

Química de los Laureados 2013/ Artículo de Revisión

El *Trypanosoma cruzi*, parásito que causa la enfermedad de Chagas, modula la señalización inducida por interleuquina-6 a través de la degradación del receptor gp130 en diferentes células del huésped

Por Dr. Nicolás Eric Ponce, Bioq. Liliana Sanmarco, Dra. Susana Gea y Dra. María del Pilar Aoki.

paoki@fcq.unc.edu.ar

Integrantes del Departamento de Bioquímica Clínica y del CIBICI (CONICET Córdoba), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Resumen:

Interleuquina-6 es una citoquina pleiotrópica que participa en la respuesta inmune y en la supervivencia de las células a través de la activación del factor de transcripción STAT3 vía el receptor transductor de señales (gp)130. Previamente se reportó que el parásito cardioprotéico *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, y el tratamiento con la principal cisteína proteasa (CP) de *T. cruzi*, cruzipaina, desprovista de actividad enzimática, protegen a cardiomiocitos murinos de la apoptosis causada por déficit de suero. En el presente trabajo, demostramos que cruzipaina inactiva ejerce el efecto anti-apoptótico en los cultivos de células cardíacas a través de la activación del receptor tipo Toll (TLR2) y la IL-6. Si bien niveles similares de IL-6 fueron producidos por estos cultivos estimulados con la CP activa, sorprendentemente no se observó efecto citoprotectivo. En concordancia, el tratamiento de cardiomiocitos o de células esplénicas con cruzipaina activa anuló completamente la fosforilación de STAT3 y su translocación nuclear inducida por IL-6, pero fue revertida cuando la enzima se encontraba complejada con su inhibidor parasitario - chagasin. Además, CP activas secretadas por trypomastigotes ejercieron los mismos efectos sobre la señalización de IL-6 en esplenocitos. Como explicación de estos resultados, demostramos que la actividad enzimática de cruzipaina es capaz de clivar el dominio extracelular de gp130 humano, como también producir la liberación del dominio extracelular tipo inmunoglobulina del receptor en células mononucleares de sangre periférica humana. En conjunto, estos resultados demuestran, por primera vez, que el parásito *T. cruzi* a través de la modulación de su actividad cisteína proteasa dirige

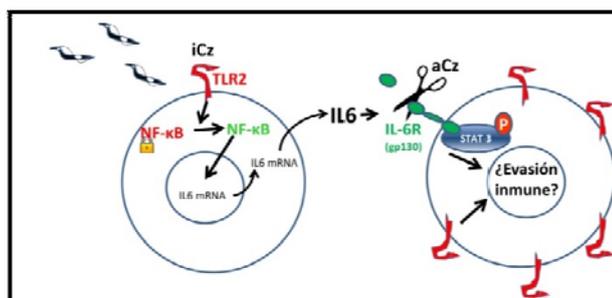
la respuesta inducida por IL-6 en diferentes células del huésped a través del clivaje de su receptor gp130.

Abstract:

Interleukine-6 mediates host defense and cell survival mainly through the activation of the transcription factor STAT3 via the glycoprotein 130, a shared signal-transducing receptor utilized by several IL-6-type cytokines. Previously it was reported that the cardioprotective parasite *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, and the main cysteine protease (CP) secreted by the parasite - inactive - protects murine cardiomyocytes against growth factor deprivation-induced apoptosis. We report here that inactive cruzipain induced an anti-apoptotic effect on cardiac cells cultures via TLR2 signaling and IL-6 production. Although comparable IL-6 levels were found under active cruzipain stimulation, starved cardiac cell monolayers could not be rescued from apoptosis. Moreover, cardiomyocytes or spleen cells treated with active CP completely abrogated the STAT3 phosphorylation and nuclear translocation induced by bioactive IL-6, but it was reverted when the enzyme was complexed with chagasin, a parasite inhibitor. In addition, pre-activated supernatants obtained from trypomastigotes exerted the same effect as active cruzipain on splenocytes. To account for these observations, it was found that cruzipain enzymatically cleaved recombinant human gp130 ectodomain, and induced the release of membrane-distal N-terminal domain of this receptor on human peripheral blood mononuclear cells. These results provide, for the first time, evidence that the parasite may modify the IL-6-induced response by means of gp130 cleavage in different host cells through the modulation of its cysteine protease activity.

