



TESIS DE DOCTORADO

BIOL. ITZEL BENÍTEZ HERNÁNDEZ

**PAPEL DE LA CRUZIPAÍNA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* SOBRE LA
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA FAMILIA DE QUIMIOCINAS CCL Y SUS
RECEPTORES**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

MAYO 12 DEL 2010

***Tutor:* Eduardo A. García Zepeda**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco principalmente a **DIOS** por darme la fortaleza para seguir adelante durante este *largo y pedregoso* camino para terminar mi doctorado (motivos ajenos a mis responsabilidades como estudiante). Y por las enriquecedoras experiencias de vida que he tenido a lo largo de este proceso para doctorarme.

No tengo palabras para agradecer el apoyo infinito de **MI MADRE** en cada momento de mi vida y aun más durante los tediosos y amargos días de espera para cumplir esta meta. Agradezco profundamente por su ejemplo de esfuerzo, tenacidad y responsabilidad así como las palabras de aliento, su compañía y los consejos tan sabios que siempre me ha brindado.

Para ti es ésta tesis y todo éste trabajo que he realizado ya que es fruto de lo que me has enseñado durante ya 30 años... y los que faltan mi adorada chatita !.

A mi **PADRE** por su ejemplo de esfuerzo por conseguir las metas que se quieren lograr y no rendirse. Por siempre procurar darnos lo mejor para salir adelante. Por los fines de semana que pasamos todos juntos y recuerdo con cariño y por mostrarme su interés ante cualquier problema y brindarme su apoyo.

A mi hermano **STEEVENS** por su ejemplo de tomar grandes decisiones y por enseñarme que hay que luchar por lo que se quiere, siempre apegado a tus principios. Por mostrarme su fortaleza en los momentos difíciles y por siempre preocuparse por mí. ¡Gracias por esos momentos de risas, palabras inusuales y frases célebres !. “No todo es lo que parece... en fin...”

A mi hermano **ANDY** por su ejemplo de generosidad, lealtad y bondad sin hacer distinciones. Por su ejemplo de fortaleza y tenacidad para llegar a la meta. Porque siempre se preocupa por nosotros y nos cuida bajo cualquier circunstancia. Gracias por siempre tener ideas y disposición para la solución fácil y rápida de cualquier inconveniente.

Por supuesto agradezco infinitamente a mi adorado y paciente **FÉLIX** quien ha sido mi pareja incondicional durante muchísimos años de mi vida y con quien he compartido todos mis triunfos y derrotas. Gracias por todo tu apoyo siempre mi vida. Primero fue mi tesis de licenciatura y ahora mi doctorado... que afortunada soy de contar con alguien tan bello como tu cielo. TE AMO infinitamente y no dejo de dar gracias por el regalo de seguir creciendo juntos cada día. Te admiro mucho amor ¡! Gracias por la vida que tenemos juntos, por el hermoso lugar en donde vivimos y por el esfuerzo tan grande de hacer todos nuestros sueños realidad. ¡“Best Place on Earth” ! Gracias por tu paciencia interminable.

Mi agradecimiento para todas las personas que me apoyaron durante el transcurso de mi doctorado. De manera especial agradezco a mi amiga Cinthia Stempin por proporcionarme la herramienta más importante para la realización de mi trabajo “la cruzipaína”.

Agradezco a la Dra. Lilián Yépez Mulia por su interés en mi desarrollo como estudiante y porque siempre fue un gran apoyo durante todo mi doctorado. Siempre tuve un buen consejo de su parte y apoyo incondicional en la revisión de esta tesis doctoral.

A Pedro Ostoa, porque al principio de mi doctorado fue un apoyo técnico del mismo modo que Antonio Ramírez. A las técnicas Juliana y Verónica del grupo de la Dra. Tere Fortoul de la Facultad de Medicina por su apoyo técnico con los cortes y tinciones de tejidos.

Agradezco mucho a la Dra. Ana Flisser por compartir sus conocimientos conmigo y por darme la oportunidad de vivir una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida, el dar clases a alumnos de Facultad y de Postgrado por un año.

Finalmente agradezco mucho el apoyo de toda mi familia (abuelos, tíos, primos) por el apoyo moral que me dieron durante este caminar y principalmente agradezco mucho el apoyo de mi tía María y de Gustavo ya que sin ellos no se cuando podría estar escribiendo estas palabras.

Nunca hay que rendirse
Aunque pongan piedras en tu camino
Si eres honesto
Todo saldrá como tiene que ser

*Gracias a lo que tengo ahora
Estoy convencida que todo
Llega a su debido momento*

INDICE

Lista de figuras	4
Lista de cuadros	5
Lista de abreviaturas	5
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	11
1. Quimiocinas: aspectos generales	11
1.1. Estructura de las quimiocinas	13
1.2. Clasificación de quimiocinas (nomenclatura)	14
2. Receptores de quimiocinas	17
2.1. Antagonistas de quimiocinas y sus receptores	20
3. Quimiocinas de la familia CC y respuesta inmune contra protozoarios parásitos ...	25
3.1. <i>Plasmodium spp.</i>	26
3.2. <i>Leishmania spp</i>	27
4. <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
4.1. Respuesta inmune contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
4.2. Quimiocinas y citocinas en la enfermedad de Chagas	33
4.3. Modelos murinos de infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
5. Cruzipaína: aspectos generales	37
5.1. Cruzipaína y la respuesta inmune durante la enfermedad de Chagas	39
6. Proteólisis de quimiocinas por proteasas derivadas del hospedero y diversos parásitos	41

7. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	44
8. HIPÓTESIS	45
9. OBJETIVO GENERAL	45
9.1 OBJETIVOS PARTICULARES	45
10. MATERIALES Y MÉTODOS	46
11. RESULTADOS	53
12. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	71
13. PERSPECTIVAS	76
14. REFERENCIAS	77
15. ANEXOS	100
Anexo 1. Figuras Suplementarias	101
Anexo 2. Artículo científico	103
Anexo 3. Artículo de revisión	117

Lista de figuras

1. Quimiotaxis
2. Función de las quimiocinas
3. Estructura terciaria de las quimiocinas
4. Clasificación clásica y sistemática de las quimiocinas
5. Quimiocinas y sus receptores
6. Eventos de señalización desencadenados por la unión de la quimiocina con su receptor.
7. Distribución geográfica de la tripanosomosis americana
8. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*
9. Cinética de expresión de quimiocinas
10. Estructura cristalográfica de cruzipaína
11. Esquema de la realización de ensayos de quimiotaxis en cámara de Boyden modificada
12. Análisis inmunohistoquímico de tejido esquelético no infectado ó infectado con la cepa Querétaro de *Trypanosoma cruzi*
13. Presencia de CCL12, CCL2 y cruzipaína en tejido cardiaco obtenido de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*
14. Identificación de diversos tipos celulares presentes en el infiltrado celular durante la fase aguda de la infección producida por *T. cruzi*. en músculo esquelético y corazón
15. Caracterización de la actividad proteolítica de cruzipaína purificada de *Trypanosoma cruzi*
16. Análisis de la actividad proteolítica de cruzipaína sobre CCL12
17. Quimiotaxis de células THP-1 en presencia de los productos de degradación de CCL12
18. Proteólisis de la quimiocina humana CCL13 por la cruzipaína de *Trypanosoma cruzi*
19. Cruzipaína afecta la actividad quimiotáctica de CCL13 sobre células monocíticas
20. Degradación de CCL2 por cruzipaína
21. Efecto de cruzipaína sobre la actividad quimioatrayente de CCL2
22. Efecto de cruzipaína sobre el receptor de quimiocinas CCR1

23. Efecto de cruzipaína sobre el receptor de quimiocinas CCR2
24. CDCP-1 es antagonista de la actividad quimiotáctica de CCL13
25. CDCP-1 inhibe el reclutamiento de células positivas para CD11b en el modelo de peritonitis murina
26. Infiltrado celular de tejido esquelético y cardíaco de ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con CDIP-2 durante la fase aguda de la infección
27. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Lista de cuadros

1. Especificidad de cruzipaína por su sustrato
2. Proteólisis de quimiocinas por proteasas derivadas de diversos parásitos
3. Proteólisis de quimiocinas por proteasas derivadas del hospedero

Lista de abreviaturas

AB: amortiguador de activación

APC: ficoeritrina-aloficocianina

Asp: asparagina

C: cisteína

Ca² : calcio

CCL: ligando de quimiocina

CCR: receptor de quimiocina

CD: célula dendrítica

CD11b: grupo de diferenciación 11b, integrina alfa-M, expresada en monocitos, granulocitos, macrófagos y células NK

CD3: grupo de diferenciación 3, funciona como antígeno, es parte del receptor de células T (TCR) en un linfocito maduro

CD4: grupo de diferenciación 4, glicoproteína expresada sobre la superficie de células Th, T reguladoras, monocitos, macrófagos y células dendríticas

CD8: grupo de diferenciación 8, glicoproteína transmembranal, correceptor del TCR, expresado en células T citotóxicas y células NK

CDCP-1: péptido 1 derivado de la proteólisis de quimiocina por cruzipaína

CDIP-2: péptido inhibitorio derivado de quimiocina-2

Células B: células del bazo

Células T: células del timo

CL: leishmaniosis cutánea localizada

CO² : dióxido de carbono

ConA-She: concanavalina A sefarosa

CP: proteasa de cisteína

CPZ: cruzipaína

Cy5: cianina

Cys: cisteína

DAG: diacilglicerol

DARC: receptor de antígeno Duffy para quimiocinas

DMEM: Dubelco's Minimal Essential Medium

E-64: L-*trans*-epoxysuccinyl-leucyl-amido-(4-guanidino) butane.

EhCP2: proteasa de cisteína -2 de *Entamoeba histolítica*

FITC: isotiocinato de fluoresceína

GAGs: glicosaminoglicanos

GDP: guanosina di-fosfato

gp: glicoproteína

GPCR: receptores acoplados a guanosina

Gr1: antígeno 1 de diferenciación de granulocitos, expresada en granulocitos maduros de médula ósea y tejidos periféricos

GTP: guanosina tri-fosfato

HCL: cloruro de hidrógeno

His: histidina

HPLC: cromatografía líquida de alta afinidad

HRP: peroxidasa de hidrógeno

IFN: interferón

Ig: inmunoglobulina
IL: interleucina
iNOS: sintasa de oxido nítrico inducible
IP2: fosfatidilinositol 1,4,5 di-fosfato
IP3: fosfatidilinositol 1,4,5 tri-fosfato
kDa: kilodaltones
kV: kilovolts
L: ligando
LCD: leishmaniosis cutánea difusa
LMC: leishmaniosis mucocutánea
M: molaridad
mg: miligramos
MHC: molécula del complejo principal de histocompatibilidad
MMP: metaloproteinasa de matriz
MS: espectrometría de masas
ND: no determinado
NFkB: factor nuclear kappa de cadena ligera activador de células B, complejo de proteínas que controla la transcripción de DNA
NI: no infectado
NK: células asesinas naturales
nm: nanómetros
ON: óxido nítrico
P (1,2,3...): posición de cualquier aminoácido que conforma el sustrato para proteasas
p.i: posterior a la infección
PBS: solución amortiguadora de fosfatos
PE: ficoeritrina
PE: ficoeritrina
pH: potencial hidrógeno
PI: yoduro de propidio
PI3K: cinasa de fosfoinositido 3
PKC: proteína cinasa C

PLC: fosfolipasa C

R: receptor

RGS: reguladores de la señalización de proteínas G

SDS-PAGE: dodecil sulfato de sodio-electroforesis en gel de poliacrilamida

SFB: suero fetal bovino

spp: especie

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

TGF- β : factor de crecimiento tumoral- β

Th1: células T ayudadoras, producen IFN- γ , IL-2, TNF- β

Th2: células T ayudadoras, producen IL-4, IL-5, IL-10, IL-13

THP-1: células monocíticas derivadas de un paciente con leucemia aguda

TNF: factor de necrosis tumoral

V: volts

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

VL: leishmaniosis visceral

X: se refiere a la presencia de cualquier aminoácido excepto cisteína (ej. CXC)

β -MeOH: β - mercaptoetanol

μ M: micromolar

RESUMEN

Las quimiocinas juegan un papel inmunoregulador durante el proceso inflamatorio desencadenado por la entrada de un patógeno al hospedero. Estas moléculas se caracterizan por su actividad quimiotáctica y activación de diversos tipos celulares para la eliminación de patógenos.

Nuestro interés fue estudiar el efecto de la cruzipaína de *Trypanosoma cruzi* sobre la migración de células mononucleares que responden a la actividad quimiotáctica de quimiocinas tales como CCL2, CCL12/CCL13. El efecto de la cruzipaína de *T. cruzi* sobre las quimiocinas CC y sus receptores puede relacionarse con la modulación de la respuesta inmune inflamatoria observada durante la infección con el parásito.

Para la realización de este trabajo, se tomó como modelo la enfermedad de Chagas murina, en donde hay una participación importante de quimiocinas de la familia CC durante el proceso inflamatorio característico de esta enfermedad. Así, inicialmente se determinó la presencia de las quimiocinas CCL2, CCL12/CCL13 y de cruzipaína, así como del infiltrado celular en músculo esquelético y cardíaco de ratones BALB/c infectados con la cepa Querétaro de *T. cruzi*, por medio de técnicas inmunohistoquímicas. Además, se determinó la proteólisis *in vitro* de quimiocinas por la cruzipaína del parásito y el efecto de los productos de proteólisis en la migración de monocitos *in vitro*. La proteólisis de quimiocinas se evidenció por SDS-PAGE y los productos de degradación se purificaron e identificaron por HPLC y espectrometría de masas; así como el efecto de cruzipaína sobre receptores de quimiocinas por FACS.

Nuestros resultados permiten asociar la actividad proteolítica de la cruzipaína de *T. cruzi* con un nuevo mecanismo de evasión de este parásito, ya que al ser proteolizadas las quimiocinas CCL12/CCL13 se generan péptidos antagonistas de la migración de monocitos, posiblemente participando en la modulación de la respuesta inflamatoria durante la entrada y establecimiento del parásito, así como durante el desarrollo de la enfermedad de Chagas.

ABSTRACT

Chemokines have an immunoregulatory role during the inflammatory process generated by trauma or pathogen infections. These molecules activate and recruit several immune cells to eliminate microorganisms from host tissues. Chemokines such as CC participate in the development of inflammation during Chagas disease.

Our main objective was to evaluate the effect of cruzipain produced by *Trypanosoma cruzi*, on the migration of monocytic cells recruited by chemokines CCL2, CCL12/CCL13. The effect of *T. cruzi*'s cruzipain on chemokines and their receptors could be associated with the modulation of the inflammatory immune response generated during the infection.

In this study we determined by immunochemistry the presence of cruzipain, CCL2 and CCL12 in skeletal and cardiac tissues from BALB/c mice infected with *T. cruzi* Queretaro strain. In addition, chemokine proteolysis by cruzipain was evaluated by SDS-PAGE and their products were analyzed by HPLC and mass spectrometry. The *in vitro* activity of the proteolytic products on monocytic cell migration assays was performed, and the effect of cruzipain on chemokine receptors was analyzed by FACS.

Our results suggest the participation of cruzipain's proteolytic activity as a new parasite evasion mechanism, modulating chemotactic activities of CCL12/CCL13 chemokines by the generation of antagonist peptides. This evasion mechanism could be used by *T. cruzi* during invasion, establishment and development of Chagas disease.

INTRODUCCIÓN

1. Quimiocinas: aspectos generales

Las quimiocinas son una familia de proteínas cuyo peso molecular va de 8 a 10 kDa. Inicialmente el término “quimiocina” se aplicó a aquellas moléculas cuya principal actividad biológica se consideraba que era quimiotáctica, dirigiendo el movimiento celular a través de gradientes de concentración durante la respuesta inflamatoria (Figura 1).

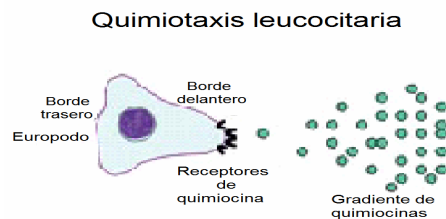


Figura 1. Quimiotaxis. La principal función de las quimiocinas es dirigir la migración celular a través de un gradiente de concentración, ya sea durante un proceso homeostático ó durante un proceso inflamatorio.

En la actualidad se sabe que las quimiocinas, al igual que las citocinas, son proteínas de secreción, las cuales son producidas como pro-péptidos, siendo el péptido señal de aproximadamente 20 aminoácidos. Dicho pro-péptido es cortado para producir una proteína madura mientras se lleva a cabo el proceso de secreción (1).

Las quimiocinas son producidas por leucocitos o células de los tejidos, ya sea constitutivamente o después de un estímulo y ejercen su efecto biológico en forma parácrina ó autócrina. Estas moléculas quimioatrayentes no solamente atraen leucocitos al sitio de inflamación, sino que participan de manera muy importante en el desarrollo de órganos, angiogénesis, angiostasis, recirculación homeostática de leucocitos y en la regulación del sistema inmune (1-4) (Figura 2). La expresión constitutiva de ciertas quimiocinas funciona para orquestrar la migración de células precursoras tanto en médula ósea como en timo durante los diferentes pasos de maduración (5-8). De manera general se puede decir que las quimiocinas participan en la direccionalidad de dos procesos

principales: la extravasación celular y la migración selectiva dentro del tejido, ya sea en estado homeostático ó en un proceso inflamatorio desencadenado por un estímulo ajeno al hospedero (Figura 2). Es importante señalar que a pesar de su papel primordial dentro del sistema inmune, las quimiocinas y sus receptores están asociados a un gran número de patologías tales como esclerosis múltiple, asma, artritis reumatoide, metástasis, entre otras (9-13).

Para dirigir a las células hacia un sitio específico, las quimiocinas forman gradientes de concentración. En un proceso quimioatrayente *in vivo* el establecimiento de este gradiente es a través de la unión a glicosaminoglicanos (GAGs). Los GAGs son azúcares sulfatados de alta heterogeneidad entre los cuales se encuentran heparán sulfato, condroitín sulfato, queratán sulfato y en forma soluble, el ácido hialurónico y la heparina. Los GAGs se expresan en la superficie celular a través de una hélice transmembranal o un ancla lipídica, formando estructuras llamadas proteoglicanos; también se encuentran anclados a la matriz extracelular donde forman parte del glicocalix a través del cual se llevan a cabo múltiples interacciones con quimiocinas y otras proteínas tales como citocinas, factores de crecimiento o enzimas (14, 15). Tal heterogeneidad en la secuencia de los GAGs crea la posibilidad de que las quimiocinas muestren cierta especificidad hacia un tipo de azúcar, lo cual se ve reflejado tanto en la localización, concentración local, tiempo de vida medio, así como en los procesos de señalización de las quimiocinas. Los GAGs sirven como moléculas de anclaje para las quimiocinas que de esta manera son presentadas a los receptores sobre la superficie de leucocitos al momento de su migración; además, los GAGs retienen a las quimiocinas en el sitio en el que fueron producidas y de esta manera permiten la formación de un gradiente direccional el cual puede ser censado por los leucocitos (16). En este sentido, estudios han demostrado que la interacción de las quimiocinas con GAGs juega un papel muy importante durante la migración de los leucocitos a través del endotelio en ensayos *in vitro* y durante procesos inflamatorios (20, 21) (Figura 2). Sin embargo, en la actualidad se sabe que la disrupción del sitio de unión a GAGs no tiene ningún efecto sobre la unión al receptor o la activación celular de las quimiocinas CXCL8, CXCL12 y CCL4, pero sí sobre las quimiocinas CCL3 (17), CCL5 (18) y CCL7 (19), afectando la unión al receptor y con esto la migración celular. La unión GAGs-quimiocina se da a través de interacciones electrostáticas y la región responsable de esta interacción en las quimiocinas

es la porción carboxilo terminal, que está mediada por los residuos de aminoácidos Arginina y Lisina (22-24).

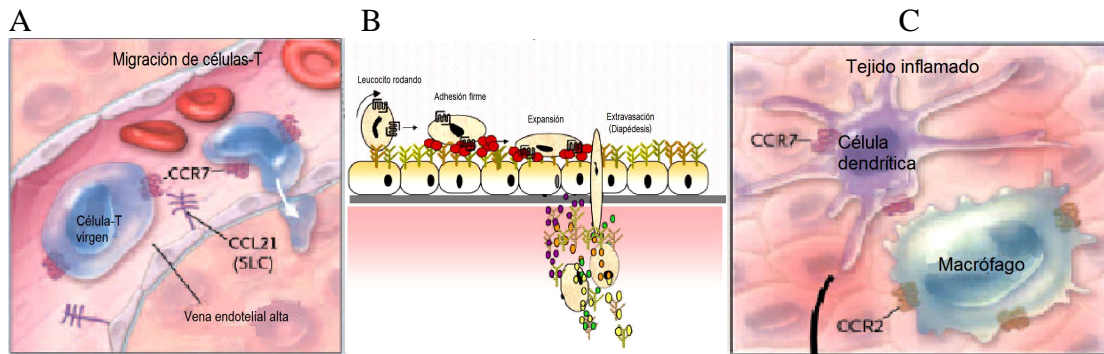


Figura 2. Función de las quimiocinas. **A.** Migración homeostática de linfocitos, **B.** Extravasación celular, interacción quimiocinas-moléculas de adhesión, **C.** Migración de células presentadoras de antígeno durante un proceso inflamatorio.

1.1 Estructura de las quimiocinas

La homología entre quimiocinas es variable, siendo ésta entre un 20 y 90%, lo cual quiere decir que comparten secuencia a nivel de genes y de aminoácidos (8). Todas las quimiocinas muestran un patrón de aminoácidos conservados, los cuales determinan que su estructura terciaria sea conservada entre ellas, tal es el caso de sus cuatro cisteínas características que interaccionan en pares para formar una estructura de llave Griega; además de esto, las quimiocinas tienen interacciones intramoleculares por puentes disulfuro, los cuales unen a la primera y tercera cisteína, así como a la segunda y cuarta cisteína. Las dos primeras cisteínas están localizadas cerca de la parte final del extremo amino terminal de la proteína madura, la tercera cisteína en la parte media y la cuarta se encuentra localizada cerca del extremo carboxilo terminal. De manera general, la estructura cristalográfica de muchas quimiocinas muestra que su estructura terciaria está compuesta por un extremo amino terminal (N-terminal) el cual funciona como dominio de señalización, un asa llamada N que contiene sitios de unión, tres láminas beta y un extremo carboxilo terminal como se muestra en la Figura 3 (25, 26).

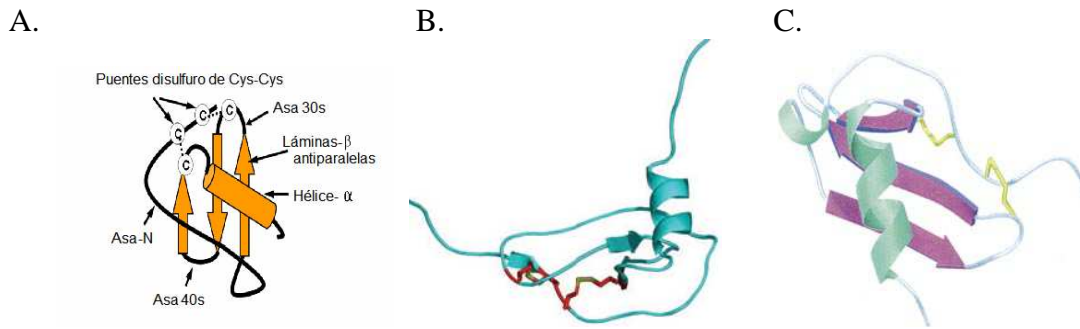


Figura 3. Estructura terciaria de las quimiocinas. **A.** Esquema de la estructura terciaria de las quimiocinas mostrando las tres láminas beta, la hélice alfa, el asa N y las cuatro cisteínas conservadas. **B.** Estructura cristalográfica de la quimiocina CCL2. **C.** Estructura cristalográfica de la quimiocina CXCL12.

