker of ventricular dysfunction and arrhythmia." Int J Cardiol **100**(3): 503-504.
- Tarleton, R. L. (2003). "Chagas disease: a role for autoimmunity?" Trends Parasitol **19**(10): 447-451.
- Tarleton, R. L. (2007). "Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*." Curr Opin Immunol **19**(4): 430-434.
- Tarleton, R. L. and J. W. Curran (2012). "Is Chagas disease really the "new HIV/AIDS of the Americas"?" PLoS Negl Trop Dis **6**(10): e1861.
- Tarleton, R. L., R. Reithinger, et al. (2007). "The challenges of Chagas Disease-- grim outlook or glimmer of hope." PLoS Med **4**(12): e332.
- Tarleton, R. L., J. Sun, et al. (1994). "Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease." Infect Immun **62**(5): 1820-1829.
- Teixeira, A. R., R. J. Nascimento, et al. (2006). "Evolution and pathology in chagas disease--a review." Mem Inst Oswaldo Cruz **101**(5): 463-491.
- Teixeira, D. E., M. Benchimol, et al. (2012). "Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease." PLoS Negl Trop Dis **6**(8): e1749.
- Terness, P., T. M. Bauer, et al. (2002). "Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites." J Exp Med **196**(4): 447-457.
- Thomas, M. C., A. Fernandez-Villegas, et al. (2012). "Characterization of an immunodominant antigenic epitope from *Trypanosoma cruzi* as a biomarker of chronic Chagas' disease pathology." Clin Vaccine Immunol **19**(2): 167-173.
- Thomas, M. C., J. L. Garcia-Perez, et al. (2000). "Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level." DNA Cell Biol **19**(1): 47-57.
- Thomas, M. C., M. V. Longobardo, et al. (2001). "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 **123**(3): 465-471.
- Tomiya, H., T. Matsuda, et al. (2002). "Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype." J Immunol **168**(11): 5538-5550.
- transplante., R. C. I. d. d. y. (2009). "Transplante Iberoamérica. Recomendación REC-RCIDT-2009 (11) sobre determinaciones serológicas en los donantes de órganos." Newsletter **III**(1): 20.
- Urbina, J. A. (2009). "Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease." Mem Inst Oswaldo Cruz **104** Suppl 1: 311-318.

- Valmori, D., J. F. Fonteneau, et al. (1998). "Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues." *J Immunol* **160**(4): 1750-1758.
- Valmori, D., N. Gervois, et al. (1998). "Diversity of the fine specificity displayed by HLA-A*0201-restricted CTL specific for the immunodominant Melan-A/MART-1 antigenic peptide." *J Immunol* **161**(12): 6956-6962.
- van der Aar, A. M., R. de Groot, et al. (2011). "Cutting Edge: Virus Selectively Primes Human Langerhans Cells for CD70 Expression Promoting CD8+ T Cell Responses." *J Immunol* **187**: 3488-3492.
- Van Voorhis, W. C. and H. Eisen (1989). "Fl-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue." *J Exp Med* **169**(3): 641-652.
- Vasconcelos, R. H., F. N. Amaral, et al. (2010). "Increased levels of IgA antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* differentiate digestive forms of Chagas disease." *Hum Immunol* **71**(10): 964-967.
- Vercosa, A. F., V. M. Lorena, et al. (2007). "Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic Chagasic patients." *J Clin Lab Anal* **21**(5): 271-276.
- Vilar-Pereira, G., A. A. Silva, et al. (2012). "*Trypanosoma cruzi*-induced depressive-like behavior is independent of meningoencephalitis but responsive to parasiticide and TNF-targeted therapeutic interventions." *Brain Behav Immun* **26**(7): 1136-1149.
- Villalba, R., G. Fornes, et al. (1992). "Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report." *Clin Infect Dis* **14**(2): 594-595.
- Villalta, F., Y. Zhang, et al. (1999). "Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through protein kinase C activation." *Mol Cell Biol Res Commun* **2**(1): 64-70.