Palabras clave

Trypanosoma cruzi * inmunidad innata * cruzipaina * cardioprotección * vía IL-6/gp130/STAT3



La cardiomiopatía chagásica que se genera como consecuencia de la infección con el parásito *Trypanosoma cruzi*, constituye la principal miocarditis infecciosa a nivel mundial, presentando fuertes implicancias socioeconómicas en América Latina [1]. En nuestro país, las últimas estimaciones de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), establecen que existen aproximadamente 1,6 millones de personas infectadas y más de 300.000 afectadas por cardiopatías de origen chagásico. Según el actual Plan Nacional de Chagas la provincia de Córdoba es considerada por el Ministerio de Salud de la Nación en situación de alto riesgo para la transmisión vectorial, ya que existe una re-emergencia de esta vía de contagio por un aumento de la infestación domiciliar y a una alta seroprevalencia en grupos vulnerables [2].

La transmisión vectorial, en la cual *T. cruzi* se adquiere por medio de la picadura de un triatomino hematófago (popularmente conocido como vinchuca), es la principal forma de infección. Cuando el parásito ingresa al hospedador, invade células nucleadas y se replica bajo la forma de amastigote. Tras varios ciclos de división, abandona la célula como trypomastigote propagando la infección a diferentes tejidos por vía sanguínea y linfática. Este protozoo presenta un fuerte tropismo por los cardiomiocitos entre otros tipos celulares. La respuesta inmune que se desencadena favorece el control de la carga parasitaria en la sangre y los tejidos, pero contribuye a una intensa miocarditis. Si bien la base del tropismo por las células musculares es desconocida, resulta evidente que el parásito ha desarrollado estrategias de evasión que le permiten permanecer en un individuo inmunocompetente. Así, la mayoría de los pacientes agudos progresan a una fase crónica durante la cual permanecen asintomáticos por décadas, a pesar del daño tisular ocasionado por la persistencia tisular del parásito. Por lo tanto, es evidente que la regeneración de los tejidos blancos y la supervivencia celular serían eventos críticos para el estado de salud de los individuos chagásicos ya que menos del 30% de las personas infectadas progresan a la cardiopatía, la manifestación más severa de la enfermedad.

La inmunidad innata cardíaca participa en la respuesta contra la infección

La rápida respuesta contra *T. cruzi* y sus productos está determinada por la inmunidad innata, una primera línea de defensa encargada de eliminar y/o contener a los microorganismos. Entre sus componentes se encuentran los receptores tipo-Toll (TLR) que se expresan diferencialmente en células inmunes y no inmunes, y reconocen estructuras expresadas o secretadas por los patógenos e inician la respuesta de defensa. Hasta la fecha han sido identificados 10 y 12 TLRs funcionales en humanos y ratones respectivamente. Nuestro grupo ha reportado que TLR2, TLR4 y TLR9 serían claves para determinar el destino final de la infección con *T. cruzi* sistémica y hepática en un modelo experimental *in vivo* [3, 4]. Estudios realizados con macrófagos han revelado que TLR2 es importante para la síntesis de citoquinas y quemoquinas [5], la internalización del parásito y su replicación [6]. Sin embargo, el estudio sobre la participación de los TLRs en el establecimiento de la infección miocárdica aguda había sido escasamente desarrollado.

El tejido cardíaco participa activamente en la respuesta temprana de defensa contra la infección con *T. cruzi*. Se ha demostrado que los cardiomiocitos vía la activación de diferentes TLRs inducen la generación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-6), mediadores microbicidas (especies reactivas de nitrógeno u oxígeno) y quemoquinas (KC y MIP-2) que controlan la infección y atraen leucocitos al sitio inflamatorio [7, 8]. Conjuntamente la inmunidad innata local también participa en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis tisular. El TLR2 a través del factor de transcripción NF- κ B y la producción de IL-1 β está involucrado en la activación del programa hipertrófico temprano de cardiomiocitos infectados y no infectados [9], asegurando el mantenimiento de la función cardíaca a corto plazo durante la respuesta inflamatoria local. Asimismo, IL-6 y otros miembros de la familia de citoquinas tipo IL-6 son rápida y sostenidamente producidas por diferentes tipos celulares del miocardio en respuesta a injurias cardíacas, generando señales anti-apoptóticas

citoprotectoras instantáneas que facilitan el remodelamiento y/o la reparación del tejido[10].