1.2 Clasificación de las quimiocinas (nomenclatura)

En la actualidad se han reportado aproximadamente 50 quimiocinas humanas, las cuales se subclasifican en cuatro familias con base al arreglo de los dos primeros residuos de cisteínas presentes en su extremo amino-terminal siendo C, CC, CXC y CX3C la clasificación sistemática. En la literatura se usan actualmente dos sistemas de nomenclatura: las abreviaturas tradicionales, que datan desde antes de que se descubrieran las quimiocinas como las conocemos actualmente, por ejemplo IL-8 y MCP-1, y la nomenclatura sistemática, la cual se estableció debido a que cada vez surgían nuevas quimiocinas; ésta combina aspectos estructurales de las proteínas con la letra “L” para definir que se está hablando de un ligando, así como el número de gene correspondiente a cada quimiocina, como por ejemplo XCL1, CCL5, CXCL12, CX3CL1 (27). Es importante mencionar que se han identificado algunos ortólogos de las quimiocinas humanas en ratón, lo cual ha sido una herramienta importante para estudiar el papel de las quimiocinas; sin embargo, aun falta la identificación de todos los ortólogos en toda la red de quimiocinas, lo cual sin duda sería un beneficio mayor para la ciencia (Figura 4).

La subfamilia más grande es la CC, también conocidas como beta quimiocinas, en donde los dos primeros residuos de cisteína están adyacentes. Hasta ahora se han identificado 27

miembros en esta subfamilia denominados CCL 1- 27. Las quimiocinas CC promueven la migración de monocitos, así como de células asesinas naturales (NK), células dendríticas, basófilos y eosinófilos (28-30). Dentro de esta familia de quimiocinas la más estudiada es la quimiocina CCL2, la cual es expresada por diversos tipos celulares y es quimioatrayente para monocitos, linfocitos T y basófilos (31).

Las quimiocinas CXC o alfa quimiocinas presentan un aminoácido cualquiera entre las dos primeras cisteínas en el extremo amino-terminal. Se han identificado 17 miembros de esta familia en mamíferos, los cuales a su vez se subclasifican, de acuerdo a la presencia de un triplete de aminoácidos presentes antes de los residuos de cisteínas CXC, en positivos ó negativos para Ácido Glutámico, Leucina y Arginina (ELR). Generalmente los miembros positivos para ELR muestran actividad quimioatrayente para neutrófilos, tal es el caso de la quimiocina IL-8, la cual induce la degranulación y estallido respiratorio de los neutrófilos (32). Diversos mediadores inflamatorios entre los que se encuentran IL-1, TNF- α y productos microbianos como polisacáridos, inducen la producción de quimiocinas ELR-CXC positivas. Por otro lado, las quimiocinas ELR negativas como CXCL13 son generalmente quimioatrayentes para linfocitos. Está demostrado que ambos tipos de quimiocinas CXC participan en el proceso de angiogénesis. La producción temprana de ELR-CXC positivas induce angiogénesis, mientras que las ELR-CXC negativas producidas en una etapa posterior podrían estar reteniendo el proceso y son conocidas como quimiocinas angiostáticas (33).

La tercera subfamilia pertenece a las quimiocinas C ó γ quimiocinas, las cuales presentan solo dos residuos de cisteína, ambos cercanos al extremo amino terminal. Hasta la fecha solo se han encontrado dos miembros pertenecientes a este grupo de quimiocinas, XCL1 (linfotactina- α) y XCL2 (linfotactina- β), las cuales presentan actividad quimioatrayente para neutrófilos y linfocitos (34).

En la cuarta y última subfamilia se ha identificado solo un miembro CX3CL1 (fractalcina), la cual presenta tres aminoácidos separando los dos residuos de cisteína presentes en el extremo amino-terminal. Después del proceso de traducción la mayoría de las quimiocinas son secretadas por la célula, con excepción de CX3CL1 y CXCL16, las cuales pueden quedar ancladas a la superficie celular. La característica de estas quimiocinas es que presentan su dominio de quimiocina fusionado a una secuencia de aproximadamente 110

aminoácidos parecida a la mucina, la cual es rica en residuos de serina y treonina, además de un dominio transmembranal y una cola citoplásmica. CX3CL1 y CXCL16 son producidas tanto en su forma unida a membrana, como en forma soluble. Estas quimiocinas actúan no solo como moléculas quimioatrayentes, sino como moléculas de adhesión con capacidad de arrestar células bajo condiciones de flujo fisiológicas (35). La forma CX3CL1 unida a membrana actúa como una molécula de adhesión en el endotelio inflamado promoviendo la retención de monocitos y células T en el tejido (36).

CX3CL	XCL	CCL	CXCL
1	1	1	1
Fractalcina, mNeurotactina	Linfotactina	I-309, mTCA3	Gro- α , mKC
	2	2	2
	SCM-1 β	MCP-1, mJE	Gro- β , mMIP-2
		3	3
		MIP-1 α	Gro- γ
		3L1	4
		3L3	PF-4, mPF-4
		4	4V1
		MIP-1 β	5
		4L1	ENA-78, mLIX?
		4L2	6
		5	GCP-2, mGCP
		RANTES	7
		6	NAP-2
		MIP-1 δ	8
		7	IL-8
		MCP-3, mFIC	9
		8	MIG
		MCP-2	10
		mMIP-1 γ	IP-10, mCRG-2
		9	11
		mMIP-1 γ	I-TAC
		10	12
		Eotaxina	SDF-1
		11	13
		MCP-5	BCA-1, mBLC
		12	14
		MCP-4	BRAK
		13	15
		HCC-1	mLungkine
		14	16
		HCC-2	17
		15	
		HCC-4	
		16	
		TARC	
		17	
		PARC	
		18	
		MIP-3 β , ELC, exodus-3	
		19	
		MIP-3 α , LARC	
		20	
		6CKine, SLC, exodus-2	
		21	
		MDC, mABCD-1	
		22	
		MPIF-1	
		23	
		MPIF-2, eotaxina-2	
		24	
		TECK	
		25	
		Eotaxina-3	
		26	
		CTACK, mESKine	
		27	
		28	
		MEC	

Figura 4. Clasificación clásica y sistemática de las quimiocinas. Los colores indican: **amarillo**; quimiocinas humanas que tienen su equivalente funcional en ratón, **rojo**; quimiocinas que están presentes solo en humano, **azul**; quimiocinas que solo se encuentran en ratón, **morado**; quimiocinas que presentan diferentes funciones en ambas especies.

Actualmente el conocimiento acerca de la biología de las quimiocinas es mayor. Además de que han sido clasificadas de acuerdo a su estructura, se ha propuesto una clasificación de acuerdo a su función específica dentro del sistema inmune, siendo ahora conocidas como quimiocinas homeostáticas (constitutivas) y quimiocinas inflamatorias (inducibles).

Las quimiocinas homeostáticas son expresadas de manera constitutiva y participan en la direccionalidad de leucocitos durante el proceso de hematopoyesis, tanto en timo como en médula ósea; así como en el inicio de la respuesta inmune adaptativa en bazo y en nódulos linfoides (37, 2). La presencia constante de ciertas quimiocinas homeostáticas en tejidos como piel, mucosa intestinal y pulmones, promueven un mantenimiento sano de los mismos. De manera general, la función de las quimiocinas homeostáticas es mantener y coordinar la migración celular necesaria para un funcionamiento adecuado del sistema inmune (38).

Las quimiocinas inflamatorias son aquellas que dirigen la migración de leucocitos efectores durante procesos tales como inflamación, infección, daño al tejido e incluso tumores. Son expresadas por leucocitos circulantes y otras células que han sido activadas y tienen como blanco células del sistema inmune innato y/o adaptativo (38, 39). Es importante mencionar, que diversas quimiocinas caen dentro de las dos categorías funcionales dependiendo del contexto biológico en el que se encuentren, por lo que son conocidas como quimiocinas “duales”.

2. Receptores de quimiocinas

Las quimiocinas llevan a cabo su función quimioatrayente a través de la unión a receptores en la superficie de diversos tipos celulares. Los receptores de quimiocinas se clasifican de acuerdo al tipo de quimiocina que se unen como: C, CC, CXC y CX3C, seguidos de la letra “R” para indicar que es un receptor, así como de un número, el cual indica el orden cronológico en que fue descubierto. Los receptores de quimiocinas se descubrieron inicialmente en leucocitos y posteriormente se ha encontrado que se expresan en células endodermales, mesenquimales, ectodermales y células del sistema nervioso (40-42). El haber identificado la expresión de receptores de quimiocinas en los leucocitos permitió observar que los diferentes tipos de receptores se expresan de manera diferencial en los diversos tipos celulares y que las quimiocinas pueden unirse a uno o varios receptores, así como los receptores unir una o más quimiocinas. Hasta la fecha se han encontrado 18 receptores de quimiocinas, seis CXCR, diez CCR, un XCR y un CX3CR (43) (Figura 5).

La expresión de los receptores de quimiocinas sobre la superficie celular está regulada por la acción de diversas citocinas dependiendo del estado inmunológico del hospedero (44-46)

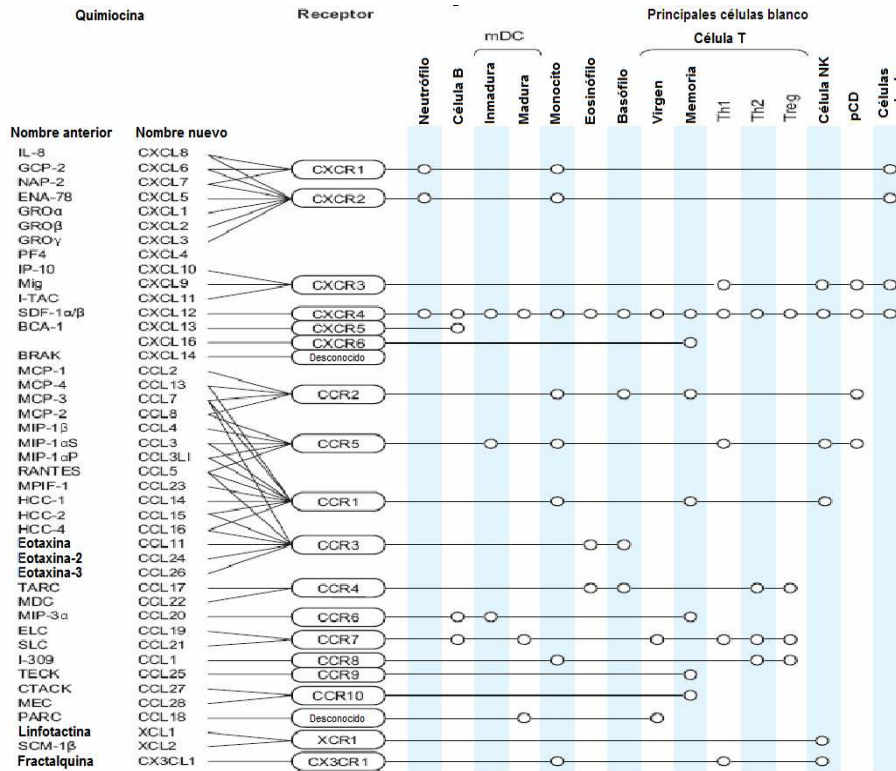


Figura 5. Quimiocinas y sus receptores. Nomenclatura clásica y sistemática, así como los principales tipos celulares atraídos por cada quimiocina.

Hasta ahora no se ha determinado cristalográficamente la estructura de los receptores de quimiocina. Los modelos que se utilizan para describir su estructura están basados en la estructura terciaria descrita para la rodopsina bovina, que hasta hace poco, era el único receptor de siete dominios transmembranales estructuralmente caracterizado. Recientemente se ha caracterizado la estructura de los receptores B1 y 2 adrenérgicos y el de la adenosina A2a, los cuales muestran en común la estructura de 7 dominios transmembranales con diferencias clave entre ellos (47-50). Los siete dominios transmembranales de los receptores de quimiocina están acoplados a proteínas G heterotriméricas de subunidades $\alpha\beta\gamma$ (GPCR- Guanosine-Protein-Coupled-Receptors). Todos los receptores de quimiocina tienen aproximadamente 350 aminoácidos en su

secuencia, tres asas hidrofílicas intracelulares y tres extracelulares, así como un extremo carboxilo terminal con residuos de aminoácidos serina y treonina, importantes para la regulación del receptor. La proteína G está unida al final del extremo carboxilo terminal (intracelular) del receptor, lo cual permite el desencadenamiento de la cascada de señales intracelulares después de la activación del mismo; mientras que el extremo amino terminal determina la especificidad de unión al ligando (51, 52).

La activación del receptor de quimiocina comienza con la unión extracelular del ligando, seguida de un cambio conformacional en el extremo amino-terminal (modelo de los dos pasos) que activa a la proteína G heterotrimérica $\alpha\beta\gamma$ dentro de la célula, causando la disociación de $G\alpha/GDP$ y siendo reemplazada por GTP. Posteriormente, $G\alpha/GTP$ se disocian del receptor y del heterodímero $G\beta\gamma$, que a su vez activa enzimas como fosfolipasa C (PLC) y fosfoinositido 3 cinasa (PI3K), la cual convierte fosfatidilinositol 1,4,5-difosfato (IP2) en fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). A continuación IP3 promueve un flujo de iones de calcio y DAG activa a las isoformas de la proteína cinasa C (PKC). Finalmente se da una cascada de fosforilaciones en las cuales se involucran diversas cinasas y GTPasas, lo cual puede culminar en diferentes funciones celulares dependiendo del tipo de proteína G al cual se acople el receptor de quimiocina tales como; adhesión, quimiotaxis, degranulación, rearrreglo del citoesqueleto, entre otras, (Figura 6) (53). Una vez concluida la activación del receptor de quimiocina se induce su regulación negativa ó desensibilización de la superficie celular siendo éste internalizado y posteriormente degradado o reciclado, dejando de esta manera la membrana celular temporalmente sin respuesta a una posterior estimulación por ligando. El extremo carboxilo terminal presenta residuos de aminoácidos que pueden ser fosforilados, permitiendo la unión de moléculas reguladoras llamadas arrestinas, las cuales causan la desensibilización (54). Otro mecanismo por el cual los receptores de quimiocinas son regulados es la inactivación directa de la proteína G a través de la actividad de GTPasas conocidas como reguladores de la señalización de proteínas G (RGS) (55, 56).

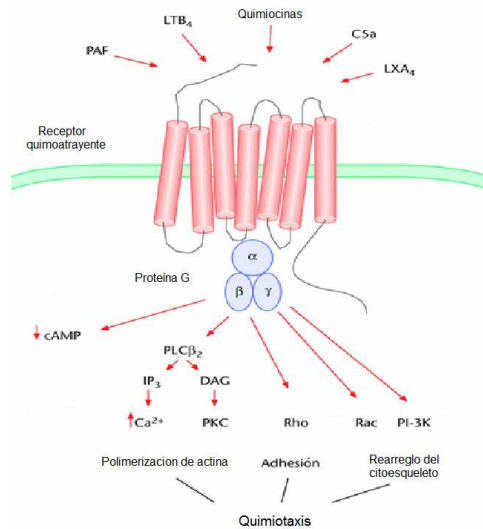


Figura 6. Eventos de señalización desencadenados por la unión de la quimiocina con su receptor.

2.1 Antagonistas de quimiocinas y sus receptores

Debido al papel fundamental de las quimiocinas y sus receptores en la organización y respuesta del sistema inmune, así como a su asociación con el desarrollo de diversas enfermedades, estas proteínas han sido blanco terapéutico importante para la búsqueda y desarrollo de moléculas que modulen su actividad biológica.

Dentro de las estrategias más comunes para la inhibición de la actividad quimiotáctica se encuentra el desarrollo de moléculas ó péptidos antagonistas para los receptores de las quimiocinas. La estructura de proteínas transmembranales acopladas a proteínas G heterotriméricas (GPCRs) facilita de alguna manera su interacción con las moléculas antagonistas del medio extracelular.

Otras estrategias utilizadas en diversos modelos animales es el uso de anticuerpos que reconocen al ligando o al receptor de quimiocina, así como el uso de quimiocinas modificadas en alguno de los aminoácidos principalmente en su extremo amino terminal.

A continuación se mencionan algunos ejemplos donde las actividades biológicas de las quimiocinas y sus receptores son modificadas y utilizadas como blancos terapéuticos en diversas enfermedades.

El VIH es una de las enfermedades de mayor importancia a nivel mundial y el proceso de entrada-fusión del virus al linfocito T CD4 es uno de los blancos principales para detener la infección. La interacción de la glicoproteína 120 de la superficie viral con la molécula CD4 en la superficie del linfocito induce un cambio conformacional en la glicoproteína 120 y con esto su subsecuente unión al receptor de quimiocina CCR5 (57,58) ó CXCR4 (59) expresados en la superficie de la célula hospedera. Una de las estrategias utilizadas para bloquear la función co-receptora de CXCR4 y CCR5 es el empleo de péptidos antibacterianos y antivirales llamados taquiplesinas y polifemusinas, los cuales fueron aislados del hemocele del cangrejo japonés (*Tachypleus tridentatus*) y del cangrejo americano (*Limulus polyphemus*). A partir de estos péptidos se generó el péptido T22 y un péptido de tamaño más pequeño llamado T14 ó T140 el cual posee una fuerte actividad anti-VIH basada en su unión a CXCR4 y como consecuencia la inhibición de la entrada del virus a linfocitos T (60). Debido a la poca estabilidad en suero de este péptido, pero a su alta especificidad para unirse a CXCR4, se generaron análogos del mismo con un tamaño menor, los cuales mostraron mayor resistencia en suero y una fuerte actividad antagonista para CXCR4 (61).

Experimentos recientes utilizando la molécula KRH-3599 que es un derivado del antagonista KRH-1636 ha demostrado que es un potente inhibidor de la replicación del VIH tipo 1, ya que bloquea la unión de la quimiocina SDF-1/CXCL12 con su receptor CXCR4 impidiendo así la liberación de calcio intracelular y quimiotaxis. Además de estas actividades de inhibición y bloqueo, KRH-3955 mostró seguir bioactivo en un 25.6 % después de ser administrado oralmente a ratas (62). La interacción entre CXCR4 y su único ligando CXCL12 está involucrada en el desarrollo de diversas enfermedades, tales como metástasis de células cancerosas, progresión de células en leucemia, y artritis reumatoide (63-65). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que el bloqueo de este eje CXCR4-CXCL12 podría tener implicaciones importantes ya que participa en procesos tales como homeostasis, embriogénesis y en el desarrollo del sistema nervioso central.

El receptor de quimiocinas CCR5 es visto como un blanco importante para la inhibición de la infección por VIH ya que de manera natural hay personas que presentan una delección en este gene conocida como “delta-32”, la cual está relacionada con resistencia a la infección (66). Recientemente se descubrió que el compuesto sintético 30-oxo-calenduladiol

triterpeno, de origen vegetal, inhibe la entrada y la fusión del virus de inmunodeficiencia de la cepa trópica R5 en células permisivas. Este componente compitió de manera selectiva por el receptor de quimiocina CCR5, no activa la vía de señalización ni la internalización del receptor, así como también inhibe la movilización de calcio intracelular y la quimiotaxis celular. Este componente no interactuó con otros receptores de quimiocinas relacionados (CCRs) demostrando que es una molécula altamente selectiva hacia CCR5 y un potente inhibidor de la primera etapa de interacción del virus con las células del hospedero con potencial para su utilización como molécula terapéutica en infecciones con VIH (67).

La quimiocina viral derivada del virus-6 del herpes humano (U83A) (68) actúa como agonista para los receptores de quimiocina CCR1, 4, 6, 8 y con una potencia mayor sobre CCR5, desplazando a las quimiocinas humanas como CCL3 y CCL5 (69). A partir del agonista U83A se generó la forma truncada U83A-N. La unión de U83A inhibe la internalización de CCR5 y compite mejor con el ligando CCL3, y para el caso de U83A-N, se observó que permite una moderada internalización del receptor y bloquea la quimiotaxis de células mononucleares de sangre periférica hacia CCL3 y CCL4. Lo anterior sugiere que el mecanismo por el cual la quimiocina viral U83A, y su forma truncada U83A-N, están inhibiendo la entrada de VIH a las células hospederas está relacionado con la internalización del receptor, la competencia con los ligandos naturales, con el retraso en el proceso de reciclamiento del receptor y con la inhibición del proceso de quimiotaxis de diversos leucocitos (69).

El hacer combinaciones de moléculas antagonistas para VIH (CXCR4-CCR5) las cuales inhiban la entrada así como la fusión del virus a las células hospederas, puede generar un mejor candidato para quimioterapia contra el virus del VIH.

Por otro lado, el asma y desarrollo de alergias causan la generación de procesos inflamatorios agudos y crónicos a millones de seres humanos en todo el mundo. Debido a esto se han realizado diversas investigaciones para generar una posible estrategia terapéutica utilizando moléculas con actividad antagonista sobre la migración de células del sistema inmune, e inhibir la fuerte reacción inflamatoria generada por diversos alérgenos presentes en alimentos ó el medio ambiente.

CCL13 es una de las quimiocinas que se produce durante procesos de inflamación crónica tales como asma, rinitis, aterosclerosis y artritis reumatoide (13). Esta quimiocina se une a los receptores de quimiocina CCR1, 2 y 3 los cuales son expresados en la superficie de monocitos, linfocitos T, células dendríticas y eosinófilos (29). En investigaciones realizadas por nuestro grupo de investigación se analizó la actividad agonista y antagonista de péptidos derivados de la quimiocina CCL13 (70). El péptido denominado CDIP-2 (Chemokine Derived Inhibitory Peptide -2) con la secuencia de aminoácidos KISLQRLKSYVITTSRCPQ presentó un efecto antagonista sobre la quimiotaxis *in vitro* de monocitos THP-1. Este efecto antagonista se observó solo de manera selectiva para CCL13 y no sobre quimiocinas con secuencia similar tales como CCL2 y CCL7, lo cual sugiere que los mecanismos de acción utilizados por quimiocinas con secuencias parecidas difieren entre sí. Con estos resultados se demuestra que se pueden generar moléculas antagonistas dirigidas contra ligandos específicos que compartan los mismos receptores de quimiocinas. Por otro lado, el efecto antagonista de CDIP-2 *in vivo* fue demostrado en un modelo de inducción de asma murino donde el infiltrado inflamatorio y la cantidad de moco en pulmones de ratones tratados con CDIP-2 disminuyeron significativamente (70).

Otras moléculas antagonistas utilizadas para inhibir el reclutamiento celular en asma son el antagonista bi-específico UCB35625 que actúa sobre los receptores de quimiocinas CCR1 y CCR3, (71) y el péptido hidrofóbico CH0076989 que es agonista para CCR3 (72). Las células reclutadas a través de la interacción CCR3-CCL11 son los eosinófilos, los cuales tienen una participación importante en asma.