- Viotti, R., B. A. de Noya, et al. (2013). "Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease." *Antimicrob Agents Chemother*.
- Viotti, R., C. Vigliano, et al. (2011). "Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease." *PLoS Negl Trop Dis* **5**(9): e1314.
- Viotti, R., C. Vigliano, et al. (1994). "Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up." *Am Heart J* **127**(1): 151-162.
- Viotti, R., C. Vigliano, et al. (2009). "Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities." *Expert Rev Anti Infect Ther* **7**(2): 157-163.
- Vitelli-Avelar, D. M., R. Sathler-Avelar, et al. (2005). "Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes." *Scand J Immunol* **62**(3): 297-308.
- Vitelli-Avelar, D. M., R. Sathler-Avelar, et al. (2008). "Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease." *Scand J Immunol* **68**(5): 516-525.
- Vitiello, A., D. Marchesini, et al. (1991). "Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex." *J Exp Med* **173**(4): 1007-1015.

- Wentworth, P. A., A. Vitiello, et al. (1996). "Differences and similarities in the A2.1-restricted cytotoxic T cell repertoire in humans and human leukocyte antigen-transgenic mice." Eur J Immunol **26**(1): 97-101.
- Wherry, E. J. and R. Ahmed (2004). "Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection." J Virol **78**(11): 5535-5545.
- Wherry, E. J., D. L. Barber, et al. (2004). "Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(45): 16004-16009.
- Wherry, E. J., J. N. Blattman, et al. (2003). "Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment." J Virol **77**(8): 4911-4927.
- WHO (2002). "Control of Chagas disease. Second report of the WHO expert committee." Geneva: World Health Organization Technical report series n° 905: i-vi, 1-109, back cover.
- WHO, W. H. O. (2012). "Chagas disease (American trypanosomiasis) - fact sheet (revised in August 2012)." Wkly Epidemiol Rec **87**(51/52): 519-522.
- Wizel, B., M. Nunes, et al. (1997). "Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8+ TC1 responses." J Immunol **159**(12): 6120-6130.
- Woodland, D. L. and R. W. Dutton (2003). "Heterogeneity of CD4(+) and CD8(+) T cells." Curr Opin Immunol **15**(3): 336-342.
- Woodland, D. L. and J. E. Kohlmeier (2009). "Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues." Nat Rev Immunol **9**(3): 153-161.
- Woolley, D. W. and R. B. Merrifield (1963). "Anomalies of the structural specificity of peptides." Ann N Y Acad Sci **104**: 161-171.
- Wrightsmann, R. A., K. A. Luhrs, et al. (2002). "Paraflagellar rod protein-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes target *Trypanosoma cruzi*-infected host cells." Parasite Immunol **24**(8): 401-412.
- Wrightsmann, R. A. and J. E. Manning (2000). "Paraflagellar rod proteins administered with alum and IL-12 or recombinant adenovirus expressing IL-12 generates antigen-specific responses and protective immunity in mice against *Trypanosoma cruzi*." Vaccine **18**(14): 1419-1427.
- Yoshida, N. (2006). "Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*." An Acad Bras Cienc **78**(1): 87-111.
- Yoshida, N. (2008). "*Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity." Parasitol Int **57**(2): 105-109.
- Young, D. B. (1990). "Stress proteins and the immune response." Antonie Van Leeuwenhoek **58**(3): 203-208.
- Zangerle, R., B. Widner, et al. (2002). "Effective antiretroviral therapy reduces degradation of tryptophan in patients with HIV-1 infection." Clin Immunol **104**(3): 242-247.
- Zeledon, R. and J. E. Rabinovich (1981). "Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors." Annu Rev Entomol **26**: 101-133.
- Zimmerman, C., K. Brduscha-Riem, et al. (1996). "Visualization, characterization, and turnover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts." J Exp Med **183**(4): 1367-1375.