El estudio de las moléculas derivadas de *T. cruzi* que puedan actuar como ligandos de receptores de inmunidad innata sobre cardiomiocitos y modular la producción de citoquinas, la sobrevida o muerte de este tipo celular, representaría un importante avance para el conocimiento de los eventos que promueven la persistencia de la infección. En este sentido se ha reportado que las moléculas derivadas de *T. cruzi*, como Glicosil-Fosfatidil-Inositol-mucina, Glico-Inositol-Fosfolípidos y el ADN del parásito activan a TLR2, TLR4 y TLR9 respectivamente[11-13]. Por otro lado, diversas evidencias sugieren que cruzipaína, la principal cisteína proteínasa de *T. cruzi*[14, 15], participa en la patogénesis de la enfermedad de Chagas[16], sin embargo no había sido explorado aún si esta glicoproteína podría actuar a través de su unión a algún TLR. Esta enzima con actividad endopeptidasa está diferencialmente localizada dentro del parásito en sus distintos estadios y también es liberada al medio extracelular [17-19]. Cruzipaína tiene un papel activo en la biología del parásito durante su ciclo de vida y es un importante factor de virulencia en la enfermedad de Chagas, ya que se ha correlacionado su actividad proteolítica con la evasión de la respuesta inmune y la invasión de las células del hospedador[20].

La inmunidad innata es clave en la cardioprotección inducida por *t. cruzi*

Nuestro grupo de investigación fue el primero en evidenciar que trypomastigotes de *T. cruzi* (cepa Tulahuen) incrementan la sobrevida de cultivos primarios de cardiomiocitos murinos, disminuyendo la tasa apoptótica inducida por condiciones deficientes de suero. Además hemos publicado que el pre-tratamiento de éstos cultivos con cruzipaína desprovista de actividad enzimática aumenta el efecto anti-apoptótico provocado por el parásito, el cual está mediado por la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y por la actividad de arginasa-II [21]. Además, hemos reportado que al menos dos vías de traducción de señales participan en la sobrevida de las células cardíacas inducida por el

parásito por cruzipaína inactiva, PI3K/Akt y MEK1/ERK1/2.[22].

Recientemente comprobamos[23] que el parásito incrementa tempranamente la expresión de TLR2 en la superficie de cardiomiocitos murinos, independientemente de la relación célula-parásito. Además, evidenciamos que *T. cruzi* protege de la apoptosis a los cardiomiocitos cultivados a través de la acción de la citoquina IL-6, la cual es producida como respuesta a la activación de TLR2. Esta citoquina secretada al medio extracelular activa en los cardiomiocitos al factor de transcripción STAT3 el cual está asociado a eventos de inflamación, defensa y cardioprotección. En estudios *in vivo* pudimos corroborar que las fibras cardíacas expresan significativamente TLR2 durante la infección aguda murina. Conjuntamente encontramos que los cardiomiocitos infectados y no infectados expresan la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en el tejido cardíaco, la cual favorecería a elevar el umbral de muerte celular necesario para la inducción de la apoptosis.

La modulación de la actividad enzimática de las cisteína proteasas parasitarias es crítica para la respuesta celular a il-6

Considerando estos antecedentes, nos propusimos estudiar el mecanismo por el cual cruzipaína inactiva protege a los cardiomiocitos murinos de la apoptosis inducida por déficit de suero. En primer lugar, en un testeo de ligando de TLRs, encontramos que cruzipaína inactiva ejerce un efecto estimulador selectivo sobre TLR2. Luego, evidenciamos que la enzima sin actividad incrementa la expresión de TLR2 en células cardíacas y conduce a la sostenida producción de IL-6, citoquina que al igual que en la infección con los trypomastigotes, tiene un rol crítico del efecto de cardioprotección.

Análogamente a nuestras observaciones, otra enzima de *T. cruzi*, la trans-sialidasa, induce la protección frente a la apoptosis de las células endoteliales, células de Schwann y células neuronales con o sin actividad enzimática [24-26]. Teniendo esto en cuenta, evaluamos el impacto de la actividad enzimática de cruzipaína en el efecto citoprotectivo observado sobre los cardiomiocitos.