La patología generada por la presencia de los eosinófilos en el tejido se debe principalmente a la liberación de sustancias tales como, la proteína básica principal, la proteína catiónica y diversas peroxidasas. Los péptidos sintéticos UCB35625 y CH0076989 con actividad dual para CCR3 comparten sitios de unión con el receptor de quimiocina. Lo que hace la diferencia en su actividad es la mutación de uno solo de sus aminoácidos. Una mutación puntual modifica completamente la actividad de estos péptidos sobre el receptor de quimiocina.

Del mismo modo que para estos antagonistas del receptor CCR3 que presentan actividad dual debido a una mutación puntual en el receptor de quimiocina que cambia completamente su actividad biológica, lo mismo puede ocurrir con otras

moléculas/péptidos antagonistas de quimiocinas descritas previamente, ya que las variaciones genéticas en los receptores de quimiocinas (polimorfismos) son altamente frecuentes (73)

Uno de los tipos celulares encontrado en diversas enfermedades, las células cebadas, se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos como epitelios, mucosas, huesos, cerebro y en el tracto reproductivo (74, 75). Además de su importante participación en el desarrollo de la respuesta inmune innata, estas células pueden contribuir al desarrollo de diversas enfermedades. Al estar presentes en las vías aéreas se les relaciona con asma y otras enfermedades de alergia pulmonar. La presencia de células cebadas en diversos tejidos se ha relacionado también con el desarrollo de cáncer, ya que muchos tipos de cánceres humanos están infiltrados por estas células que son reclutadas por quimioatrayentes producidos por células tumorales. En el caso del reclutamiento de células cebadas a través de la interacción CXCL12-CXCR4, se demostró que la progesterona actúa como inhibidor de la migración celular hacia la quimiocina CXCL12 (76). Esta hormona inhibe la expresión de quimiocinas y receptores de quimiocinas tales como CCL5, CX3CL1 así como CCR5 y CXCR4 en humanos (77, 78).

Esta interacción natural inmuno-hormonal debe ser tomada en cuenta al analizar los resultados generados al emplear moléculas antagonistas en los modelos experimentales, ya que por ejemplo la progesterona controla gran parte del sistema inmune en las mujeres a través de sus receptores nucleares encontrados en células cebadas de las vías respiratorias altas, vejiga, glándulas mamarias, útero y ovario (79-81).

La modificación de quimiocinas en su extremo amino terminal ha sido muy utilizada para modular su actividad. El mejor ejemplo es el caso de la quimiocina CCL5 a la cual se le ha agregado el aminoácido metionina en su extremo amino mostrando inhibición en su actividad agonista (82). Un ejemplo de modulación del proceso inflamatorio a través del empleo de quimiocinas modificadas es el uso del antagonista Met-RANTES durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Met-RANTES actúa sobre los receptores de quimiocina CCR1 y CCR5, dando como resultado la disminución de linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺ y CCR5⁺ en el tejido infectado, permitiendo un índice de sobrevivencia mayor de los animales que recibieron el tratamiento con el inhibidor (83). A pesar de que CCL5 y sus

receptores han sido propuestos como un potente agente terapéutico, la inhibición de su actividad ha sido asociada con la desregulación de diversos sistemas; por ejemplo, la participación de CCL5 en glomerulonefritis demostró que sus receptores están involucrados en la reparación glomerular y que esto es una limitante para el uso de antagonistas para este receptor, ya que en respuesta al daño glomerular, el papel de CCL5 parece cambiar de una quimiocina inflamatoria a una quimiocina angiogénica (84).

Los ejemplos anteriores, para los cuales se han utilizado moléculas ó compuestos antagonistas y agonistas de quimiocinas, sugieren que es importante conocer y entender la complejidad de la red biológica de las quimiocinas y sus receptores en los diferentes procesos tales como, maduración, diferenciación, migración, activación y tráfico leucocitario dentro del sistema inmune en homeostasis y en respuesta a un estímulo inflamatorio. De esta manera se podrán generar moléculas antagonistas con actividad específica y desarrollar agentes terapéuticos controlados, con un mejor conocimiento de la biología del sistema inmune.

3. Quimiocinas de la familia CC y respuesta inmune contra parásitos protozoarios

Las quimiocinas tienen una participación importante como mediadores de las diversas funciones de los leucocitos, tales como su activación y direccionalidad en una respuesta inmune inflamatoria. En este capítulo se hará énfasis en la participación de las quimiocinas CC durante el desarrollo de una respuesta inmune contra los parásitos *Plasmodium spp* y *Leishmania spp.*, y en otro capítulo se mencionará en detalle la participación de las quimiocinas en la enfermedad de Chagas, causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, tema de esta tesis.

3.1. *Plasmodium spp.*

El paludismo ó malaria sigue siendo una de las enfermedades más importantes en regiones tropicales y subtropicales. El agente etiológico responsable del paludismo es el protozoario *Plasmodium*, el cual infecta a reptiles, aves y mamíferos. El ciclo biológico de este parásito está mediado por mosquitos hematófagos y se divide en cuatro fases: en el ser humano, una

fase asexual llevada a cabo en el hígado (merozoítos hepáticos) y otra fase en la sangre (merozoítos eritrocíticos). En los mosquitos, se lleva a cabo la fase sexual (oocinetos), seguida de otra fase asexual (esporozoítos) (85). Solo cuatro especies de *Plasmodium* infectan al ser humano: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. falciparum*, siendo este último el más estudiado, por ser el agente más letal del paludismo humano (85).

La infección por *P. falciparum* va desde una infección asintomática a episodios febriles agudos, anemia grave, malaria cerebral y malaria placentaria en mujeres embarazadas. Una de las hipótesis sustentada por varios grupos de investigación es que además de los factores de virulencia del parásito, la participación de mediadores inflamatorios así como los niveles de expresión de éstos, determinan la severidad de la enfermedad, ya que tanto en malaria cerebral como placentaria se ha observado la presencia de quimiocinas en suero y en cerebro, tales como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 y receptores de quimiocinas como CCR5, CCR3 y CCR1, además de la expresión de citocinas inflamatorias como, IFN- γ , TNF- α , IL-12 e IL-1 β (86-90). De manera general, el secuestro de *P. falciparum*, ya sea en el cerebro o en la placenta de personas infectadas, promueve la secreción de quimiocinas- β por células mononucleares las cuales a su vez atraen otras células como macrófagos al sitio de infección. Los macrófagos fagocitan al parásito y al pigmento hemozoína, lo cual induce la producción de más citocinas y quimiocinas (91), aumentando los niveles de citocinas proinflamatorias en un ambiente local, consiguiendo con esto la eliminación del parásito. Cabe mencionar que la participación de citocinas Th2 es un elemento crucial, ya que está demostrado que altos niveles de IL-10 están relacionados con severidad en malaria, pero por otro lado, una adecuada regulación de Th1 mediada por esta citocina en la placenta evita situaciones fatales como el aborto.

El antígeno Duffy, el cual actúa como receptor para *P. vivax* y *P. knowlesi*, promoviendo la internalización del parásito a los eritrocitos, también lo hace como receptor de las quimiocinas, CCL5, CCL2 y CXCL8, por lo que se le denomina Receptor de Antígeno Duffy para Quimiocinas (DARC, por sus siglas en inglés). Se sabe que DARC puede tener un papel como receptor carroñero en la superficie de eritrocitos eliminando el exceso de producción de quimiocinas en diversas situaciones patológicas (92).

3.2. *Leishmania spp.*

Uno de los parásitos protozoarios mas estudiados a nivel mundial es *Leishmania spp.* Éste parásito protozoario utiliza como vector a la mosca de la arena del género *Phlebotomus* (viejo mundo) ó *Lutzomyia* (nuevo mundo) el cual se vuelve portador de *Leishmania* cuando se alimenta de la sangre de un individuo infectado. La infección producida por *Leishmania* inicia cuando un vector infectado inocula los parásitos dentro de la dermis mientras se alimenta de la sangre de su hospedero. Una vez dentro del hospedero, la forma promastigote del parásito comienza a replicarse dentro de las células fagocíticas y eventualmente estas células infectadas migran hacia los nódulos linfoides donde se lleva a cabo la presentación de antígeno a los linfocitos vírgenes (93).

Leishmania spp. causa diversas manifestaciones clínicas. Cuando la infección es en la piel puede manifestarse como leishmaniosis cutánea localizada (CL), leishmaniosis cutánea difusa (LCD) ó leishmaniosis mucocutánea (LMC), mientras que a nivel visceral (VL), ésta puede ser de índole subclínico hasta potencialmente fatal. Una vez establecida la infección por *Leishmania* en la piel, se desencadena un proceso inflamatorio que involucra la acumulación de leucocitos en el sitio donde el parásito fue inoculado. El reclutamiento de estos leucocitos es un paso clave en esta primera fase de la infección ya que es lo que va a determinar que se desarrolle o no la enfermedad. El establecimiento del parásito está determinado en parte por la susceptibilidad del hospedero ya que se ha observado que la saliva del vector *Lutzomyia longipalpis* induce la expresión de CCL2 así como su receptor CCR2 promoviendo el reclutamiento de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos después de 12 horas en ratones susceptibles y no así en ratones resistentes. Esto sugiere que la saliva del vector *Lutzomyia longipalpis* modula el reclutamiento inicial de macrófagos en el sitio donde se lleva a cabo la inoculación de *Leishmania*, facilitando la entrada y establecimiento del parásito en un ambiente hostil dentro de la piel del hospedero (94). Por otro lado, está demostrado que otros ligandos de CCR2 tales como la quimiocina CCL12, la cual comparte mas del 60% de homología con CCL2 (95), puede tener un papel más relevante en la activación del receptor después de la infección por *L. major* (96).

Durante la infección por *Leishmania*, las células fagocíticas tienen diversas actividades críticas para coordinar una respuesta inmune efectiva como son: resguardar los sitios de entrada del patógeno al hospedero como la piel o las mucosas, y llevar las señales de alerta a los linfocitos vírgenes que se encuentran en los órganos linfoides secundarios, para que de esta manera se desarrolle una respuesta inmune eficaz contra el patógeno. Para llevar a cabo esta última función, las células dendríticas (CD), las cuales son células fagocíticas presentadoras de antígeno por excelencia, necesitan ser dirigidas a través de los vasos linfáticos a la zona donde se encuentran los linfocitos T en los nódulos linfoides. Tomando en cuenta lo anterior, el objetivo de diversos grupos de investigación, ha sido evaluar la expresión de quimiocinas y sus receptores en CD durante la infección por *Leishmania*. Al evaluar la actividad migratoria de las CD expuestas a *L. major*, se observó una disminución del 50% en la respuesta quimiotáctica a CCL2 y CCL3 (ligandos de CCR2 y CCR5), lo cual se correlaciona con la regulación negativa de estos receptores al exponer a las CD a este protozooario. La modulación selectiva de receptores de quimiocinas parece estar relacionada con la especie de *Leishmania*, y no así con el fondo genético del hospedero. En contraste, la producción de quimiocinas por CD expuestas al parásito si parece estar determinada por el fondo genético (97). Otros de los ligandos a los que las CD responden son CCL19 y CCL21; los ratones deficientes en CCL19 y CCL21 muestran una activación deficiente de las CD, lo cual trae como consecuencia alteraciones en la migración de linfocitos T permitiendo con esto una marcada susceptibilidad a la infección por *L. donovani* y evidenciando la importancia de un ambiente adecuado de quimiocinas para la generación óptima de una respuesta inmune protectora del hospedero (98). Una de las poblaciones celulares a las que se les ha dado mayor importancia recientemente durante el desarrollo de diversas enfermedades son las células T CD4⁺ reguladoras naturales, las cuales adquieren sus propiedades inmunosupresoras durante el proceso de timopoiesis. La presencia de estas células reguladoras en diversas patologías está relacionada con cronicidad. En el caso de la infección por *Leishmania*, se ha observado que las células T reguladoras naturales se acumulan rápidamente en los sitios de infección, en donde suprimen la respuesta anti-parasitaria de las células efectoras. Esta migración al sitio de infección está regulada por el receptor de quimiocinas CCR5, ya que ratones deficientes en este receptor mostraron un incremento en la población de células T efectoras contra *L.*

major y con esto, una mayor resistencia a la infección por la alta producción de IFN- γ . Los resultados anteriores indican que la expresión de CCR5 en las células T reguladoras naturales es un requerimiento crítico para el establecimiento de cronicidad, controlando la respuesta inmune de las células T efectoras en los sitios de infección y permitiendo el establecimiento del parásito en las células del hospedero (99). Siguiendo con la participación de las quimiocinas en promover el establecimiento de *Leishmania* en las células del hospedero, antecedentes previos *in vitro* han demostrado que las quimiocinas CCL3, 4 y 5 facilitan la invasión de macrófagos por *Leishmania* durante las primeras horas de infección (100). Estas quimiocinas son ligandos para los receptores CCR5 y CCR1. Un hallazgo publicado recientemente es que *Leishmania* presenta moléculas que unen quimiocinas en la superficie celular del estadio promastigote y que las quimiocinas CCL3, 4, y 5 presentan cinéticas de unión similares a *L. major* y *L. donovani*, en contraste con la quimiocina CCL2, la cual no se une estos parásitos. A través de ensayos de competencia se demostró que las tres quimiocinas compiten con diferente afinidad por el mismo sitio de unión en la superficie del promastigote, y que la unión de estas quimiocinas promueve la generación de Ca²⁺ intracelular en el parásito, la cual es casi completamente eliminada al tratar previamente a *Leishmania* con toxina de *Bordetella pertusis*. Lo anterior indica que la traducción de señales llevada a cabo en el parásito es a través de proteínas G, de manera similar a lo que ocurre en las células del hospedero. Finalmente, se puede concluir que la señalización mediada a través de las quimiocinas del hospedero trae como resultado la quimioatracción de parásitos hacia la fuente de secreción de estas quimiocinas, tales como los macrófagos, que son las células en donde *Leishmania* lleva a cabo su ciclo biológico (101).

4. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es el parásito protozoario causante de la tripanosomosis americana o enfermedad de Chagas, la cual está ampliamente distribuida a lo largo del continente Latinoamericano, desde México hasta Argentina (Figura 7) y recientemente al sur de Estados Unidos. Después de cien años de su descubrimiento, sigue siendo una zoonosis grave para la salud de los habitantes en determinadas regiones de estos países, afectando

entre 14 y 18 millones en 18 países endémicos de América Latina (102). La enfermedad de Chagas en el hombre ocurrió de manera accidental, ya que al éste ir colonizando los diversos nichos ecológicos, entró en contacto con insectos infectados con *T. cruzi* provocando entonces la adaptación de los triatóminos infectados a la domiciliación. Este es un factor clave para la transmisión de *T. cruzi* ya que está directamente relacionada con las condiciones socioeconómicas afectando principalmente a personas con viviendas pobres y poca higiene doméstica (103).

Durante la enfermedad de “Chagas” es posible distinguir tres fases con base al proceso inflamatorio derivado de la infección por *T. cruzi*. La primera fase, denominada *fase aguda*, presenta una alta parasitemia, generalmente se observa miocarditis y algunos síntomas no específicos tales como, fiebre, dolor de cabeza, vómito, hepatoesplenomegalia y diarrea, producto de la reacción inflamatoria generada por la entrada del parásito a las células. Esta fase es de corta duración, entre 1 y 2 meses. Con la primera activación o respuesta del sistema inmune ante la presencia del patógeno, la parasitemia es controlada y la miocarditis se resuelve en gran medida; sin embargo, la miocarditis y otras mega enfermedades, resurgen del 30 al 40 % de las personas después de la infección inicial (104) Después de la fase aguda viene una segunda fase denominada de *latencia o indeterminada*, que puede durar entre 10 y 30 años. En esta fase el parásito se encuentra replicándose en el tejido, motivo por el cual se vuelve casi indetectable en la sangre. Del 60 al 90 % de las personas infectadas permanecerán en esta fase por el resto de su vida, y en regiones endémicas en donde las reinfecciones son frecuentes, estas personas sirven de reservorio natural de la infección contribuyendo a mantener el ciclo de vida del parásito (105). La tercera fase de la enfermedad *la fase crónica*, se caracteriza por la destrucción lenta y progresiva de células infectadas por la forma amastigote del parásito. Los síntomas y signos físicos presentes en pacientes en una fase crónica de la enfermedad van de leves hasta insuficiencia cardíaca ó incluso muerte súbita, pasando por una falla cardíaca, arritmia cardíaca, fatiga y tromboembolismo sistémico y/o pulmonar. Pacientes en fase crónica de la enfermedad que murieron después de una falla cardíaca muestran dilatación y aumento en el peso del corazón de 350 a 800 g (102). Con el empleo de técnicas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos monoclonales para la detección de antígeno de *T. cruzi*, se ha demostrado que hay una relación directa entre antígenos del parásito y

los focos inflamatorios observados en el miocardio. A pesar de la baja parasitemia encontrada en tejido cardíaco de personas infectadas, hay una continua reacción inmunológica humoral contra antígenos del parásito que comparten pequeñas secuencias de aminoácidos con proteínas del hospedero, tales como miosina, laminina y proteínas ribosomales, provocando con esto un proceso autoinmune (106) que ha sido implicado en la progresión de la enfermedad (107).

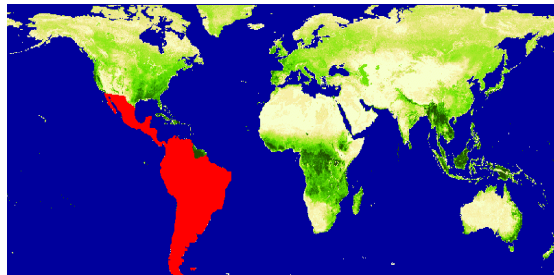


Figura 7. Distribución geográfica de la tripanosomosis americana.

El ciclo de vida de *T. cruzi* es polimórfico, e involucra los siguientes estadios de diferenciación: epimastigote; la forma replicativa dentro del vector hematófago perteneciente a la subfamilia Triatominae comúnmente conocido como “chinche besucona”, amastigote; la forma replicativa dentro del hospedero, tripomastigote metacíclico; la forma infectiva dentro del insecto vector y tripomastigote sanguíneo; la forma infectiva dentro del hospedero. Inicialmente los tripomastigotes metacíclicos contenidos en las heces del triatómino infectado son depositados en el sitio de donde se alimenta del hospedero; una vez ocurrido esto, las heces contaminadas pueden ser arrastradas a la conjuntiva ocular al accidentalmente rascar la piel y posteriormente tallar los ojos, provocando la principal manifestación de la entrada del parásito al hospedero, el signo de Romana (Figura 8B). *Trypanosoma cruzi* puede penetrar a las células del hospedero utilizando otras vías, por ejemplo; a través de pequeñas lesiones en la piel provocadas al momento de rascar el sitio de donde se alimentó el vector infectado, por vía oral a través del consumo de alimentos contaminados con heces infectadas, por transfusión de sangre contaminada, por transplante de órganos de un donante infectado y por infección transplacentaria (102). De esta manera, el parásito puede infectar varios tipos celulares presentes en las diferentes capas de la piel,

así como mucosas. Una vez que los amastigotes intracelulares se replicaron (fisión binaria) dentro de las células, son liberados como tripomastigotes infectivos al torrente sanguíneo en donde pueden ser tomados nuevamente por un insecto hematófago no infectado y comenzar el ciclo biológico nuevamente y por otro lado, se diseminan en el hospedero, tomando como vehículo de transporte el flujo sanguíneo para llegar a otros órganos tales como, el corazón y el tracto gastrointestinal (Figura 8A).

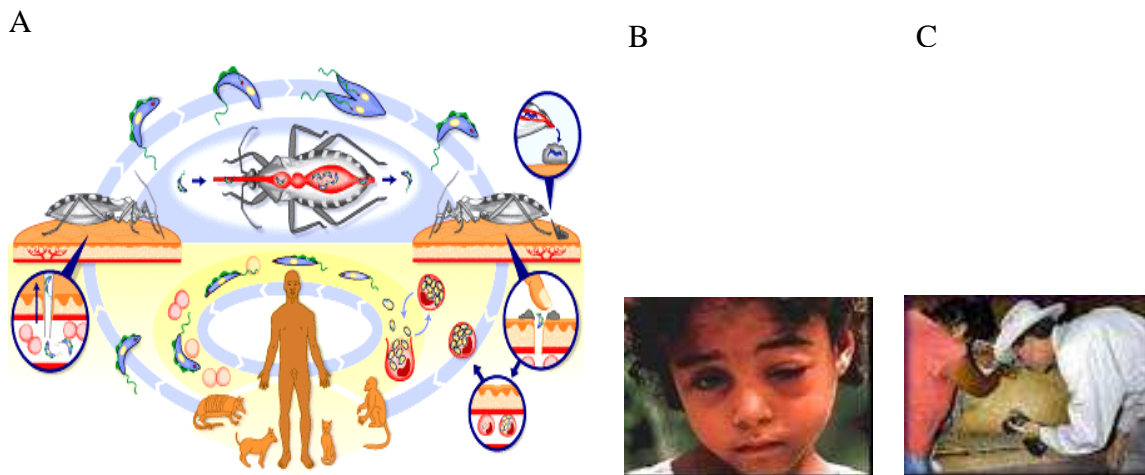


Figura 8. A. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. B. Signo de Romaña, C. Domiciliación

4.1. Respuesta inmune contra *Trypanosoma cruzi*

La infección por *T. cruzi* provoca una fuerte reacción inflamatoria. Diversos estudios, empleando varios modelos murinos de la enfermedad de Chagas, indican que el proceso inflamatorio producido durante esta enfermedad tiene un papel importante en la resistencia contra el parásito. La respuesta inmune contra *Trypanosoma cruzi* involucra la producción y secreción de mediadores quimioatrayentes que promueven el reclutamiento de células inflamatorias al sitio de la infección, tales como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, NK, T y B (108, 109). Al mismo tiempo, las células reclutadas al sitio en donde se encuentra el antígeno promueven la generación de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-1 entre otras, que ayudan a la resistencia del hospedero contra *T. cruzi*. Existe evidencia de que IFN- γ modula la expresión de quimiocinas, que a su vez dirigen los infiltrados inflamatorios encontrados tanto en la fase aguda como en la

fase crónica de la infección (110). Por otro lado, una respuesta tipo Th1 exacerbada está asociada a alteraciones cardíacas en humanos con enfermedad de Chagas crónica. Sin embargo, el mecanismo por el cual las citocinas y quimiocinas expresadas durante la infección con *T. cruzi* controlan la replicación del parásito y la miocarditis sigue siendo controversial.

La participación de citocinas anti-inflamatorias tales como IL-10 ó TGF- β sobre la activación de macrófagos está asociada con susceptibilidad a la infección producida por *T. cruzi*. Debido a estas actividades de pro y anti-inflamación mediadas por las citocinas, se genera un balance en la respuesta inflamatoria propuesto como parte importante para la resistencia a la infección en una fase temprana de la enfermedad (110).

Durante la infección por *T. cruzi*, el óxido nítrico puede modular directa o indirectamente la actividad de los leucocitos a través de la acción microbicida de radicales libres como el peroxinitrito o el superóxido generados después de la producción de ON, ó a través de la regulación de la respuesta inmune inflamatoria permitiendo el establecimiento de parásitos en las células y tejidos del hospedero (111). Este efecto dual del ON puede dar lugar a toxicidad celular en el hospedero, a procesos autoinmunes durante el desarrollo de la enfermedad o a la persistencia del parásito en el tejido (112).

4.2 Quimiocinas y citocinas en la enfermedad de Chagas

Durante la enfermedad de Chagas se desencadena una fuerte reacción inflamatoria en el tejido del hospedero. Algunos de los mediadores inflamatorios que participan en este proceso son las quimiocinas. Está reportado que cardiomiocitos y macrófagos infectados *in vitro* con *T. cruzi*, así como tejido cardíaco infectado, expresan quimiocinas de la familia CC tales como, CCL2, CCL3, CCL4 y CCL5 (113). Estas quimiocinas son capaces de promover la actividad microbicida de los macrófagos a través de la generación de óxido nítrico (ON), y la cantidad de ON inducida por las quimiocinas es comparable a la que se produce al estimular macrófagos con IFN- γ , siendo CCL2 el inductor más potente. Hasta la fecha, no se ha determinado el mecanismo por el cual las quimiocinas inducen la producción de ON en los macrófagos, pero al tratarlos con toxina de *B. pertusis* se

demonstró que el efecto en la liberación está mediado por proteínas G (113). Se sabe también que estas quimiocinas CC aumentan la capacidad fagocítica de los macrófagos de manera dosis-dependiente, siendo CCL5 la quimiocina más eficiente en promover la toma de tripomastigotes por macrófagos humanos (114). Estudios *in vivo* utilizando suero de pacientes infectados que se encuentran en diferentes formas clínicas de cardiomiopatía chagásica, revelan que existe una correlación entre las concentraciones de quimiocinas y citocinas en plasma con la severidad de la enfermedad. Pacientes con enfermedad de Chagas grave muestran altos niveles de TNF- α y CCL2 en plasma, comparados con pacientes con lesiones moderadas y personas no infectadas (115). CCL2 es una quimiocina implicada en diversos procesos durante la respuesta a la infección por *T. cruzi*, como la capacidad de cambiar la forma del tripomastigote a una forma esférica y generar quimiotaxis de tripomastigotes *in vivo* utilizando un modelo de bolsa de aire en ratones infectados (116). Esto sugiere que la quimioatracción de *Trypanosoma* por CCL2 podría ser un mecanismo utilizado por el parásito para invadir determinado tipo celular (tropismo) ya que la expresión de esta quimiocina en los diferentes tejidos varía, así como la especificidad de unión por los diferentes estadios de diferenciación del parásito, sugiriendo que las quimiocinas pueden tener un papel importante en la patogénesis de la infección producida por *T. cruzi*.

Otro aspecto importante es que los receptores de quimiocinas determinan en gran medida la patogénesis de la enfermedad de Chagas. La contribución de CCR2 está limitada a la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, lo cual coincide con una alta expresión de su ligando CCL2 y alta parasitemia en tejido cardíaco durante la fase crónica de la enfermedad (117). El receptor CCR5 está involucrado en el reclutamiento de linfocitos T CD8⁺ que secretan IFN- γ al miocardio; la expresión de este receptor en la membrana celular podría determinar no solamente el número y tipo celular en los órganos infectados, sino también, el grado de la respuesta inflamatoria desencadenada por la infección con *T. cruzi* (118, 119). Por otro lado, está reportado que la ausencia de CCR5 aumenta la parasitemia y específicamente el número de parásitos en el miocardio pero su participación en el reclutamiento de linfocitos está restringida a la fase aguda de la enfermedad. Lo anterior sugiere que CCR5 no es esencial para el mantenimiento de una inflamación crónica en el miocardio durante la infección por *T. cruzi* (120).

Recientemente se demostró que la presencia de tripomastigotes de *T. cruzi* durante la co-infección con VIH reduce la replicación del virus *in vitro* en histocultivos placentarios. No se conoce si hay una competencia entre estos microorganismos por los receptores de quimiocina que permiten la infección, sin embargo, se demostró que la replicación viral disminuye de manera significativa. Uno de los mecanismos propuestos en cuanto a la disminución de la replicación del virus es la actividad proteolítica de proteasas derivadas de *T. cruzi* sobre factores de transcripción o moléculas receptoras que participan en la replicación del VIH (121).

4.3. Modelos murinos de infección por *Trypanosoma cruzi*.

Para conocer la cinética de expresión de quimiocinas y citocinas durante las diferentes fases de la enfermedad de Chagas se han caracterizado diversos modelos murinos utilizando diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. La cepa Colombiana de *T. cruzi* desencadena una reacción inmune muy similar a la observada en humanos; al día 15 posterior a la infección (fase aguda) hay una alta expresión de citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-12p40 e IFN- γ en el miocardio, las cuales corresponden al perfil Th1 (pro-inflamatorias), sin embargo, en este mismo periodo de infección también hay expresión de citocinas tipo Th2 como IL-4 e IL-10. Al día 30 de la infección (pico de la parasitemia) hay citocinas como IL-1 β e IL-12p40; para el día 60 al 120 de la infección (fase indeterminada-crónica) muchas citocinas Th1 disminuyen a su estado basal y las citocinas anti-inflamatorias IL-10 e IL-4 aumentan su expresión (110).

En cuanto a la cinética de expresión de quimiocinas en éste y otros modelos murinos de infección por *T. cruzi*, se ha observado que varía de acuerdo a la fase de desarrollo de la enfermedad en la que se encuentre el hospedero. Por lo general, en la fase aguda entre los 15 y 30 días post-infección hay un aumento en la expresión de quimiocinas que se encontraban en un estado basal, así como la expresión de quimiocinas inducibles debido al proceso inflamatorio desencadenado por la presencia del parásito (Figura 9). Una vez pasada la fase aguda de la enfermedad, la expresión de quimiocinas cambia nuevamente ya

que la presencia del parásito en el tejido varía y esto conlleva a un cambio en la respuesta inmune mediada por las quimiocinas.

Por otro lado, se sabe que hay una sobre-expresión del receptor de quimiocinas CCR5 en tejido cardiaco infectado con *T. cruzi*, sugiriendo que esto contribuye de manera significativa al daño cardiaco generado en la enfermedad de Chagas (122) ya que predominan los linfocitos T CD8⁺ CCR5⁺ sobre los linfocitos T CD4⁺ en la fase crónica de la infección (123).

En ensayos realizados con tejido cardiaco de ratones BALB/c infectados con la cepa colombiana de *T. cruzi*, así como con cardiomiocitos y macrófagos peritoneales infectados *in vitro* con *T. cruzi*, se observó la expresión de diversas citocinas y quimiocinas (124) (Figura 9).

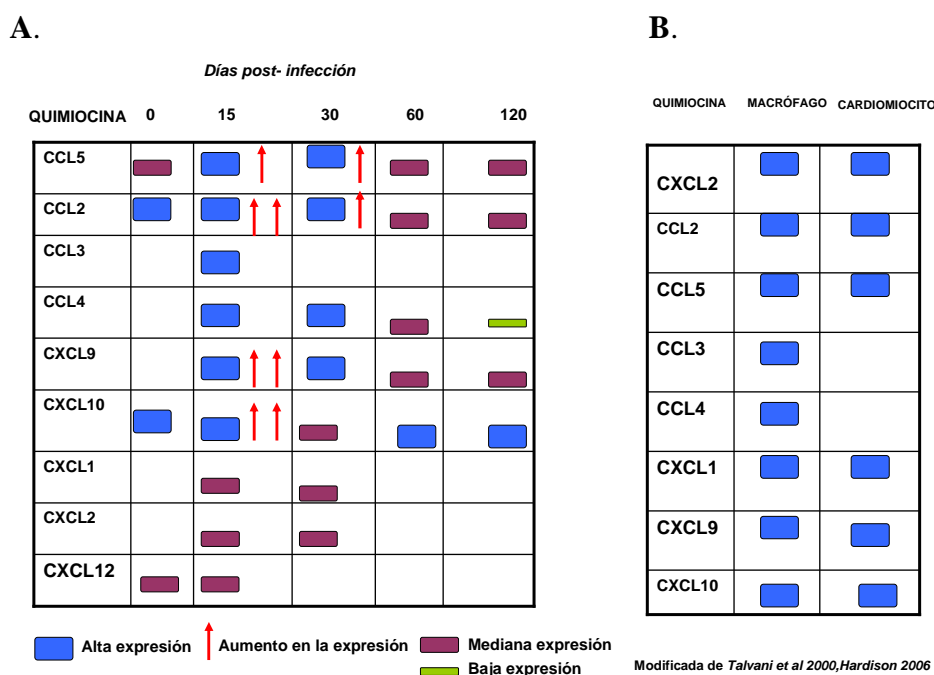


Figura 9. A. Cinética de expresión de quimiocinas (mRNA) en tejido cardiaco infectado con la cepa colombiana de *Trypanosoma cruzi*. **B.** Expresión de quimiocinas en macrófagos y cardiomiocitos infectados *in vitro* con *T. cruzi* (117)

Cabe mencionar que la expresión de citocinas a lo largo de la enfermedad de Chagas está modulada por diversos factores entre los que se encuentran; antígenos derivados del

parásito tales como la cruzipaína (111), óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno derivadas de las células del hospedero (125), así como las mismas citocinas generadas durante la respuesta inmune (126).

5. Cruzipaína: aspectos generales

La cruzipaína es una proteinasa de cisteína que se expresa como un complejo de isoformas en todos los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*, siendo más abundante en los estadios replicativos. Esta proteinasa está involucrada en gran parte de los procesos de patogénesis durante la enfermedad de Chagas tales como: la invasión celular por parte de los tripomastigotes infectivos, la multiplicación del parásito y en mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero (127-129). También conocida como cruzaina ó glicoproteína 57/51 (gp57/51), es una glicoproteína altamente manosilada y un antígeno inmunodominante. Se secreta como una pro-enzima (zimógeno) ya que se expresa como proteína lisosomal o de membrana. Se encuentra entre las proteinasas de cisteína mejor caracterizadas: su estructura tridimensional presenta un dominio catalítico central compuesto por los residuos Cys²⁵, His¹⁵⁹ y Asn¹⁷⁵ muy similar al de la papaína y L – catepsina, rodeado por un domino en donde predominan hélices $-\alpha$ y otro donde predominan láminas $-\beta$ (130, 131) (Figura 10).

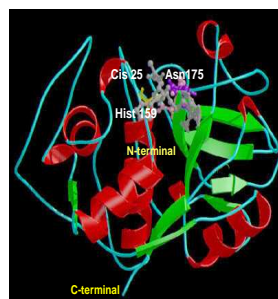


Figura 10. Estructura cristalográfica de cruzipaína.

Cruzipaína es una proteinasa estable en un amplio rango de pH (132) aunque su actividad óptima ocurre a temperatura y pH a las que se encuentra el citoplasma de las células del

hospedero (37°C y pH 7.4). Existen sustratos específicos como Z-Phe-Arg-AMC ó no específicos como azocaseína, que pueden interferir con la invasión celular, multiplicación y con la diferenciación de los estadios infectivos de *T. cruzi* (133). Sin embargo, recientemente se ha caracterizado a un inhibidor natural de proteasas de cisteína en *T. cruzi*, la chagasina (134, 135). Ésta co-localiza con cruzipaína en reservosomas y en el aparato de Golgi de los epimastigotes, aunque su expresión es baja comparada con cruzipaína. Chagasina interacciona preferencialmente con cruzipaína en forma soluble y el complejo cruzipaína-chagasina es muy resistente ya que se mantiene intacto en presencia de SDS y β -mercaptoetanol (134).

La administración de inhibidores de proteasas de cisteína tales como el dipéptido N-methyl-Pip-F-homoF-Vinyl Sulfonyl Phenyl (K11777) en un modelo murino de la enfermedad de Chagas con ratones inmunodeficientes permitió la sobrevivencia ante el desarrollo de una enfermedad aguda letal. Los ratones utilizados en este estudio no mostraron lesiones en el miocardio, ni infiltración de linfocitos pero hubo nidos de amastigotes en el tejido (136).

La especificidad de cruzipaína (aislado Dm28 de *T. cruzi*), fue determinada utilizando librerías de péptidos sintéticos derivados de la secuencia de inhibidores naturales de proteasas de cisteína tales como la familia de las cistatinas. Estos estudios demostraron que la especificidad de la cruzipaína varía de acuerdo a la naturaleza del aminoácido adyacente en cualquiera de las posiciones del sustrato. La enzima mostró marcada preferencia por residuos de aminoácidos básicos en la posición P3 y P1, y en la posición P2 preferencia por residuos hidrofóbicos. Cuando no hay residuos básicos en las posiciones P3 y P2 se ha observado que hay una compensación utilizando residuos básicos en las posiciones P4, P1' ó P3'. Es importante mencionar que las diferencias en las cinéticas de preferencia por sustrato, podrían ser un reflejo del repertorio de isoformas de cruzipaína expresadas por las diferentes cepas y estadios de diferenciación de *T. cruzi*, ya que se sabe que por un lado hay substituciones no conservadas en el dominio catalítico de la enzima, mas que en el prodomino o en el carboxilo terminal y también que la enzima está codificada por mas de 100 copias de genes polimórficos localizados en varios cromosomas; así como que las modificaciones post-traduccionales tales como la desglicocilación, genera variaciones en el peso molecular de la enzima lo cual da lugar a las isoformas de la misma (137-139).

Cuadro 1.

Cuadro 1. Especificidad de cruzipaína por su sustrato

P2	P1	P1'	P2'	REF
	G	R	A	137
	G	A	A	137
	G	F	A	137
L	K	A	A	138
P	K	A	K	138
L	K	S	K	138
A	R	F		139
L	K	F		139
L	S	F		139
L	R	A		139

Simbología: Alta preferencia, ▲ baja preferencia, ▼
 ○ aminoácido mutado a partir de la secuencia del péptido original

Cruzipaína está presente en suero de pacientes infectados con *T. cruzi*, en donde se ha visto que pacientes con enfermedad de Chagas severa muestran títulos altos de anticuerpos anti-cruzipaína, mientras que pacientes en un estado intermedio de la enfermedad muestran títulos bajos de anticuerpos contra esta proteína. Lo anterior refuerza la hipótesis de que cruzipaína está asociada a la gravedad de la enfermedad de Chagas (136).

5.1. Cruzipaína y la respuesta inmune durante la enfermedad de Chagas

Durante el desarrollo de la respuesta inmune en la enfermedad de Chagas no está muy claro si la presencia del parásito es esencial para que se produzca daño en el tejido ó si la respuesta del sistema inmune en contra de antígenos de *T. cruzi* es suficiente para que se produzca el daño observado en el tejido infectado. Cruzipaína es un antígeno altamente inmunogénico que está presente en todos los estadios del ciclo de vida del parásito. Se ha propuesto que la patología observada durante la enfermedad de Chagas es debida a un proceso autoinmune, ya que encontrar parásitos en el tejido es un evento raro, sin embargo

es común observar infiltrados de células mononucleares en el tejido cardíaco principalmente, así como anticuerpos autoreactivos en suero de pacientes infectados (140). Está demostrado que la inmunización de ratones con cruzipaína induce la producción de anticuerpos contra este antígeno, pero además contra una proteína de 210 kDa correspondiente a la miosina del músculo esquelético. Lo anterior sugiere que hay células autoreactivas presentes en el músculo esquelético promoviendo la generación de miositis a lo largo de la enfermedad de Chagas (106).

Por otro lado, el anticuerpo monoclonal 5A9B11 dirigido contra cruzipaína reconoce un epítipo específico presente en músculo cardíaco y esquelético y no así en otros tejidos como el pulmonar, el estómago y riñones, indicando que la expresión específica de este epítipo en los tejidos blanco de algunas cepas de *T. cruzi* contribuye a la patogénesis de la enfermedad (141). En cuanto a la respuesta celular, se ha observado que los linfocitos T de la mayoría de los pacientes con enfermedad de Chagas son capaces de producir IFN- γ pero no IL-4 al ser estimulados con cruzipaína, sugiriendo que se induce una respuesta de tipo Th1 predominante. (142). En los modelos murinos, se ha demostrado que células T CD4⁺ específicas para cruzipaína inducen la producción de ON por macrófagos, inhibiendo así la replicación del parásito (143). Sin embargo, al tratar macrófagos murinos con cruzipaína (inactiva) ocurre una vía de activación alterna en estas células, donde hay una regulación positiva de la enzima arginasa que compite con la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) por su sustrato L- arginina, lo que induce la producción de citocinas Th2 tales como IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β además de la generación de urea y L-ornitina. Con la activación alterna, el parásito se multiplica libremente dentro del macrófago (111).

La información que se tiene acerca de cruzipaína actuando como una proteinasa de cisteína es poca. Cruzipaína es capaz de cortar anticuerpos; corta todas las subclases de inmunoglobulina G humana y el número y sitios de corte en la región de la bisagra depende de la subclase de inmunoglobulina. De esta manera se producen fragmentos que mantienen ó pierden su actividad biológica. Lo anterior sugiere que cruzipaína puede ser parcialmente responsable del mecanismo utilizado por el parásito para evadir la respuesta inmune humoral del hospedero (144). Un aspecto que no ha sido estudiado es la posible actividad proteolítica de la cruzipaína sobre algunas quimiocinas de la familia CC y su efecto sobre la actividad quimiotáctica hacia células del sistema inmune.

6. Proteólisis de quimiocinas por proteasas derivadas del hospedero y diversos parásitos

La invasión de un patógeno al tejido del hospedero involucra la acción combinada de proteasas y factores solubles provenientes de ambas partes, dando lugar a la degradación de la matriz extracelular y como consecuencia a la ruptura de la barrera epitelial, permitiendo a los parásitos diseminarse hacia diversos tejidos del hospedero. Ante la entrada del patógeno se desencadena una respuesta inicial del sistema inmune que involucra la participación de moléculas tales como citocinas, integrinas, quimiocinas y proteasas tanto del hospedero como del patógeno. La magnitud de la respuesta inmune está dada por varios factores, tales como; el tamaño del inóculo del microorganismo, su virulencia, reinfecciones y el fondo genético de hospedero.

Dentro del ciclo de vida de los parásitos, las proteasas tienen funciones específicas críticas para la patogenicidad y sobrevivencia de los mismos. Entre los grupos de proteasas más estudiados están las proteasas de cisteína; éstas participan de manera importante en diversos eventos como; la evasión del sistema inmune del hospedero, virulencia, invasión celular y de tejidos, así como la alteración de la presentación de antígenos. Debido a su participación en los diversos procesos biológicos estas proteasas han sido blanco importante para el desarrollo de compuestos que inhiban su actividad catalítica.

Las proteasas derivadas de patógenos participan en la evasión del sistema inmune degradando moléculas efectoras (Cuadro 2), modulando de alguna manera la respuesta inmune celular.

Cuadro 2. Proteólisis de moléculas del sistema inmune por proteasas derivadas de diversos parásitos.

PARÁSITO	PROTEASA	CÉLULA Ó MOLÉCULA BLANCO	EFFECTO BIOLÓGICO	REFERENCIA
<i>Leishmania major and donovani</i>	Gp 63 (Endopeptidasa dependiente de Zinc)	CD4	ND	145
<i>Leishmania</i>			La delección de genes de la CP-B	

<i>mexicana</i>	CP-B	Linfocitos T	de <i>L. mexicana</i> , promueve la producción de IFN- γ	146
<i>Leishmania amazonensis</i>	CP	MHC II	Presentación de antígeno afectada	147
<i>Leishmania mexicana</i>	CP	CD25	Reducción en la proliferación de linfocitos	148
<i>Leishmania mexicana</i>	CP	Factor de transcripción NF κ B	Inhibición de la producción de IL-12	149
<i>Entamoeba histolytica</i>	CP	IgA humana	Degradación completa de IgA. Inmunidad de mucosas afectada	150
<i>Entamoeba histolytica</i>	CP	IgG humana	Degradación de IgG. Evasión de la respuesta inmune humoral	151
<i>Entamoeba histolytica</i>	CP	Moléculas del complemento C3,C5 y C3a, C5a	Degradación y pérdida de las actividades biológicas; degradación de plaquetas (C3a) y quimiotaxis (C5a)	152
<i>Entamoeba histolytica</i>	CP5 (EhCP5)	IL-18	Degradación y pérdida de la actividad	153
<i>Entamoeba histolytica</i>	CP2 (EhCP2)	Quimiocinas CCL2, CCL13 y CXCL8	Degradación de CCL2 y CCL13 pierden actividad quimioatrayente. Activación de la forma inmadura de CXCL8 y pérdida de la actividad quimotáctica de la forma madura.	154
<i>Trypanosoma cruzi</i>	ND	CD3, CD4 y CD8	Inhibición de la activación de linfocitos	155
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Producto de secreción (ND)	IL-2R	Supresión de la expresión de IL-2R e inhibición de la proliferación de linfocitos	156
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cruzipaína	Macrófagos	Replicación no controlada del parásito. Producción de IL-10 y TGF- α	111
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cruzipaína	IgG	Degradación específica de todas las subclases de IgG	144

ND: No determinado

CP: Proteasa de cisteína

Por otro lado, las proteasas derivadas del hospedero también facilitan la entrada de patógenos a los tejidos ó controlan el tráfico celular en el sitio de infección; tal es el caso de las metaloproteinasas y proteasas de serina, provenientes principalmente de células epiteliales, macrófagos residentes y neutrófilos. Estas proteasas promueven la invasión de

tejidos y células degradando componentes de la matriz extracelular ó participando en la inhibición o reclutamiento del infiltrado celular al actuar sobre moléculas del sistema inmune tales como las quimiocinas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Proteólisis de quimiocinas por proteasas derivadas del hospedero.

PROTEASA	QUIMIOCINA BLANCO	SITIO DE CORTE (aminoácidos específicos)	CONSECUANCIA EN ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
MMP-9 (gelatinasa B)	CXCL8	ND	Activación de la actividad quimiotáctica	157
Catapsina G y Elastasa (neutrófilos)	CCL6, 9, 15 y 23	S A , S V A V , A A	Generación de péptidos agonistas (CCR1)	158
	CXCL12	ND	Generación de péptidos antagonistas	159
Catapsina G y Elastasa (neutrófilos)	CCL5	E L	Inhibición de actividad quimiotáctica	158
	CCL3	S L		
MMP-1	CCL2	A I	Inhibición de actividad quimiotáctica	160
	CCL13	A L , V P		
MMP-2 (gelatinasa A)	CCL7	S V	Inhibición de actividad quimiotáctica	161
	CXCL12			
MMP-3	CCL 2	S V N A , A L	Inhibición de actividad quimiotáctica	160
	CCL8			
	CCL13			
Catapsina D (cáncer de mama)	CCL3	E Y , W V L W	ND	162
	CCL4			
	CCL21			
MMP-13	CCL7	ND	Inhibición de actividad	160

			quimiotáctica	
MMP-12	CXCL 1,2, 3,5,6,7 y 8	Motivo ELR	Inhibición de la migración de polimorfonucleares y macrófagos	163
MMP-12	CCL 2, 7, 8 y 13	Corte en la posición 4 y 5 N-terminal de la proteína	Inhibición de la migración de monolitos	163

7. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Las proteasas derivadas de patógenos participan en la evasión del sistema inmune degradando moléculas efectoras del tipo de anticuerpos, citocinas o quimiocinas, modulando la respuesta inmune humoral y celular. A este respecto, la cruzipaína de *T. cruzi* tiene actividad proteolítica sobre todas las subclases de inmunoglobulina G humana, produciéndose fragmentos que mantienen ó pierden su actividad biológica. Sin embargo, no se ha investigado el papel de la cruzipaína como un posible modulador de la respuesta inmune inflamatoria, actuando sobre moléculas quimioatrayentes como las quimiocinas. Por lo anterior en este trabajo de tesis consideramos importante analizar el papel catalítico de la cruzipaína actuando sobre quimiocinas de la familia CC y su efecto sobre la actividad quimiotáctica hacia células del sistema inmune.