Llamativamente, observamos que el tratamiento con cruzipaina activa no induce la protección de las células cardíacas en nuestro modelo. Sin embargo, la propiedad anti-apoptótica de esta cistein proteasa es reestablecida cuando la enzima parasitaria es inactivada por formación de complejo con chagasina, su inhibidor fisiológico parasitario [27]. A pesar de observarse una respuesta cardioprotectiva diferente entre cruzipaina inactiva y enzimáticamente activa, sorprendentemente ambas formas indujeron incrementos significativos comparables en la expresión de TLR2 y en los niveles de IL-6. A raíz de estos resultados, nos planteamos la siguiente pregunta: ¿cuál es el mecanismo por el cual la actividad enzimática de cruzipaina interfiere en el efecto anti-apoptótico siendo que ambas formas inducen, similares niveles de expresión de TLR2 y de concentración de IL-6?

Para responder este interrogante focalizamos nuestros estudios en el receptor de IL-6, que está formado por la subunidad alfa (IL-6R α) y por la glicoproteína de transmembrana gp130. La estructura extracelular de la subunidad gp130 posee un dominio tipo inmunoglobulina, el cual después de la unión de IL-6 es crítico para la dimerización y posterior señalización del receptor. A través de las quinasas Janus (siglas en inglés JAKs) constitutivamente asociadas a gp130, recluta y fosforila STAT3 para que luego éste migre al núcleo donde induce la expresión de genes blancos de IL-6 implicados en la defensa, inflamación y citoprotección [28]. Considerando que se había reportado que la actividad endopeptidasa tipo papaína de cruzipaina es capaz de clivar las diferentes subclases de inmunoglobulinas G humanas [29]; y que el dominio tipo inmunoglobulina de gp130 presenta un plegamiento similar al de las inmunoglobulinas y es crítico para la señalización del receptor; hipotetizamos que la actividad enzimática de cruzipaina podría estar bloqueando la señalización IL-6/STAT3 vía el clivaje proteolítico de gp130.

En efecto, nuestros experimentos demostraron que la incubación de las monocapas de células cardíacas con cruzipaina activa anula completamente la fosforilación de STAT3 y su translocación nuclear inducida por la estimulación

con IL-6 recombinante bioactiva. También encontramos que la actividad de cruzipaina interfiere en la señalización de IL-6 en las células esplénicas, mientras que la señalización de la vía IL-6/gp130/STAT3 se restablecen presencia de cruzipaina inactivada por formación de complejo con chagasina. Posteriormente, demostramos que las cistein proteasas activadas secretadas por los trypomastigotes – donde cruzipaina constituye el principal aporte – anulan la señalización de IL-6 en las células esplénicas e interfieren en el efecto anti-apoptótico en las células cardíacas sometidas a condiciones inductoras de esta muerte celular. De esta manera, nuestros resultados muestran que la actividad cistein proteasa parasitaria es capaz de convertir a diferentes células del hospedador en insensibles a la acción de esta citoquina.

Posteriormente, demostramos que la subunidad gp130 es sustrato de la enzima parasitaria. Empleando células mononucleares de sangre periférica humana comprobamos que la actividad de la enzima disminuye la expresión del dominio tipo inmunoglobulina de gp130 en la superficie de linfocitos y monocitos humanos. Asimismo empleando el péptido recombinante de la fracción extracelular de gp130 humano confirmamos que cruzipaina es capaz de clivar el gp130 humana.

En resumen, nuestras investigaciones han logrado caracterizar estrategias y mecanismos gatillados por el parásito para conferir protección a las células del huésped favoreciendo su persistencia y revelando aspectos desconocidos de la respuesta de la célula cardíaca. Sin embargo, nuestros resultados también demuestran, por primera vez, que el *T. cruzi* puede dirigir la respuesta celular inducida por IL-6 a través del clivaje de gp130, por medio de la modulación de la actividad de su cistein proteasa. Considerando las numerosas citoquinas de la familia de IL-6 activan este receptor y están involucradas en múltiples etapas de la respuesta inmunológica, la interferencia en el señalamiento del eje citoquina/gp130/STAT3 podría ser un mecanismo central utilizado por este protozoo para la evasión de la respuesta anti-parasitaria.