8. HIPÓTESIS

La cruzipaína de *Trypanosoma cruzi* puede modular la actividad biológica de las quimiocinas CCL2 y CCL12/CCL13 durante el proceso inflamatorio generado en la enfermedad de Chagas, regulando de esta manera el infiltrado celular que se promueve.

9. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la cruzipaína de *T. cruzi* sobre la actividad biológica de las quimiocinas de la familia CC (CCL2 y CCL12/CCL13) y sus receptores a través de la migración de células monocíticas THP-1.

9.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evidenciar la presencia de quimiocinas CCL2, CCL12 y de cruzipaína a diferentes tiempos de infección en tejido muscular esquelético y cardiaco de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*, cepa Querétaro.
2. Analizar la actividad proteolítica de la cruzipaína sobre las quimiocinas CCL12, CCL13 y CCL2 *in vitro*.
3. Determinar la secuencia de aminoácidos de los productos de proteólisis de quimiocinas por HPLC y espectrometría de masas.
4. Analizar la actividad proteolítica *in vitro* de la cruzipaína sobre los receptores de quimiocinas CCR1 y CCR2 expresados sobre la superficie celular de células monocíticas THP-1.
5. Analizar la actividad biológica de los productos derivados de la proteólisis de quimiocinas a través de ensayos de quimiotaxis *in vitro*.
6. Evaluar la actividad biológica del péptido denominado CDCP-1 sobre el reclutamiento celular en un modelo de peritonitis murina.
7. Determinar si el péptido antagonista CDIP-2 disminuye el reclutamiento celular en un modelo de Chagas murino establecido.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro en cultivo axénico.

Los tripomastigotes de la cepa Querétaro fueron co-cultivados con células Vero (células epiteliales de mono verde) en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium. Gibco BRL-Life Technologies, Rockville, California, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco BRL-Life Technologies, Rockville, California, USA). Las células infectadas se incubaron a 37°C con 5% CO₂ hasta obtener el número de parásitos deseado. Cuando las células se encontraban semiconfluentes se subcultivaron manteniendo una densidad aproximada de 5x10⁶ parásitos/mL. El sobrenadante se centrifugó y se lavó dos veces con medio de cultivo y dos veces con PBS 1 % para obtener a los parásitos.

Modelo murino de infección con *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro.

Para el modelo de infección se utilizaron ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas de edad. Se inyectaron 21 ratones vía intraperitoneal con 1x10³ tripomastigotes derivados del cultivo axénico. Grupos de 4 ratones infectados, más un grupo de 3 ratones no infectados utilizados como control, se sacrificaron a los días 0,15, 30 y 60 post-infección (p.i). Los niveles de parasitemia se monitorearon cada tres días tomando una muestra de sangre de la punta de la cola del ratón, con un capilar con heparina. El conteo de parásitos se realizó al microscopio. La sobrevivencia de los ratones se monitoreó diariamente.

Análisis inmunohistoquímico de tejidos infectados.

El tejido muscular (cuadriceps) y cardiaco de ratones infectados y no infectados se obtuvo a los días 0,15, 30 y 60 p.i.; éstos fueron inmediatamente fijados en paraformaldehído al 4% y posteriormente embebidos en parafina para su procesamiento. Se obtuvieron secciones de tejido para la identificación de cruzipáina y de las quimiocinas CCL2 y CCL12 por inmunohistoquímica. Para la detección de cruzipáina en los tejidos se utilizó un anticuerpo

primario policlonal hecho en conejo. Para la detección de la quimiocina CCL12 se utilizó un anticuerpo primario policlonal hecho en conejo y para CCL2 un anticuerpo primario policlonal hecho en cabra (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA). Para la detección de los anticuerpos primarios se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: anti-Igs de conejo hecho en cabra acoplado a HRP (Zymed, San Francisco, California, USA) y anti-Igs de cabra hecho en conejo acoplado a HRP (Zymed, San Francisco, California, USA), respectivamente. Como sustrato para desarrollar la reacción enzimática se utilizó diaminobenzidina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

Caracterización del infiltrado celular en tejido infectado con *Trypanosoma cruzi*.

Se extrajo tejido de músculo esquelético y cardiaco de ratones infectados y no infectados, se incluyó en medio de congelación (tissue tek) y se congeló inmediatamente con nitrógeno líquido. Se guardó a -70°C hasta su utilización.

Para la caracterización celular se realizaron cortes de $6\mu\text{m}$ por crióstato del tejido congelado, se fijaron con acetona durante 10 minutos a 4°C y se re-hidrataron con metanol y agua. Para la reacción antígeno/anticuerpo los cortes de tejido se incubaron con anticuerpos monoclonales en una dilución 1: 40 durante 60 min a 37°C . Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anti-CD8, anti-CD4 y anti-MHCII de ratón hechos en rata acoplados a biotina. Después de lavar los tejidos con PBS 3 veces, éstos fueron incubados con estreptavidina HRP 30 min a 37°C . Para llevar a cabo la reacción enzimática se utilizó diaminobenzidina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Los cortes de tejido fueron contrateñidos con hematoxilina/eosina y observados en un microscopio óptico (Olympus CX21, The Microscope Co., Escocia, Reino Unido) a aumentos de 40 y 100X.

Detección de la actividad enzimática de cruzipáina purificada por columna de afinidad a ConA-Sefarosa.

La cruzipáina fue amablemente donada para este proyecto por la Dra. Cinthia Stempin y el Dr. Fabio Cerbán de la Universidad de Córdoba Argentina. La enzima fue purificada por cromatografía de afinidad a concavalina A-sefarosa (ConA-She) de acuerdo a lo

previamente descrito (164). Para demostrar la actividad enzimática de la cruzipaina purificada, ésta se pre-activó con β -mercaptoetanol (β -MeOH) y se corrió electroforéticamente en un gel de acrilamida al 10% co-polimerizado con gelatina al 0.01% utilizada como sustrato de proteasas de cisteína. Posteriormente, el gel se lavó con una solución amortiguadora de Tris-HCl pH 7.9, cisteína 25 mM para detener la proteólisis. Finalmente se hizo una tinción con azul de coomassie en donde la proteólisis de la gelatina por la cruzipaina se evidenció por la presencia de una banda incolora que correspondió al peso molecular de la enzima (57-60 kDa). Además, la actividad proteolítica específica de la cruzipaina se demostró con el péptido sintético Bz-Pro-Phe-Arg-pNA (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), de acuerdo a lo previamente descrito (164). Brevemente, la enzima (0.1 μ M) y el péptido sintético (10 μ M) se incubaron durante 15 a 45 min a 37°C protegiendo de la luz. Al transcurrir el periodo de incubación, se generó una reacción colorimétrica al ser liberado el cromógeno acoplado al péptido sintético, sustrato de la cruzipaina, la cual se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Como control positivo se utilizó a la proteasa de cisteína, papaína, y como inhibidor de la actividad de proteasas de cisteína se utilizó E-64 (*L-trans*-epoxysuccinyl-leucyl-amido-(4-guanidino) butane) a una concentración de 10 nM durante 15 minutos a 37°C (Sigma, Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

Proteólisis *in vitro* de quimiocinas CC por cruzipaina.

Cruzipaina (0.1 μ M) fue pre-activada con amortiguador de activación (AB) (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, 0.1M β -MeOH) por 15 minutos a 37°C. Posteriormente las quimiocinas CCL2, CCL12 y CCL13 (6.25 μ M) fueron incubadas con la cruzipaina pre-activada por 120 minutos a 37°C. Al término de la incubación, la actividad enzimática fue detenida incubando la muestra con amortiguador de muestra Laemmli. La mezcla quimiocina-cruzipaina, incubada y sin incubar, se corrió electroforéticamente en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 16% en una cámara Mini-protean Bio-Rad a 80 V durante 120 minutos. Al finalizar la electroforesis se realizó una tinción con plata (Pierce, Rockford, Illinois, USA) y se utilizaron marcadores de peso molecular preteñidos de amplio rango (4-200 kDa) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

Análisis por HPLC y espectrometría de masas de péptidos generados por cruzipaína.

Los péptidos obtenidos de la digestión enzimática fueron aislados a través de HPLC analítico en un sistema con gradiente de 0-60% de acetonitrilo durante 60 min, a través de una columna C18 Vydac analítica con flujo de 1.0 mL/min y la detección fue monitoreada a una longitud de onda de 230 nm. Las fracciones obtenidas fueron inmediatamente secadas en un speed-vac (Savant Instruments, New York, USA) y mantenidas a -20°C hasta la realización de los análisis por espectrometría de masas. Las muestras fueron disueltas en amortiguador 1.0% de ácido acético y acetonitrilo (50:50) e inyectadas directamente en un espectrómetro de masas LCQ-IT (Thermo Electron Co-Finnigan, San José-CA, USA). El análisis de los péptidos fue realizado en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología, Cuernavaca Morelos- UNAM.

Quimiotaxis de células THP-1 a través de quimiocinas pre-incubadas con cruzipaína.

La quimiotaxis de células mononucleares humanas (THP-1) se llevó a cabo en una cámara de Boyden modificada (Figura 11) (NeuroProbe, Inc., Cabin John, Maryland, USA). En la parte superior de la cámara se colocaron las células a una densidad de 1×10^6 células /mL y en la parte inferior de la cámara se pusieron las quimiocinas sin tratar ($6.25 \mu\text{M}$) ó tratadas con cruzipaína ($0.1 \mu\text{M}$) en amortiguador salino balanceado Hank's (Gibco BRL-Life Technologies, Rockville, California, USA). Previo a la realización de los experimentos de quimiotaxis, las células se incubaron con $0.5 \mu\text{M}$ de calceína-AM (Molecular Probes, Oregon, USA) durante 20 minutos a 37°C con 5% CO_2 , se lavaron 3 veces con PBS al 1% para eliminar el exceso de calceína y posteriormente fueron cargadas en la parte superior de la cámara de quimiotaxis e incubadas a 37°C durante 90 minutos para permitir la migración celular. El número de células que migraron a través de la cámara pasando por una membrana de policarbonato con un poro de $5 \mu\text{m}$ fueron contadas usando el analizador de imágenes FX (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Cada experimento se realizó al menos tres veces y por triplicado en cada tratamiento.

QUIMIOTAXIS (cámara de Boyden)

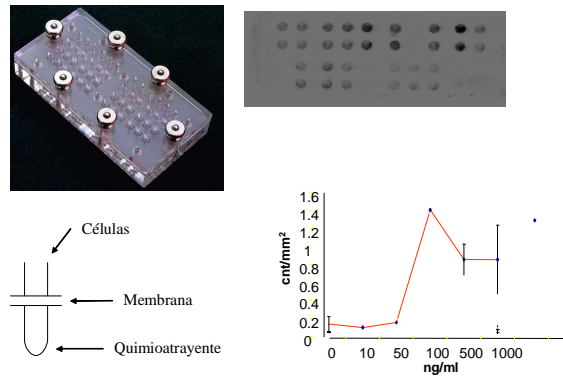


Figura 11. Esquema de la realización de ensayos de quimiotaxis en cámara de Boyden modificada.

Análisis por citometría de flujo de la expresión de los receptores de quimiocina CCR1 y CCR2 de células THP-1 tratadas con cruzipáina.

Las células monocíticas THP-1 (2.5×10^4) fueron incubadas con $0.5 \mu\text{M}$ de la enzima pre-activada o inhibida con E-64 (10nM) por 15 min a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5%. Después del tratamiento las células fueron lavadas dos veces con PBS-SFB al 2% e incubadas durante 20 min a 4°C con el anticuerpo monoclonal biotinilado para el receptor humano CCR1 o CCR2 (R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA). Las células se lavaron e incubaron con estreptavidina-PE por 15 min a 4°C y se realizaron dos lavados con amortiguador de PBS-SFB al 2%. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% para su análisis. La expresión de los receptores de quimiocina fue evaluada utilizando el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Para el análisis correcto de la expresión de los receptores es necesario tener los parámetros M1 y M2 para cada tratamiento. En este caso solo se tomó en cuenta M1.

Ensayo de inhibición de quimiotaxis por el péptido CDCP-1 (LKSYVITTSRCPQK) derivado de la proteólisis de la quimiocina CCL13.

Para la realización de este experimento se utilizaron células mononucleares THP-1, las cuales fueron marcadas con calceína-AM, posteriormente lavadas con solución salina de Hank's e incubadas con diferentes concentraciones de CDCP-1 (2.5, 5, 10 y 20 µg/mL) durante 15 minutos a 4°C. Para llevar a cabo la quimiotaxis se utilizaron 500 ng/mL de quimiocina CCL13 en la parte inferior de la cámara de Boyden modificada y en la parte superior se colocaron las células previamente marcadas con calceína e incubadas con CDCP-1. El número de células en la membrana de policarbonato fue cuantificado en el analizador de imágenes FX (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

Inhibición del reclutamiento celular por CDCP-1 en un modelo murino de peritonitis inducida por tioglicolato de sodio.

Con la finalidad de analizar el efecto anti-inflamatorio del péptido CDCP-1 obtenido de la proteólisis de CCL13 por la cruzipaina, se empleó un modelo murino de peritonitis. Para esto, a grupos de al menos 4 ratones se les administraron por vía intraperitoneal los siguientes tratamientos: tioglicolato, tioglicolato más CDCP-1, tioglicolato más PBS y péptido CDCP-1 solo. El tioglicolato de sodio es un agente irritante con la capacidad de reclutar diversos tipos celulares al sitio en donde se inyecta. En las primeras horas después de aplicar el tioglicolato se reclutan células tales como polimorfonucleares, y al paso del tiempo después de 72 horas, la migración al sitio de inyección es predominantemente de macrófagos; por esta razón en nuestro modelo el tratamiento se realizó con 1 mL de tioglicolato al 3% inyectado por vía intraperitoneal y después de 72 horas se inyectó por la misma vía 500µl del péptido CDCP-1 a una concentración de 50µg/kg, dejándolo actuar por un tiempo de 24 horas. Transcurrido este tiempo, los ratones fueron sacrificados en cámara de CO₂ y posteriormente, se obtuvieron las células del peritoneo por medio de dos lavados peritoneales con 5 mL de PBS estéril por ratón. Las células obtenidas de los lavados fueron centrifugadas e incubadas con amortiguador de lisis que contenía NH₄Cl 0.156 M, KHCO₃ 0.01 M y EDTA 5 mM para eliminar los eritrocitos. Por último, el botón celular se lavó con PBS y las células fueron contadas al microscopio óptico. Posteriormente, se tomaron 500x10⁵ células para determinar el tipo celular presente, incubando durante 30 min a 37°C con los siguientes anticuerpos anti-ratón a una dilución

1:100: anti-CD3-FITC, anti-CD4-PI, anti-CD8-Cy5, anti-CD11b-APC y anti-Gr1-PE (BD Bioscience, San José, California, USA). Después de la incubación con los anticuerpos las células se lavaron tres veces con PBS-BSA al 2% y posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% para su análisis. Los controles establecidos para realizar el análisis poblacional fueron las células positivas para CD3/CD4 ó para CD3/CD8, y con base en esto, determinar las poblaciones de linfocitos T, macrófagos y células polimorfonucleares en los lavados peritoneales. El porcentaje de las poblaciones celulares fueron analizadas en el citómetro FACS Calibur (BD Bioscience, San José, California, USA) con el programa Flow Jo (Ashland, Oregon, USA).

Evaluación de la inhibición del proceso inflamatorio durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas por CDIP-2.

Cuatro grupos de 6 ratones fueron utilizados para el análisis *in vivo* de CDIP-2 organizados de la siguiente manera: 2 ratones infectados intraperitonealmente con 1×10^3 tripomastigotes de *T. cruzi* aislado CAI72, 3 ratones infectados é inoculados con péptido intraperitonealmente (50µg/kg) a los 5 días p.i, después a los 15 días p.i y por último a los 28 días p.i. (los últimos ratones (28 p.i.) recibieron en total 3 dosis de 50µg/kg de péptido antes de ser sacrificados), dos ratones no infectados. Un grupo aparte de dos ratones fue inyectado intraperitonealmente solo con péptido para ver si éste no inducía un efecto sistémico en el ratón por si solo. Los ratones fueron sacrificados a los siguientes tiempos de infección: 5, 15, 22 y 28 días post infección. Los ratones controles inoculados solo con CDIP-2 fueron sacrificados a los mismos tiempos. De todos los grupos de ratones se extrajo tejido esquelético del cuadriceps y tejido cardiaco, se fijó con paraformaldehído al 4% y se incluyeron en parafina para realizar cortes de tejido y tinción con hematoxilina/eosina para la cuantificación del infiltrado celular.

Análisis estadístico.

Se utilizó una ANOVA para el análisis estadístico de las diferencias en el número de células reclutadas en el tejido infectado a los diferentes tiempos de infección.

Para el análisis estadístico de los experimentos de quimiotaxis, se utilizó la prueba de t – student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando fue $P < 0.05$.

11. RESULTADOS

Detección de quimiocinas CCL2, CCL12 y cruzipaína en músculo esquelético infectado con *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro.

La infección por *T. cruzi* en ratones susceptibles BALB/c induce una fuerte respuesta inflamatoria tanto en músculo esquelético como en tejido cardíaco. Dicha respuesta inflamatoria es controlada por quimiocinas expresadas en el tejido. En este trabajo de tesis se analizó de manera particular la presencia de CCL2 y CCL12 en tejido muscular esquelético y cardíaco de ratones durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* (15 y 30 días p.i.). Se observó la presencia de las quimiocinas CCL12 (Figura 12 B) y CCL2 (Figura 12 C), así como de la cruzipaína (Figura 12 D) en estos tejidos durante los diferentes tiempos de infección. De manera paralela se determinó por análisis morfométrico el número de células en el infiltrado celular, tomando cuatro secciones del tejido infectado de cada ratón (aumento 40x). El número final se determinó obteniendo la media de las cuatro secciones de tejido en los diferentes tiempos de infección. La expresión de las quimiocinas CCL2 y CCL12 correlacionó con un alto infiltrado de células mononucleares en el tejido, siendo el pico del infiltrado celular a los 30 días p.i. (Figura 12 E). Al día 60 p.i. se observó una disminución en la presencia de CCL12 y cruzipaína (Figura 12 B y D), correlacionándose con una disminución del infiltrado celular (Figura 12 E). En el caso de CCL2, ésta mantuvo niveles de expresión altos a lo largo de la infección comparando con CCL12 (Figura 12 C).

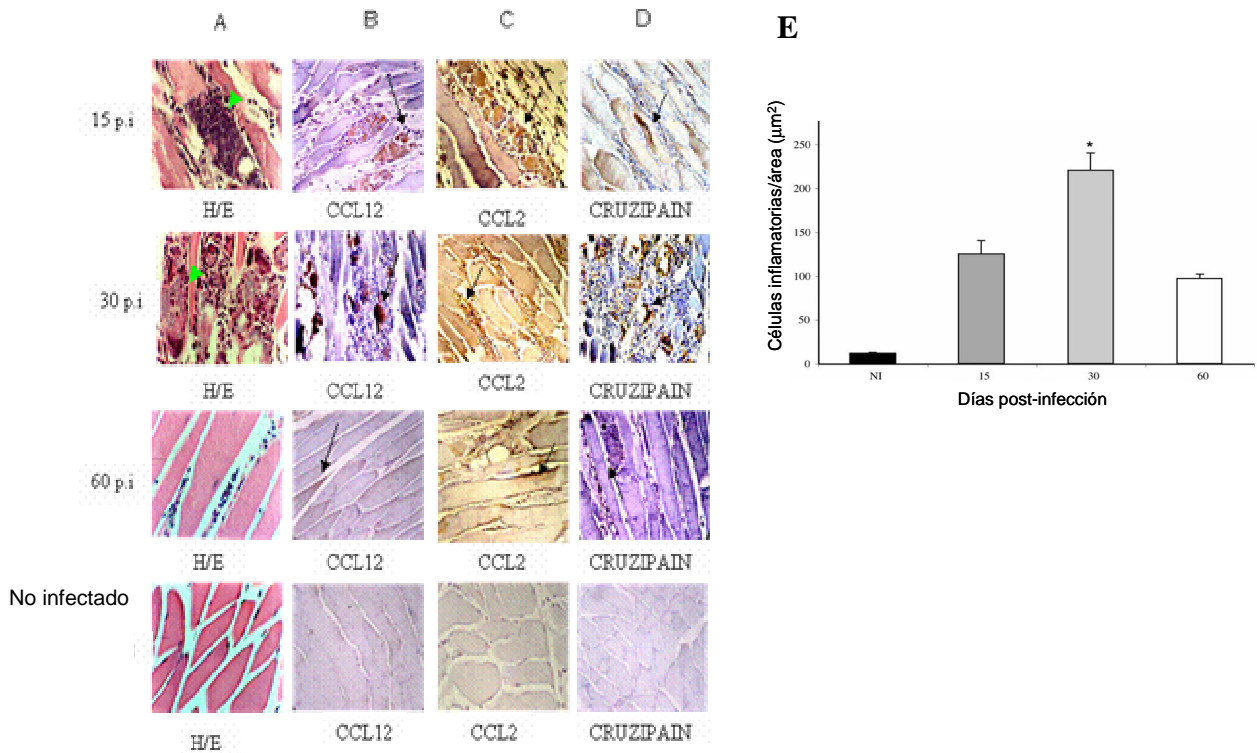


Figura 12. Análisis inmunohistoquímico de tejido esquelético no infectado o infectado con la cepa Querétaro de *T. cruzi* a diferentes tiempos post-infección. **A.** Tinción Hematoxilina/Eosina (H/E); las cabezas de flecha en verde, indican la presencia de nidos de amastigotes en el tejido infectado (15 días p.i.) ó nidos de amastigotes en destrucción (30 días p.i). **B.** Presencia de CCL12, **C.** Presencia de CCL2, **D.** Presencia de cruzipaína. **E.** Análisis morfométrico del infiltrado celular en el tejido a los diferentes tiempos de infección. Se presentan los resultados de imágenes de un ratón representativo de cada tratamiento de una n = 4. *p< 0.05

Detección de quimiocinas CCL2, CCL12 y cruzipaína en tejido cardíaco de ratones infectados con la cepa Querétaro de *Trypanosoma cruzi*.

Para evidenciar la presencia de las quimiocinas CCL12 y CCL2 así como de cruzipaína en el tejido cardíaco de ratones BALB/c infectados con *T.cruzi*, diferentes grupos de ratones fueron sacrificados a los 0,15, 30 y 60 días p.i. El tejido cardíaco obtenido a los 15 y 30

días p.i., mostró una marcada presencia de CCL12 (Figura 13 B), CCL2 (Figura 13 C) y cruzipaína (Figura 13 D). El incremento en el infiltrado celular a estos tiempos de infección correlacionó con la presencia de estas quimiocinas en el tejido (Figura 13 E). A los 60 días posteriores a la infección la expresión de CCL12 y cruzipaína disminuyó (Figura 12 B y D) pero no así la quimiocina CCL2 (Figura 13 C). Con respecto al infiltrado celular este disminuyó de manera significativa después de los 30 p.i (Figura 13 E).

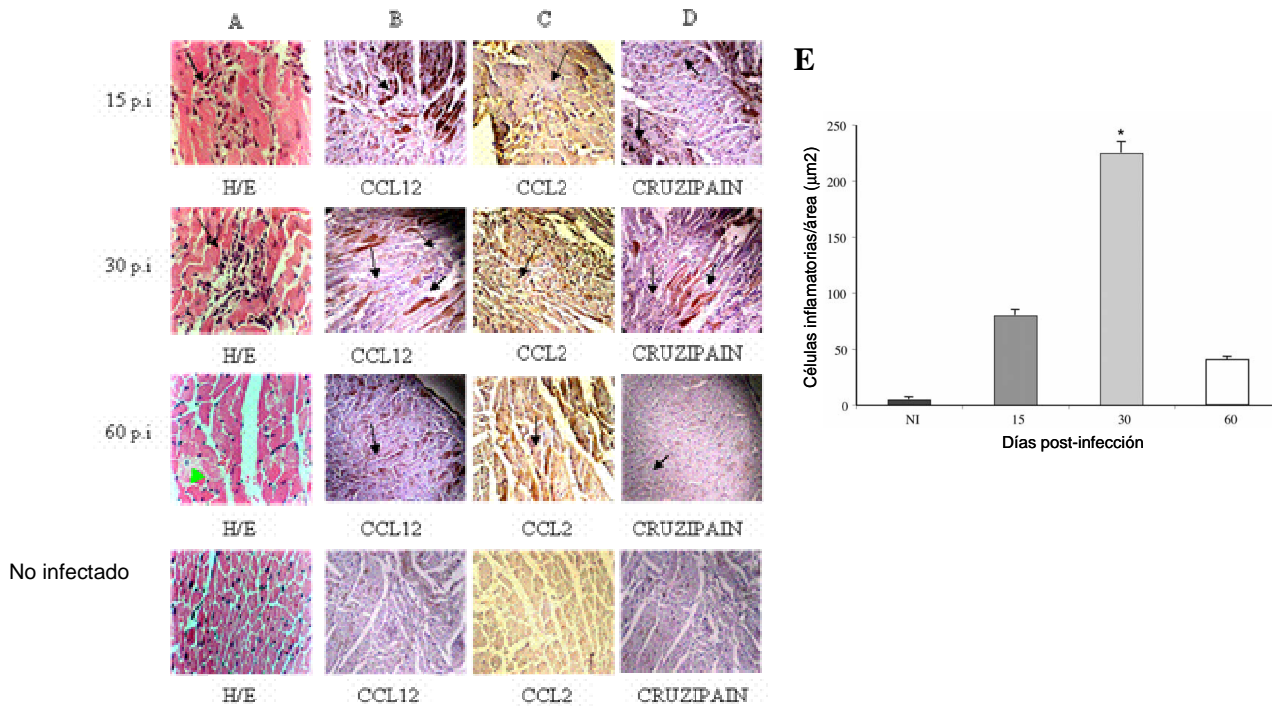


Figura 13. Presencia de CCL12, CCL2 y cruzipaína en tejido cardiaco obtenido de ratones no infectados o infectados con *T. cruzi* a diferentes tiempos post-infección. **A.** Tinción de Hematoxilina/Eosina (H/E), las cabezas de flecha indican necrosis en el tejido infectado (60 días p.i). **B.** Presencia de CCL12, **C.** Presencia de CCL2, **D.** Presencia de cruzipaína. **E.** Análisis morfométrico del infiltrado celular en el miocardio a los diferentes tiempos de infección. Se presentan los resultados de un ratón representativo de cada tratamiento de una n = 4. *p<0.05

Caracterización del infiltrado celular durante la fase aguda de la infección producida por *Trypanosoma cruzi*, cepa Querétaro

Para determinar el tipo celular del infiltrado presente en músculo esquelético y cardíaco de ratones BALB/c en la fase aguda de la infección, se procedió a caracterizar por inmunohistoquímica diferentes poblaciones celulares tales como linfocitos T y macrófagos. Al día 30 p.i. se observó que el tipo celular predominante en ambos tejidos cardíaco y del músculo esquelético son monocitos positivos para el Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase II (MHCII por sus siglas en inglés) (Figura 14 C) y en menor número células linfocíticas CD8 seguidas de linfocitos CD4 en ambos tejidos (Figura 14 A y B). Los resultados obtenidos correlacionan con lo reportado en la literatura utilizando distintas cepas de *T. cruzi* (123).

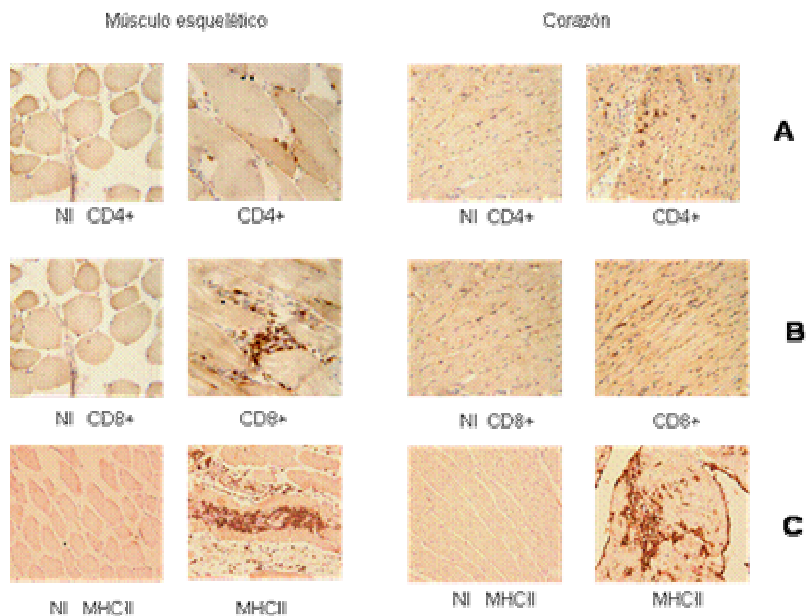


Figura 14. Identificación de diversos tipos celulares presentes en el infiltrado celular observado durante la fase aguda de la infección producida por *Trypanosoma cruzi* en músculo esquelético y corazón de ratones BALB/c. **A.** Células positivas para CD4, **B.** Células positivas para CD8, **C.** Células positivas para MHCII. **NI:** no infectado

Una vez analizada la presencia de las quimiocinas CC y de la cruzipaína en el tejido de ratones infectados con *T. cruzi*, se procedió a evaluar la actividad proteolítica de la cruzipaína sobre CCL2 y CCL12/CCL13.

Nuestro principal objetivo fue determinar si la disminución en el infiltrado inflamatorio observada a tiempos tardíos de la infección (Figuras 12 y 13), así como la presencia de nidos de amastigotes en las fibras musculares sin infiltrado celular alrededor (Anexo 1.) se debía en parte a la acción proteolítica de la cruzipaína afectando la actividad biológica de algunas quimiocinas CC, influenciando de esta manera el curso de la reacción inflamatoria durante la enfermedad de Chagas.

Purificación y determinación de la actividad enzimática de cruzipaína.

La cruzipaína de *T. cruzi* fue amablemente donada por la Dra. Cinthia Stempin y el Dr. Fabio Cerbán de la Universidad de Córdoba Argentina. La enzima fue purificada por columna de afinidad a ConA- She, como se indica en materiales y métodos (Figura 15 A). Inicialmente se evaluó la actividad catalítica de la enzima por zimografía en electroforesis, utilizando como sustrato gelatina (Figura 15 B).

Para determinar la actividad específica de cruzipaína, se evaluó su capacidad proteolítica utilizando el péptido sintético Bz-Pro-Phe-Arg-pNA. La actividad catalítica de la cruzipaína fue comparable con la del control positivo, papaína. Al utilizar el inhibidor para proteasas de cisteína (E-64) la actividad de cruzipaína fue inhibida de manera significativa en un 60% (Figura 15 C).

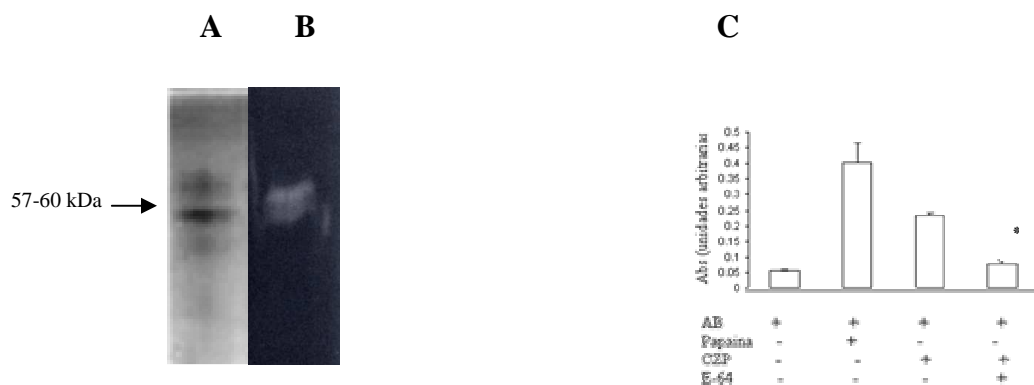
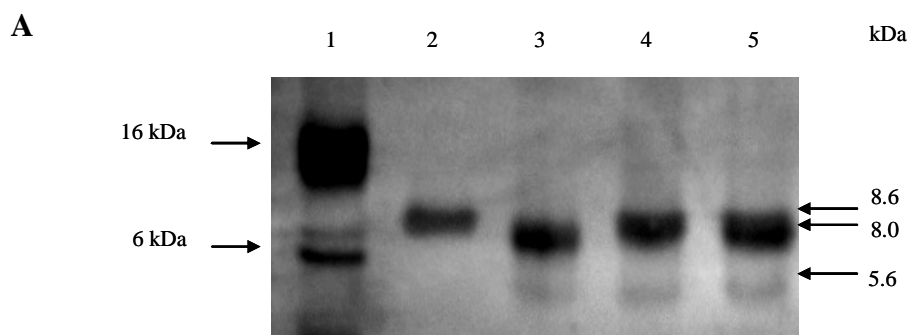


Figura 15. Caracterización de la actividad proteolítica de la cruzipaína purificada de *Trypanosoma cruzi*. **A.** SDS-PAGE al 10%, teñido con plata mostrando a la cruzipaína en su forma pura (complejo de isoformas (57-60 kDa)). **B.** Actividad enzimática de cruzipaína evidenciada en geles de acrilamida co-polimerizada con gelatina. **C.** Hidrólisis del péptido sintético N-Benzoyl-Pro-Phe-Arg pNitroanilide por cruzipaína en presencia o ausencia del inhibidor E-64 (10 nM). Como control positivo se incluyó papaína. Longitud de onda leída a 410 nm. AB: Amortiguador de activación. * $p < 0.05$

Proteólisis de la quimiocina CCL12 por cruzipaína.

Para determinar si CCL12 era sustrato de la cruzipaína, se realizaron ensayos de proteólisis *in vitro* en donde se puso a interaccionar la quimiocina con cruzipaína por 120 min, como se indica en materiales y métodos. De esta interacción se observó un cambio en el peso molecular de esta quimiocina y la presencia de fragmentos de degradación entre 8 y 5 kDa. (Figura 16A, carril 3). Estos resultados demuestran que CCL12 es susceptible a ser degradada por cruzipaína. Al agregar el inhibidor de proteasas de cisteína E-64 (100 μ M) se observó una inhibición parcial de la actividad proteolítica de cruzipaína (Figura 16 A, carril 4), sin embargo, el peso molecular de la banda mayoritaria corresponde al de CCL12 (8.6 kDa) (Figura 16A, carril 2) y de manera comparativa cuando la quimiocina se incubó con la cruzipaína por 120 min, se puede observar la diferencia en el peso molecular. Los productos de degradación de la quimiocina fueron analizados por espectrometría de masas, en donde se observó la generación de fragmentos de bajo peso molecular así como la preferencia de cruzipaína por los aminoácidos K26-S27 y R44-Th45 cuando utiliza como sustrato a la quimiocina CCL12 (Figura 16 B).



B



Figura 16. Análisis de la actividad proteolítica de la cruzipaína sobre CCL12. **A.** Análisis electroforético de los productos de degradación de CCL12 por cruzipaína. Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2. CCL12. Carril 3. CCL12 incubada durante 120 minutos con cruzipaína pre-activada. Carril 4. CCL12 incubada con cruzipaína inhibida con E-64. Carril 5. CCL12 incubada con cruzipaína (0 min) e inmediatamente analizada electroforéticamente. **B.** Fragmentos de quimiocina generados y residuos de aminoácidos reconocidos (K26-S27 y R44-T45) por cruzipaína. Sitios de corte indicados por las flechas.

Inhibición de la actividad quimiotáctica de CCL12 por cruzipaína.

La interacción de CCL12 con su receptor CCR2, el cual se expresa en diversos tipos celulares, induce la generación de respuestas biológicas entre las que se encuentra la quimiotaxis de leucocitos. El efecto de la cruzipaína sobre la actividad quimiotáctica de CCL12 sobre monocitos humanos de la línea celular THP-1 se midió comparando la actividad quimiotáctica de la quimiocina completa con la quimiocina proteolizada.

La actividad quimiotáctica de la quimiocina CCL12 degradada por cruzipaína se disminuyó en casi el 50 %. Cuando la actividad de cruzipaína fue inhibida con E-64 hubo una migración celular de más del 80 % comparada con la quimiocina completa (Figura 17).

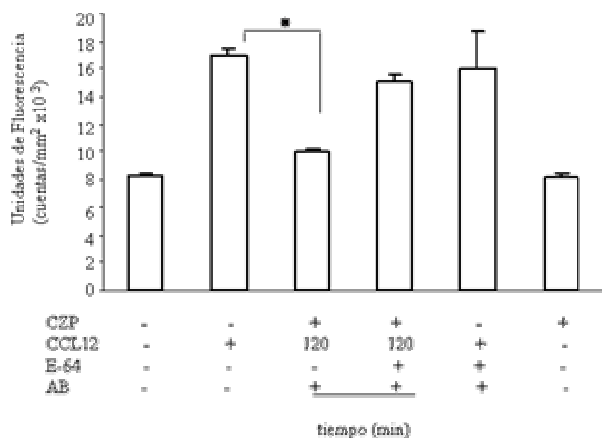
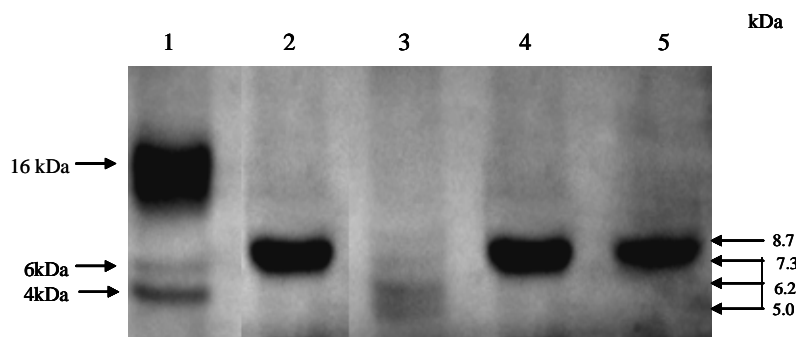


Figura 17. Quimiotaxis de células THP-1 en presencia de los productos de proteólisis de CCL12. Células THP1 (1×10^6 /mL) marcadas con calceína-AM se colocaron en la parte superior de la cámara de Boyden y la quimiocina sin tratar (500 ng/mL), tratada con cruzipaína por 120 minutos o con la cruzipaína inhibida con E-64 (10nM), se colocó en la parte inferior de la cámara. El ensayo se incubó por 90 minutos a 37°C . El número de células que migraron a la membrana de policarbonato (poro de $5\mu\text{m}$) fueron contadas usando el analizador de imágenes FX. La actividad quimiotáctica de CCL12 incubada con la cruzipaína fue inhibida con respecto a la actividad mostrada por CCL12 intacta. Esta inhibición fue revertida cuando la cruzipaína se trató con E-64. AB: Amortiguador de activación. * $p = 0.0017$. Experimento representativo de al menos tres repeticiones con cada tratamiento por triplicado.

Degradación de CCL13 por cruzipaína.

Sabiendo que CCL13 es la quimiocina ortóloga de CCL12 en humano, se evaluó si la preferencia de aminoácidos por cruzipaína era diferente entre estas dos proteínas con alto grado de homología. Los resultados mostraron que CCL13 fue digerida casi completamente por cruzipaína a los 120 minutos de incubación, originando péptidos de 1– 5 kDa (Figura 18 A, Carril 3). El inhibidor de proteasas de cisteína E-64 inhibió la actividad catalítica de cruzipaína (Figura 18, Carril 4). Los productos de proteólisis generados se identificaron por espectrometría de masas y se determinó que la cruzipaína reconoció el enlace peptídico entre los residuos de aminoácidos: R24-L25, K38-A39, Y62-M63 (Figura 18 B).

A



B



Figura 18. Proteólisis de la quimiocina humana CCL13 por la cruzipaína de *T. cruzi*. **A.** Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2. CCL13. Carril 3. CCL13 incubada durante 120 minutos con cruzipaína pre-activada. Carril 4. CCL13 incubada con cruzipaína inhibida con E-64. Carril 5. CCL13 incubada con cruzipaína (0 min) e inmediatamente analizada electroforéticamente. Las flechas a la derecha indican el peso molecular de los productos de degradación. **B.** Fragmentos generados por la proteólisis de CCL13, secuenciados por espectrometría de masas y sitios de corte indicados por las flechas (R24-L25, K38-A39, Y62-M63).

Cruzipaína inhibe la actividad quimioatrayente de CCL13.

La actividad biológica de la quimiocina CCL13 degradada por cruzipaína se analizó mediante un experimento de quimotaxis utilizando células monocíticas THP-1, determinándose una reducción del 70% en su capacidad quimiotáctica con respecto a la observada con CCL13 no tratada. Esta inhibición fue mayor a la obtenida con los productos de proteólisis de CCL12. Cuando se inactivó a la cruzipaína con E-64 la actividad quimiotáctica de CCL13 no se vio afectada de manera significativa (Figura 19).

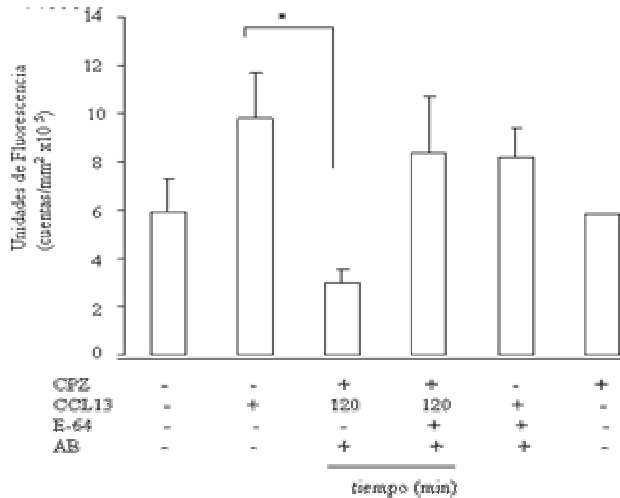


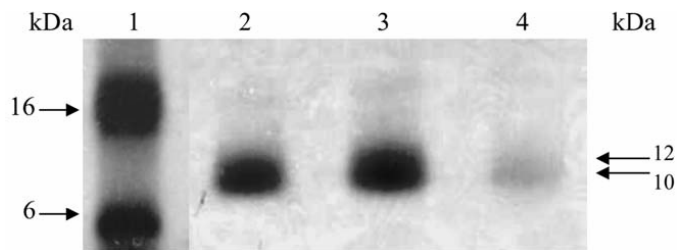
Figura 19. Cruzipaína afecta la actividad quimiotáctica de CCL13 sobre células monocíticas. Los ensayos de quimiotaxis se realizaron de acuerdo a lo descrito en la metodología y a lo mencionado en la Figura 17. La migración de las células THP-1 fue inhibida en respuesta a CCL13 proteolizada por la cruzipaína durante 120 minutos. Esta inhibición se revirtió cuando la cruzipaína fue tratada con E-64. AB: amortiguador de activación. * $p = 0.0013$. Experimento representativo de al menos tres repeticiones con cada tratamiento por triplicado.

Proteólisis de CCL2 por cruzipaína.

En este estudio demostramos que CCL2 es una de las quimiocinas que se expresa en tejido esquelético y cardíaco durante todas las etapas del desarrollo de la infección en ratón con *T. cruzi* (Figura 12 C y 13 C). Para determinar si CCL2 era sustrato susceptible a la proteólisis por cruzipaína, se realizaron ensayos de proteólisis *in vitro* bajo las mismas condiciones que para CCL12 y CCL13. En la Figura 20 se puede observar que CCL2 es proteolizada por cruzipaína a los 120 minutos de incubación (Figura 20 A, carril 4), siendo esta actividad inhibida por E-64 (Figura 20, carril 3). El análisis por espectrometría de masas de los productos de degradación de CCL2 mostró la generación de 4 fragmentos, dejando un fragmento más grande que corresponde a la parte central de la molécula, el cual es de aproximadamente 7.1 kDa (Figura 20 B). Los enlaces peptídicos reconocidos por la

cruzipaína se encuentran entre los aminoácidos S14-F15, T33-S34 y S100-E101 (Figura 20 B)

A



B

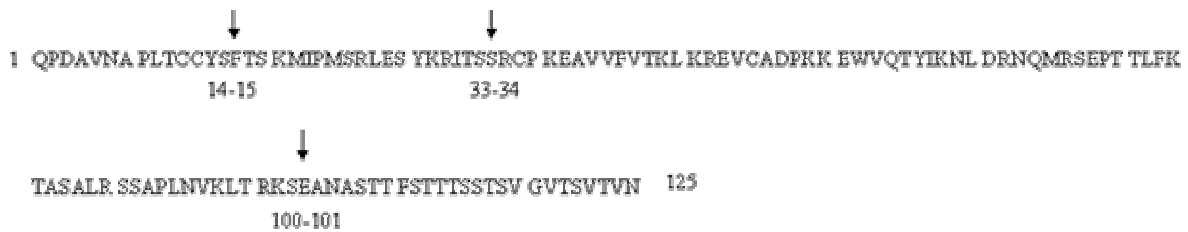


Figura 20. Degradación de CCL2 por cruzipaína. **A.** Carril 1. Marcador de peso molecular. Carril 2. CCL2. Carril 3. CCL2 incubada con cruzipaína inhibida con E-64. Carril 4. CCL2 incubada durante 120 minutos con cruzipaína pre-activada. Las flechas indican el peso molecular de la quimiocina y los fragmentos generados de la proteólisis. **B.** Análisis por espectrometría de masas de los productos de degradación generados a partir de CCL2. Enlaces peptídicos de los residuos de aminoácidos reconocidos por la cruzipaína señalados con una flecha.

La cruzipaína no afecta la actividad quimiotáctica de CCL2 sobre células monocíticas.