Referencias Bibliográficas

1. WHO, *Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis*. WHO Technical Report Series, 2012. Fact sheet N°340
2. Plan.Nacional.de.Chagas, *Plan Nacional de Chagas 2011-2015* Boletín Oficial Junio - Res. 867/2012., 2012.
3. N Guiñazú, et al., *Immunisation with a major Trypanosomacruzi antigen promotes pro-inflammatory cytokines, nitric oxide production and increases TLR2 expression*. Int J Parasitol. , 2007. 37(11): p. 1243-54.
4. EA Carrera-Silva, et al., *TLR2, TLR4 and TLR9 are differentially modulated in liver lethally injured from BALB/c and C57BL/6 mice during Trypanosomacruzi acute infection*. Moll Immunol, 2008. 45(13): p. 3580-8.
5. PS Coelho, et al., *Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosomacruzi trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages*. J Leukoc Biol, 2002. 71(5): p. 837-44.
6. E Maganto-Garcia, et al., *Rab5 activation by Toll-like receptor 2 is required for Trypanosomacruzi internalization and replication in macrophages*. Traffic, 2008. 9(8): p. 1299-315.
7. MA Campos, et al., *Impaired Production of Proinflammatory Cytokines and Host Resistance to Acute Infection with Trypanosomacruzi in Mice Lacking Functional Myeloid Differentiation Factor 88*. J. Immunol., 2004. 172(3): p. 1711-1718.
8. JH Boyd, et al., *Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response*. Cardiovasc Res, 2006. 72(3): p. 384-93.
9. CA Petersen, et al., *Trypanosomacruzi infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells*. Infect Immun, 2006. 74(3): p. 1580-7.
10. S Negoro, et al., *Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2000. 47(4): p. 797-805.
11. MAS Campos, et al., *Activation of Toll-Like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite*. J. Immunol., 2001. 167(1): p. 416-423.
12. AC Oliveira, et al., *Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to Trypanosomacruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T. cruzi*. J Immunol, 2004. 173(9): p. 5688-96.
13. A Bafica, et al., *Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosomacruzi infection*. J Immunol, 2006. 177(6): p. 3515-9.
14. O Campetella, et al., *The major cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosomacruzi is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes*. Mol Biochem Parasitol, 1992. 50(2): p. 225-34.
15. J Cazzulo, [Cruzipain, major cysteine proteinase of Trypanosomacruzi: sequence and genomic organization of the codifying genes]. Medicina (B Aires), 1999. 59 Suppl 2: p. 7-10.
16. A Morrot, et al., *Human T cell responses against the major cysteine proteinase (cruzipain) of Trypanosomacruzi: role of the multifunctional alpha 2-macroglobulin receptor in antigen presentation by monocytes*. Int Immunol, 1997. 9(6): p. 825-34.
17. O Campetella, et al., *A major cysteine proteinase is developmentally regulated in Trypanosomacruzi*. FEMS Microbiol Lett, 1990. 55(1-2): p. 145-9.
18. IM Aparicio, et al., *A New Cruzipain-Mediated Pathway of Human Cell Invasion by Trypanosomacruzi Requires Trypomastigote Membranes*. Infect. Immun., 2004. 72(10): p. 5892-5902.
19. J Scharfstein, et al., *Host cell invasion by Trypanosomacruzi is potentiated by activation of bradykininB(2) receptors*. J Exp Med, 2000. 192(9): p. 1289-300.
20. PS Doyle, et al., *The Trypanosomacruzi protease cruzain mediates immune evasion*. PLoS Pathog, 2011. 7(9): p. e1002139.
21. MP Aoki, et al., *Cruzipain, a major Trypanosomacruzi antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. 286(2): p. C206-12.
22. MD Aoki, et al., *Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a Trypanosomacruzi glycoprotein*. Microbes Infect, 2006.
23. NE Ponce, et al., *Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during Trypanosomacruzi murine infection*. Med Microbiol Immunol, 2012. 201(2): p. 145-55.
24. MV Chuenkova, et al., *A trypanosomal protein synergizes with the cytokines ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor to prevent*

- apoptosis of neuronal cells.* Mol Biol Cell, 2000. 11(4): p. 1487-98.
25. MV Chuenkova, et al., *Trypanosomacruzi trans-sialidase: a potent and specific survival factor for human Schwann cells by means of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(17): p. 9936-41.
26. WB Dias, et al., *Endothelial cell signalling induced by trans-sialidase from Trypanosomacruzi.* Cell Microbiol, 2008. 10(1): p. 88-99.
27. AC Monteiro, et al., *Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in Trypanosomacruzi.* J Cell Sci, 2001. 114(Pt 21): p. 3933-42.
28. T Kishimoto, *Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology.* Annu Rev Immunol., 2005. 23: p. 1-21.
29. P Berasain, et al., *Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from Trypanosomacruzi.* Mol Biochem Parasitol, 2003. 130(1): p. 23-9.