Para determinar si la degradación observada en CCL2 por cruzipaína afectaba su actividad quimiotáctica como en el caso de las quimiocinas CCL12 y CCL13, se realizaron

experimentos de quimiotaxis *in vitro* con células THP-1. Los resultados obtenidos demostraron que a diferencia de lo obtenido con CCL12 y CCL13, la cruzipaína no afecta la actividad quimiotáctica de CCL2, ya que el número de células que migraron a través de la membrana de policarbonato fue muy similar entre la quimiocina tratada y sin tratar con la enzima durante 120 minutos (Figura 21).

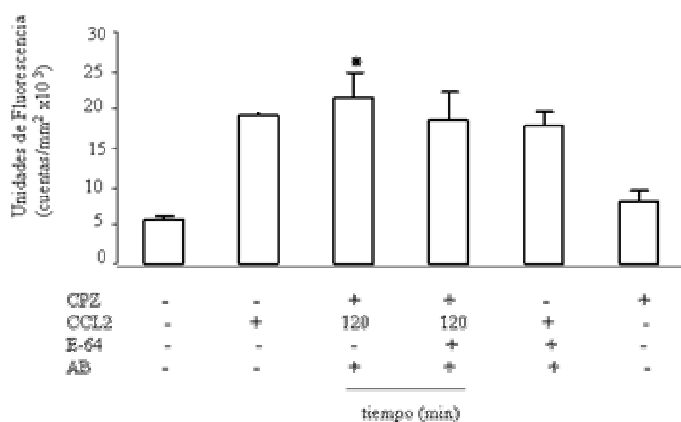


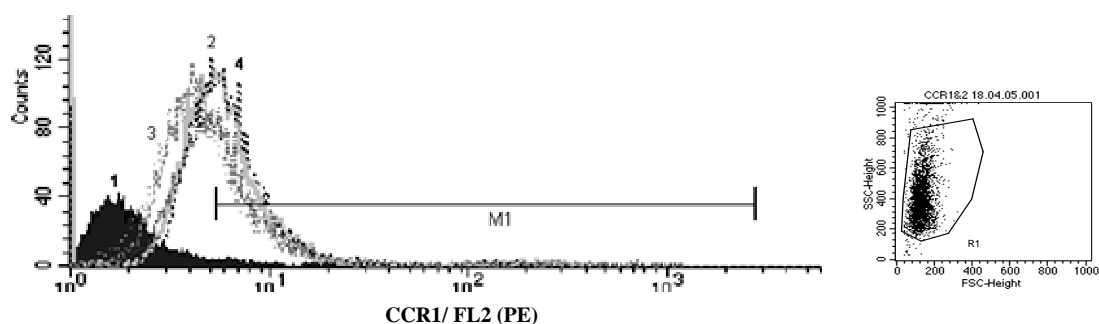
Figura 21. Efecto de la cruzipaína sobre la actividad quimioatrayente de CCL2. El ensayo de quimiotaxis se realizó de acuerdo a lo descrito en la metodología y se menciona en la Figura 17. El tratamiento de CCL2 con la cruzipaína no afectó la actividad quimiotáctica de esta quimiocina. * $p = 0.07$

Una vez analizado el efecto de cruzipaína sobre CCL2, CCL12 y CCL13 y demostrado que la enzima presenta diferente especificidad hacia estas quimiocinas, nos interesó investigar el efecto de la cruzipaína sobre los receptores de quimiocinas, lo cual también estaría afectando de manera directa a la migración celular dentro del proceso inflamatorio desencadenado durante la enfermedad de Chagas. Los receptores de quimiocinas seleccionados para el estudio fueron CCR1 y CCR2 los cuales son reconocidos por los ligandos CCL12/CCL13 y CCL2 respectivamente y se expresan en la superficie de células monocíticas THP-1.

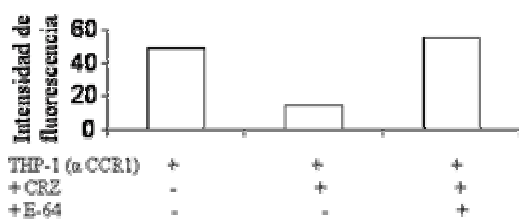
Análisis del efecto de la cruzipaína sobre la expresión de los receptores de quimiocina CCR1 y CCR2 sobre la superficie de células monocíticas THP-1.

Se sabe que CCL13/CCL12 es uno de los ligandos para CCR1 y CCL2 el ligando de CCR2. Al tratar a las células THP-1 con cruzipaína, se observó una disminución del 50% en el porcentaje de expresión del receptor CCR1 (Figura 22 A y B) sobre la superficie celular y una reducción del 25 % de células que expresaron este receptor en la superficie al ser tratadas con la enzima (Figura 22 C).

A.



B.



C.

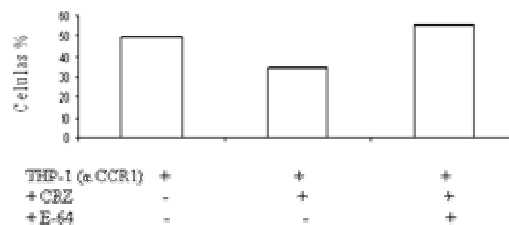
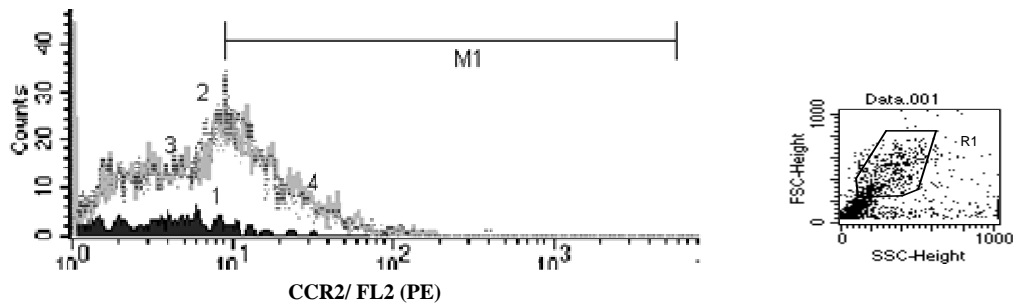


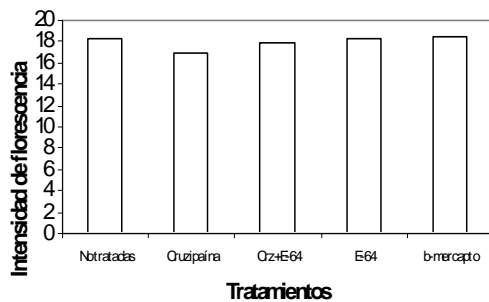
Figura 22. Efecto de cruzipaína sobre el receptor de quimiocinas CCR1. Células THP-1 no tratadas o tratadas con la cruzipaína fueron incubadas con el anticuerpo anti-CCR1 acoplado a biotina. **A.** Histograma de células THP-1 con los diferentes tratamientos, **1.** Células THP-1 sin anticuerpo anti-CCR1, **2.** Células THP-1 con anticuerpo para CCR1, **3.** Células THP-1 tratadas con cruzipaína e incubadas con anti-CCR1, **4.** Células THP-1 tratadas con cruzipaína inhibida con E-64 e incubadas con anti-CCR1. **B.** Intensidad de fluorescencia de células THP-1 tratadas con las diferentes condiciones y con anti CCR1-biotinilado. **C.** Porcentaje de células THP-1 que expresan en su superficie el receptor CCR1 bajo las diferentes condiciones de tratamiento.

En el caso de CCR2, la cruzipaína inhibió 7.5% la expresión de este receptor sobre la superficie de las células THP-1 (Figura 23 A y B) y disminuyó alrededor del 15% el número de células que expresan CCR2 en su superficie (Figura 23 C).

A.



B.



C.

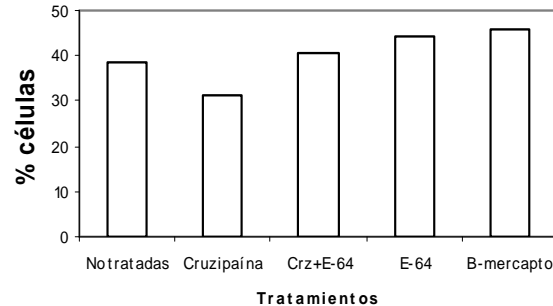


Figura 23. Efecto de cruzipaína sobre el receptor de quimiocinas CCR2. Células THP-1 no tratadas o tratadas con la cruzipaína, fueron incubadas con el anticuerpo anti-CCR2 acoplado a biotina. **A.** Histograma de células THP-1 con los siguientes tratamientos, **1.** Células THP-1 sin anticuerpo anti-CCR2, **2.** Células THP-1 con anticuerpo para CCR2, **3.** Células THP-1 tratadas con cruzipaína e incubadas con anti-CCR2, **4.** Células THP-1 tratadas con cruzipaína inhibida con E-64 e incubadas con anti-CCR2. **B.** Intensidad de fluorescencia de células THP-1 tratadas con las diferentes condiciones y tratadas con anti-CCR2-biotina. **C.** Porcentaje de células THP-1 que expresan en su superficie el receptor CCR2 bajo las diferentes condiciones de tratamiento.

Hasta este momento hemos demostrado que la cruzipaína de *T. cruzi* inhibe la quimiotaxis *in vitro* inducida por las quimiocinas CCL12/13, además de inhibir 50% y 7.5% la expresión de los receptores de quimiocina CCR1 y CCR2 respectivamente sobre la superficie de las células THP-1. Por lo anterior, resultó de interés evaluar cual(es) de los fragmentos generados a partir de la proteólisis de la quimiocina CCL13, con la que se obtuvo una mayor inhibición de la quimiotaxis de células THP-1, presentaba la capacidad de inhibir la actividad quimioatrayente de esta quimiocina.

Para abordar este estudio, consideramos evidencia obtenida previamente en nuestro laboratorio con respecto a la actividad antagonista de la migración celular del péptido CDIP-2 ((19-37) KISLQRLKSYVITTSRCPQ), generado por fragmentación aleatoria de la quimiocina CCL13 (70). Al realizar el análisis comparativo entre CDIP-2 y los fragmentos generados a partir de la proteólisis de CCL13 por cruzipaína e identificados por espectrometría de masas, encontramos un péptido con secuencia similar a CDIP-2 al que denominamos CDCP-1 ((24-38) LKSYVITTSRCPQK) por sus siglas en inglés (Cruzipain Derived Chemokine Peptide -1). CDCP-1 es parte del extremo amino terminal de la proteína CCL13, el cual fue sintetizado y utilizado para realizar ensayos de inhibición de quimiotaxis *in vitro*.

Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de CDCP-1 sobre la migración de células monocíticas THP-1.

Células THP1 previamente marcadas con calceína-AM se incubaron a 4°C por 15 minutos con diferentes concentraciones de CDCP-1 (2.5, 5, 10 y 20 µg/mL). Se incluyó como control de la quimiotaxis a CCL-13 (500 ng/mL). Las células se lavaron y se procedió a realizar el ensayo de quimiotaxis empleando en la parte inferior de la cámara de Boyden a CCL13 (500 ng/mL) como quimioatrayente.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 24 donde se puede apreciar que CDCP-1 inhibe, significativamente ($p < 0.05$), la migración de células monocíticas hacia CCL13, a partir de 20 µg/mL.

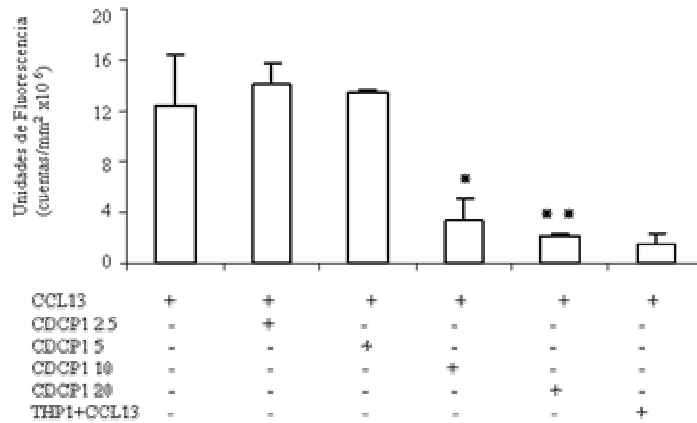


Figura 24. CDCP-1 es antagonista de la actividad quimiotáctica de CCL13. Ensayos de quimiotaxis utilizando células THP-1 pre-incubadas con diferentes concentraciones de CDCP-1 (2.5, 5, 10 y 20 µg/mL) mostraron que este péptido tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad quimiotáctica de CCL13 * p = 0.09, ** p = 0.04.

Una vez que se demostró que CDCP-1 tiene actividad antagonista *in vitro* sobre la quimiocina CCL13, se procedió a evaluar su participación en la inhibición *in vivo* del proceso inflamatorio. Para llevar a cabo lo anterior, se empleó un modelo de peritonitis murina bien caracterizado en la literatura (165, 166, 167) y empleado previamente en nuestro laboratorio, en donde el tipo de células predominantes después de 72 horas de inyectar el irritante tioglicolato son monocitos.

Evaluación *in vivo* de la actividad inhibitoria de CDCP-1 en modelo de peritonitis murina.

En el modelo murino de peritonitis el reclutamiento celular se induce con tioglicolato de sodio, durante las primeras horas de irritación se promueve la migración de linfocitos polimorfonucleares mientras que en una fase tardía las células monocíticas como macrófagos son predominantes (165, 166, 167). En nuestro modelo, después de 72 horas de irritación con tioglicolato, se inyectaron 50 µg/kg de CDCP-1 a los ratones y éstos se sacrificaron 24 horas después. En el ensayo se incluyeron ratones tratados solo con tioglicolato, tioglicolato más PBS, tioglicolato más CDCP-1 y CDCP-1 solo sin

tioglicolato. Las células peritoneales obtenidas se lavaron y marcaron con los anticuerpos contra: CD3-FITC, CD4-PI, CD8-Cy5, CD11b-APC y Gr1-PE y se analizaron por citometría de flujo (Figura 25).

En ratones tratados con tioglicolato y CDCP-1 se observó una inhibición de la migración celular del 70% (Figura 25 A), con una reducción del 60% de células que expresan el marcador celular CD11b en la superficie (Figura 25 B). No hubo una inhibición significativa de las poblaciones de linfocitos CD4 y CD8 positivas así como de células polimorfonucleares.

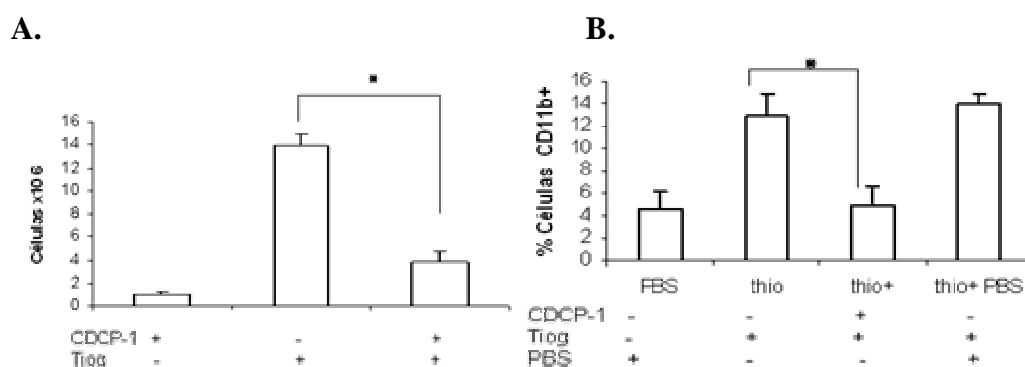


Figura 25. CDCP-1 inhibe el reclutamiento de células positivas para CD11b en el modelo de peritonitis murino. **A.** Grupos de ratones fueron tratados con tioglicolato de sodio solo, o tioglicolato más CDCP-1 o CDCP-1 solo. CDCP-1 redujo de manera significativa el número de células totales reclutadas en el peritoneo después del tratamiento con tioglicolato. * $p = 0.0001$ **B.** Porcentaje de células CD11b⁺ obtenidas del peritoneo de ratones tratados con las diferentes condiciones. CDCP-1 redujo el porcentaje de macrófagos (CD11b⁺) reclutados en el peritoneo al tratar con tioglicolato, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. * $p = 0.06$.

En la parte final de este proyecto de investigación se determinó si los péptidos sintéticos generados a partir de la proteólisis de CCL13 podrían mantener su actividad inhibitoria en el modelo murino de la enfermedad de Chagas, el cual fue tomado como base para este proyecto doctoral.

Con los antecedentes previos de nuestro laboratorio en donde CDIP-2 presenta actividad inhibitoria en un modelo murino de asma así como en el modelo de peritonitis (70), se decidió trabajar con este péptido y conocer su actividad durante el desarrollo de la enfermedad de Chagas.

Inhibición del proceso inflamatorio *in vivo* por CDIP-2 en un modelo murino de la enfermedad de Chagas.

Durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas se genera una fuerte reacción inflamatoria la cual disminuye de manera natural después de 30 días al pasar a una fase intermedia y posteriormente crónica de la enfermedad. Por lo mencionado fue de interés investigar el efecto inhibitorio del péptido CDIP-2 (generado por fragmentación aleatoria de la quimiocina CCL13) en el reclutamiento celular durante la fase aguda en un modelo murino de la enfermedad de Chagas. Para llevar a cabo dicho experimento se utilizaron ratones BALB/c infectados con 1×10^3 tripomastigotes de la cepa CAI72 de *T. cruzi* a los cuales se les inyectó CDIP-2 por vía intra-peritoneal, como se menciona en materiales y métodos. Los ratones fueron sacrificados durante la fase aguda a diferentes tiempos de infección y se extrajo tejido muscular esquelético y cardiaco para su análisis por inmunohistoquímica del infiltrado celular (Figura 26). La disminución del infiltrado celular en ambos tejidos (esquelético y cardiaco) fue evidente en tejido muscular esquelético a los 5, 15, 22 y 28 días posteriores a la infección y en tejido cardiaco a los días 15, 22 y 28 posteriores a la infección en los animales que recibieron el tratamiento con CDIP-2. Este ensayo se realizó en una sola ocasión y no se identificaron las poblaciones celulares sobre las cuales tiene efecto el péptido.

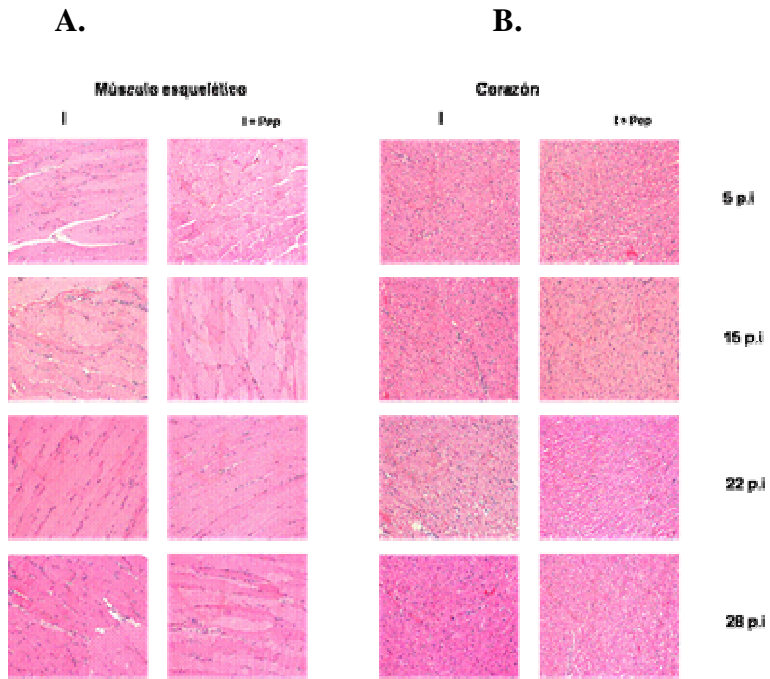


Figura 26. Infiltrado celular de tejido esquelético (A) y cardiaco (B) de ratones infectados con *T. cruzi* y tratados por vía intra-peritoneal con CDIP-2 (50 μ g/kg) durante la fase aguda de la infección (5, 15, 22 y 28 días pi). **I:** infectado, **I + Pep:** infectado + péptido (CDIP-2).

12. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La tripanosomosis sigue siendo un problema de salud pública en América Latina que afecta entre 14 y 18 millones de personas (102). México es un país endémico y con base a un estudio de seroprevalencia a nivel nacional se calcula que existen alrededor de 1,564, 800 personas infectadas (168).

A lo largo de los años se han caracterizado mejor los factores que influyen para un adecuado tratamiento y entendimiento de la enfermedad de Chagas tanto clínica como inmunológicamente. A partir de estos estudios se tiene conocimiento de que una de las moléculas de mayor importancia dentro del ciclo de vida de *T. cruzi* es la proteasa de cisteína, cruzipaína, expresada durante todas las etapas de diferenciación del parásito, siendo mas abundante en el estadio intracelular (127). Esta enzima ha sido ampliamente caracterizada a nivel fisicoquímico en los diferentes aislados de *Trypanosoma cruzi* (136, 137,138). Además de participar en la entrada y diferenciación celular del parásito, se ha visto que promueve una activación alternativa de macrófagos permitiendo el establecimiento de amastigotes en las células del hospedero (111). Por otro lado, la cruzipaína tiene una importante participación en la evasión y regulación de la respuesta inmune ya que degrada la cadena pesada de las inmunoglobulinas (144) así como moléculas de la cascada del complemento (169), inhibiendo el desarrollo de una respuesta humoral y celular efectiva contra el parásito.

La participación de quimiocinas y citocinas en la activación de una respuesta inmune innata protectora contra *T. cruzi* al primer contacto es esencial para erradicar al parásito y generar inmunidad concomitante ante un segundo encuentro. Estas moléculas participan en el reclutamiento de células del sistema inmune al sitio en donde se encuentra el parásito o antígenos derivados del mismo durante una fase temprana o tardía de la enfermedad de Chagas. Las quimiocinas con su actividad quimioatrayente contribuyen en casos graves ó avanzados de la enfermedad a la existencia de infiltrado celular exacerbado en los diferentes órganos del hospedero, tales como corazón, bazo, colon ó esófago.

Debido a la participación de la cruzipaína en la invasión y evasión de la repuesta inmune del hospedero así como la importante participación de las quimiocinas y citocinas dentro de la respuesta inmune innata y adaptativa en contra de *T. cruzi*, el principal objetivo del

presente trabajo fue evaluar el efecto proteolítico de cruzipaína sobre algunas quimiocinas de la familia CC y cómo esto afectaba su actividad de quimiotaxis celular.

Durante este proyecto de investigación se trabajó con el aislado Querétaro de *T. cruzi*, que a pesar de que está poco descrito en la literatura, es un aislado mexicano presente en varias localidades rurales en nuestro país. Presenta características que la posicionan en el grupo 1 dentro de los zimodemos descritos para *T. cruzi*, caracterizados por un alta parasitemia en la fase aguda así como tropismo hacia el tejido cardíaco (170, 171).

En la primera parte de este proyecto se demostró por inmunohistoquímica la presencia de cruzipaína y de las quimiocinas CCL2 y CCL12 en tejido esquelético y cardíaco de ratones susceptibles de la cepa BALB/c infectados con la cepa Querétaro de *T. cruzi*. La presencia de CCL12 y cruzipaína predominó a los días 15 y 30 post-infección, coincidiendo con un alto infiltrado celular tanto en tejido muscular esquelético como en tejido cardíaco. Sin embargo, en el día 60 p.i. se observó una disminución de CCL12 y cruzipaína que correlaciona con una marcada disminución en el infiltrado celular en ambos tejidos. En el caso de CCL2 no se observó una disminución en los tejidos infectados, aunque en el día 60 p.i. la presencia de esta quimiocina fue ligeramente menor que en 15 y 30 p.i. El infiltrado celular presente en los tejidos infectados fue mayoritariamente de células positivas para MHC II, así como un mayor número de células T CD8 positivas sobre T CD4 positivas en ambos tejidos. Estos resultados son congruentes con lo reportado para otros modelos murinos de enfermedad de Chagas (123). El reclutamiento celular durante la fase aguda de la enfermedad, esta mediado por diversos receptores de quimiocinas tales como CCR2 y CCR5, de tal manera que estos receptores podrían estar promoviendo el reclutamiento de células MHCII positivas y linfocitos T CD8 positivos respectivamente a los tejidos; sin embargo, está reportado que durante la fase crónica de la infección estos receptores no tienen una participación importante en el reclutamiento celular al tejido (117, 120).

Por otro lado, se demostró la actividad proteolítica de cruzipaína sobre CCL2, CCL12 y CCL13, siendo CCL13 la más susceptible a la acción de esta proteasa. A este respecto, se sabe que proteasas derivadas del hospedero tales como las metaloproteinasas de matriz (MMP's) o proteasas derivadas de patógenos (154, 158, 163) tienen la capacidad de degradar quimiocinas, promoviendo en algunos casos (dependiendo de la quimiocina) un efecto agonista/antagonista de su actividad quimioatrayente celular. Considerando lo

anterior, investigamos la capacidad quimiotáctica sobre células THP-1 de las quimiocinas degradadas por la cruzipaína. Nuestros resultados demuestran que bajo estas condiciones CCL12 y CCL13 pierden su actividad quimiotáctica, no siendo así para CCL2. En la literatura se reporta una metaloproteasa derivada de los productos de excreción/secreción de *Necator americanus*, la cual degrada específicamente a la quimiocina CCL11 y no a quimiocinas como CCL24 ó CXCL8 siendo que todas son atrayentes de eosinófilos (172). Nuestro grupo de investigación reportó con anterioridad que la proteasa de cisteína producida por *Entamoeba histolytica* corta de manera diferencial a las quimiocinas CCL2, CCL13 y CXCL8, promoviendo con esto la inhibición del reclutamiento de monocitos en ensayos *in vitro* para las dos primeras, y encontrando el efecto contrario al cortar a la quimiocina CXCL8 donde la migración de granulocitos aumentó (154).

Los fragmentos de degradación de CCL2, CCL12 y CCL13 generados por la actividad proteolítica de la cruzipaína fueron analizados por espectrometría de masas y se identificaron los motivos de aminoácidos reconocidos por la cruzipaína en cada quimiocina. La proteasa reconoció con diferente especificidad estos motivos, sin importar el grado de homología que las quimiocinas tengan, generando péptidos con características diferentes. Así, se obtuvo la generación de tres fragmentos a partir de la proteólisis de CCL12, que por sitio de corte sugiere que la cruzipaína reconoce específicamente los motivos de aminoácidos Lisina / Serina en la región N-terminal, así como Arginina / Treonina en la región C-terminal. En el caso de la quimiocina CCL13, lo que se observó fue la generación de 4 fragmentos derivados del reconocimiento de los motivos Arginina / Leucina y Lisina / Arginina en la región N-terminal así como Tirosina / Metionina en la región C-terminal de la proteína, dando lugar a la degradación casi completa de la quimiocina. Con la quimiocina CCL2, cruzipaína presentó preferencia por el aminoácido Serina en la región C-terminal y Treonina en el N-terminal, dando como resultado la generación de tres péptidos, dejando intacta la parte central y C-terminal de la proteína, obteniendo como resultado que la actividad quimiotáctica de CCL2 no fuera afectada por la proteólisis con cruzipaína. Respecto a esto, se ha reportado (136, 137,138, 139) que la preferencia de cruzipaína por su sustrato varía dependiendo del aminoácido adyacente en cualquiera de las posiciones del sustrato, aumentando o disminuyendo su especificidad por el mismo, sin embargo parece tener preferencia por aminoácidos básicos.

A partir de la quimiocina CCL13, que resultó ser más susceptible a la acción por cruzipaina, seleccionamos para su síntesis el péptido denominado CDCP-1 (LKSYVITTSRCPQK) el cual presentó similitud de secuencia con un péptido antagonista previamente descrito en nuestro laboratorio, CDIP-2 (70). Los ensayos de quimiotaxis *in vitro* con CDCP-1 mostraron la actividad antagonista de este péptido sobre la migración celular promovida por CCL13. CDCP-1 se encuentra localizado en la parte central de la proteína haciendo este evento de inhibición más interesante ya que los péptidos con características de inhibición están normalmente localizados en la parte N-terminal de la proteína (160, 161, 70). La actividad anti-inflamatoria del péptido CDCP-1 se demostró en un modelo de peritonitis murina en el que se indujo una disminución importante del infiltrado celular, principalmente de células CD11b+. Este estudio se repitió con un lote de péptido sintético nuevo adquirido por el laboratorio, sin embargo, los resultados no fueron consistentes con lo obtenido con el lote de péptido anterior. Es recomendable repetir los experimentos de inhibición *in vitro* con CDCP-1 (nuevo) para confirmar el efecto anti-inflamatorio *in vivo* de CDCP-1.

Con anterioridad en nuestro laboratorio se demostró que CDIP-2, el péptido obtenido por fragmentación aleatoria de CCL13, tuvo actividad anti-inflamatoria en un modelo de asma murino (70). Considerando esta actividad, como parte final de esta investigación doctoral, se analizó si CDIP-2 podría tener un efecto inhibitorio sobre el proceso inflamatorio que se observa en ratones infectados con *T. cruzi*. Efectivamente al emplear CDIP-2, se redujo el infiltrado celular tanto en tejido cardíaco como muscular a los 15 y 22 días posteriores a la infección con el parásito. Este ensayo se realizó en una sola ocasión y no se identificaron las poblaciones celulares sobre las cuales tiene efecto CDIP-2, por lo que se requiere confirmar esta observación.

Los experimentos en modelos murinos deben realizarse con distintas dosis de péptidos así como en distintos fondos genéticos; sin embargo, con los resultados preliminares obtenidos se abre la posibilidad de que péptidos de quimiocina con capacidad de antagonismo puedan ser investigados como alternativa terapéutica en conjunto con otros medicamentos para el tratamiento de procesos inflamatorios agudos o bien crónicos. Otro aspecto importante obtenido en el presente estudio es la demostración de la actividad de la cruzipaina sobre los

receptores de quimiocinas CCR1 y CCR2, disminuyendo su expresión sobre la superficie de las células THP-1. En estos ensayos se utilizaron para determinar la presencia de CCR1 o CCR2 en la superficie celular, anticuerpos específicos contra estos receptores, sin embargo, se podrían llevar a cabo con células transfectadas para la expresión de un solo receptor de quimiocina, lo que permitiría demostrar de manera más convincente el efecto de la cruzipaína sobre cada uno de los receptores de quimiocinas expresados en la superficie de macrófagos. Es escasa la información en la literatura, al respecto de la degradación de receptores de quimiocina por proteasas derivadas de parásitos, solo se pueden encontrar ejemplos de degradación de quimiocinas por proteasas derivadas de células del hospedero y algunos parásitos mencionados en este manuscrito en capítulos anteriores.

Los resultados obtenidos en este estudio aportan información importante para entender la ausencia ó poco infiltrado celular que se observa alrededor de algunos nidos de amastigotes en el modelo murino de tripanosomosis (173, 174, 175). A pesar de que en este trabajo no se demostró que la cruzipaína estaba activa en el tejido de los ratones infectados, ni la presencia de los péptidos generados de la proteólisis de las quimiocinas, de manera especial CDCP-1 en el tejido infectado, nuestros resultados sugieren que la cruzipaína, a través de la proteólisis diferencial de las quimiocinas CCL12/CCL13 y CCL2, podría estar regulando el número y tipo celular reclutado durante el proceso inflamatorio en tejido esquelético y cardiaco de animales infectados con *T. cruzi*. La actividad proteolítica de la cruzipaína podría tener una participación importante en el micro-ambiente cercano a los nidos de amastigotes, permitiendo la replicación del parásito en el tejido infectado. De esta forma, cruzipaína podría estar participando en la evasión de la respuesta inmune del hospedero hacia *T. cruzi* permitiendo la permanencia del parásito durante muchos años en los tejidos del hospedero.

Finalmente, este trabajo aporta por primera vez evidencia de la presencia de CCL2, CCL12 y cruzipaína en los tejidos de ratones infectados con *T. cruzi*, además de ser el primer informe acerca del papel proteolítico que tiene cruzipaína sobre quimiocinas de la familia CC involucradas en el proceso inflamatorio desencadenado durante la enfermedad de Chagas.

13. PERSPECTIVAS

- Determinar la co-localización de cruzipaína, CCL2 y CCL12 en tejido de ratón infectado con *T.cruzi*.
- Analizar el efecto de la cruzipaína en la producción de citocinas y quimiocinas por células del sistema inmune (macrófagos, células dendríticas, linfocitos T)
- Determinar la presencia de CDCP-1 en tejido de ratón infectado con *T.cruzi*.
- Analizar si CDCP-1 tiene la capacidad de inhibir la migración de linfocitos reguladores TCD8⁺/CCR5⁺, presentes durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas.
- Confirmar el efecto anti-inflamatorio de CDCP-1 en el modelo murino de peritonitis y de infección con *T. cruzi*.

14. REFERENCIAS

1. Moser B, Loetscher, P. 2001. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.* 2: 123-134
2. Tachibana K., Hirota, S., Iizasa, H. 1998. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature.* 393:591-594.
3. Strieter R.M., Belperio, J.A., Philips, R.J., Keane, M.P. 2004. CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Sem. Can. Biol.* 14: 195-200
4. Licona –Limon P and Soldevila G. 2007. The role of TGF- β superfamily during T cell development, new insights. *Immunol. Lett.* 109 (1): 1-12
5. Cyster J.G. 1999. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science.* 286: 2098-2102.
6. Nagasawa T. 2000. A chemokine, SDF-1/PBSF and its receptor, CXC chemokine receptor 4 as mediators of hematopoiesis. *Int. J. Hematol.* 72: 408-412
7. Annunziato F. Romagnani, P. Cosme, L., Lazzeri, E., Romagnani, S. 2001. Chemokines and lymphopoiesis in human thymus. *Trends Immunol.* 22: 277-285
8. Olson S. T. and Ley K. 2002. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283: 7–28.
9. Flier J. Boorsma, D.M., van Beek, P.J. 2001. Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9 and CXCL11 in different types of skin inflammation. *J. Pathol.* 194: 398-405.

10. Mahad D., Callahan, M.K., Williams, K.A. 2006. Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. *Brain*. 129: 212-223.
11. Thomas S.Y., Banerji, A., Medoff, B.D., Lilly, C.M., Luster, A.D. 2007. Multiple chemokine receptors, including CCR6 and CXCR3, regulate antigen-induced homing of T cells to the human asthmatic airway. 2007. *J. Immunol*. 179: 1901-1912.
12. Doodes P. D., Cao Y, Hamel K. M., Wang Y, Rodeghero R L., Kobezda T, Finnegan A. 2009. CCR5 is involved in resolution of inflammation in proteoglycan-induced arthritis. *Exp. Arthr*. 60 (7):1932-1943
13. Hintzen C, Quaiser S, Pap T, Heinrich P.C., Hermanns H. M. 2009. Induction of CCL13 expression in synovial fibroblasts highlights a significant role of oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthr. Care Res*. 60 (7): 1932-1943.
14. Hamel D.J., Sielaff I., Proudfoot A. E.I., Handel T.M. 2009. Interactions of Chemokines with glycosaminoglycans. *Meth. Enzimol*. 461: 71-102
15. Capila I, Linhardt RJ. 2002. Heparin–protein interactions. *Ang. Chem. Int. Ed. Engl*. 41:391–412.
16. Laguri C., Arenzana-Siesdedos F., Lortat-Jacob H. 2008. Relationships between glycosaminoglycans and receptor binding sites in chemokines-the CXCL12 example. *Carbohydr. Res.* 343 (12):2018-2023
17. Graham G. J., P. C. Wilkinson, R. J. Nibbs, S. Lowe, S. O. Kolset, A. Parker, M. G. Freshney, M. L. Tsang, and I. B. Pragnell. 1996. Uncoupling of stem cell inhibition from monocyte chemoattraction in MIP- 1 β by mutagenesis of the proteoglycan binding site. *EMBO J*. 15: 6506–6515.

18. Proudfoot A. E., S. Fritchley, F. Borlat, J. P. Shaw, F. Vilbois, C. Zwahlen, A. Trkola, D. Marchant, P. R. Clapham, and T. N. Wells. 2001. The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J. Biol. Chem.* 276: 10620–10626
19. Ali S., Robertson H., Wain J. H., Isaacs J. D., Malik G and Kirby J A. 2005. A Non-Glycosaminoglycan-Binding Variant of CC Chemokine Ligand 7 (Monocyte Chemoattractant Protein-3) Antagonizes Chemokine-Mediated Inflammation. *J. Immunol.* 175: 1257–1266.
20. Ali S., Fritchley S. J., Chaffey B. T and Kirby J. A. 2002. Contribution of the putative heparan sulfate-binding motif BBXB of RANTES to transendothelial migration. *Glycobiology.* 12: 535–543.
21. Proudfoot A. E., Handel T. M., Johnson Z., Lau E. K., LiWang P., Clark-Lewis I., Borlat F., Wells T. N and Kosco-Vilbois M. H. 2003. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 1885–1890.
22. Witt D.P, Lander AD.1994. Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr. Biol.* 4:394–400.
23. Celie J W., Beelen R H., Van der Born J. 2009. Heparan sulfates proteoglycans in extravasation: assisting leukocyte guidance. *Front. Biosc.* 14: 4932- 4949.
24. Kuschert, G.S., Hoogewerf, A.J., Proudfoot, A.E.I., Cheng, C.W., Cooke, R., Hubbard,R.E., Wells, T.N.C., and Sanderson, P.N. 1998 Identification of a glycosaminoglycan biding site of human interleukine -8. *Biochemistry.* 37: 11,193-11, 201.
25. Clore G.M., Appella, E., Yamada, M., Matsushima, K., Gronenborn, A.M. 1990. Three-dimensional structure of interlukine 8 in solution. *Biochemistry.* 29: 1689-1696.

26. Handel T.M., Domaille, P.J. 1996. Heteronuclear (¹H, ¹³C, ¹⁵N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer. *Biochemistry*. 35: 6569-6584.
27. Zlotnik A., Yoshie, O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 18: 217-242.
28. Allavena P., Bianchi, G., Zhou, D., Van Damme, J., Jilek, P., Sozzani, S., and Manovani, A. 1994. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein -1,-2 and -3. *Eur. J. Immunol.* 24: 3233-3238
29. Garcia-Zepeda E.A., Combatiere, C., Rothenberg, M.E., Sarafi, M.N., Lavigne, F., Hamid, Q., Murphy, M.P. and Luster, A. D.1996. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR2)-2 and -3. *J. Immunol.* 157: 5613-5626
30. Uguccioni M., D'Apuzzo, M., Loetscher, B., Dewald, and Baggiolini, M. 1995. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1. *Eur. J. Immunol.* 25: 64-70
31. Taub D., Proost, P., Murphy, W.J., Anver, M., Longo, D.L. and Van Damme, J. 1995. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2 and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 95: 1370 -1405.
32. Baggiolini M and Loetscher, P. 2000. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol. Today*. 21: 418-420.
33. Keane M.P., Arenberg, D.A. Moore, B.B., Addison, C.L. and Strieter, R.M. 1998. CXC chemokines and angiogenesis/angiostasis. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* 110: 288-296.

34. Huang H., Li, F., Cairos, C.M., Gordon, J. R., Xiang, J. 2001. Neutrophils and B cells express XCR1 receptor and chemotactically respond to lymphotactin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28: 378-382.
35. Fong A.M., Robinson, L.A. Steeber, D.A. 1998. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte captures, firm adhesion and activation under physiologic flow. *J. Exp. Med.* 188: 1413-1419.
36. Bjerkeli V., Dama J. K., Fevang B., Holter J. C., Aukrust P. and Frøland S. S. 2007. Increased expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, in Wegener's granulomatosis—possible role in vascular inflammation. *Rheumatology.* 46:1422–1427.
37. Laudanna C., Kim, J.Y., Constantin, G., Butcher, E. 2002. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol. Rev.* 186: 37.
38. Yoshie O., Imai, T., Nomiyama, H. 2001. Chemokines in immunity. *Adv. Immunol.* 78: 57-68.
39. Mantovani A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25: 677-686.
40. Kondo S., Yoneta, A., Yazawa, H., Kamada, A., and Jimbow, K. 2000. Down regulation of CXCR-2 but not CXCR-1 expression by human keratinocytes by UVB. *J. Cell Physiol.* 182: 366-370.
41. Murdoch C., Monk, P.N., and Finn, A. 1999. Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on human epithelial cells. *Immunology.* 98: 36-41.

42. Zou H., Kottmann Y.R., Kuroda A.H., Taniuchi M., Littman I. D.R. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in hematopoiesis and cerebellar development. *Nature*. 393: 595-599.
43. Murphy P.M., Baggiolini, M. Charo, I.F., Hebert, C.A. Horuk, R., Matsushima, K., Millar, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52: 145-176.
44. Bonecchi R., Polentarutti, N., Luini, W., Borsatti A., Bernasconi, S., Locati, M., Power, C., Proudfoot, A., Wells, N.T., Mackay, C., Mantovani, A, and Sozzani, S. 1999. Up regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN-g in human neutrophils. *J. Immunol.* 162: 474-479.
45. Loetscher P., Seitz, M., Baggiolini, M., and Moser, B. 1996. Interleukine-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184: 569-577.
46. Perera L.P., Goldman, C.K., and Waldmann, T.A. 1999. IL-15 induces the expresión of chemokines and their receptors in T lymphocytes. *J. Immunol.* 162: 2606-2612.
47. de Brevern A. G., Wong, H, Tournamille, C. Colin, Y., Le Van Kim, C., Etchebest, C. 2005. A structural model of a seven-transmembrane helix receptor: the Duffy antigen/receptor for chemokine (DARC). *Biochim. Biophys. Acta.* 1724: 288-306.
48. Warne T., Serrano-Vega M.J., Baker J.G., Moukhametzianov R., Edwards P.C. 2008. Structure of a beta 1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*. 454: 486–491.
49. Cherezov V., Rosenbaum D.M., Hanson M.A., Rasmussen S.G., Thian F.S. 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*. 318: 1258–1265.

50. Jaakola V.P., Griffith M.T., Hanson M.A., Cherezov V., Chien E.Y. 2008. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*. 322: 1211–1217
51. Pierce K.L., Ptermont, R.T., Lefkowitz, R.J. 2002. Seven transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 639-650.
52. Allen S.J., Crown, S.E., and Andel, T.M. 2007. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 787-820.
53. Cabrera-Vera T.M., Vanhauwe, J., Thomas T.O., Medkova, M., Preininger, A. 2003. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.* 24: 765-781.
54. Reiter E., Lefkowitz, R.J. 2006. GRK and b-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* 17: 159-165.
55. Ferguson, S., Zhang, J., Barak, L.S., and Caron, M. G. 1998. Molecular mechanism of G protein-coupled receptor desensitization and re-sensitization. *Life Sci.* 62: 1561- 1565.
56. Neel N.F., Schutyser, E., Sai, J., Fan, G.H., Richmond, A. 2005. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cyto. Gro. Fac. Rev.* 16: 637-658.
57. Choe H., Farzan M., Sun Y., Sullivan, N., Rollins B., Ponath P. D., Wu, L., Mackay C. R., LaRosa G., Newman, W., Gerard, N., Gerard C., Sodroski J. 1996. The β -Chemokine Receptors CCR3 and CCR5 Facilitate Infection by Primary HIV-1 Isolates. *Cell.* 85: 1135-1148.
58. Deng H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe S., Unutmaz, D., Burkhart M., Di. Marzio, P., Marmon S., Sutton R. E., Hill, C. M., Davis C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R. Landau, N. R. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature.* 381: 661-666.

59. Doranz, B.J.Orsini, M.J., Turner, J.D., Hoffman, T.L., Berson, J.F. 1999. Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions. *J. Virol.* 73: 2752-2761.
60. Tamamura H., Imai, M., Ishihara T., Masuda M., Funakoshi H., Oyake H., Murakami T., Arakaki, R., Nakashima, H., Otaka, A., Ibuka, T., Waki M., Matsumoto A., Yamamoto N., and Fujii, N. 1998. Pharmacophore Identification of a Chemokine Receptor (CXCR4) Antagonist, T22 ([Tyr^{5,12}, Lys⁷]-Polyphemusin II), which Specifically Blocks T Cell-line-tropic HIV-1 Infection. *Bioor. Med. Chem.* 6: 1033-1041.
61. Tamamura H, Hiramatsu K, Mizumoto M, Ueda S, Kusano S, Terakubo S, Akamatsu M, Yamamoto N, Trent JO, Wang Z, Peiper SC, Nakashima H, Otaka A, Fujii N. 2003. Enhancement of the T140-based pharmacophores leads to the development of more potent and bio-stable CXCR4 antagonists. *Org. Biomol. Chem.* 21: 3663-3669.
62. Murakami T., Kumakura S., Yamazaki T., Tanaka R., Hamatake M., Okuma K., Huang W., Toma J., Komano J., Yanaka M., Tanaka Y., Yamamoto N. 2009. The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable an extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. *Antimicrob. Ags. Chemother.* 53 (7): 2940-2948
63. Zannettino A. C. W., Farrugia A. N., Kortessidis A., Manavis J., To B. L., Martin S. K., Diamond P., Tamamura H., Lapidot T., Fujii N., and Gronthos S. 2005. Elevated Serum Levels of Stromal-Derived Factor-1A Are Associated with Increased Osteoclast Activity and Osteolytic Bone Disease in Multiple Myeloma Patients. *Cancer. Res.* 65: 1700-1709.
64. Takenaga M., Tamamura H., Hiramatsu K, Nakamura N., Yamaguchi Y., Kitagawa A., Kawai S., Nakashima H., Fujii N., and Igarashi R. 2004. A single treatment with microcapsules containing a CXCR4 antagonist suppresses pulmonary metastasis of murine melanoma. *Biochem. Biophys. Res Com.* 320: 226-232.

65. Rubin J. B., Kung A. L., Klein R. S., Chan J. A., Sun Y., Schmidt K., Kieran M. W., Luster A. D., and Segal R. A. 2003. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *PNAS*. 100:13513-13518.
66. Catusse J., Parray, C.M., Edwin, D.R., Gompels, U.A. 2007. Inhibition of HIV-1 infection by viral chemokine U83A via high-affinity CCR5 interactions that block human chemokine-induced leukocyte chemotaxis and receptor internalization. *Blood*. 109: 3633-3639.
67. Barroso-Gonzalez J., El Jaber-Vazdekis N., García-Expósito L., Machado J.D., Zárate R., Ravelo A.G., Estevez-Braun A and Valenzuela Fernandez A. 2009. The lupane-type triterpene 30-oxo-calenduladiol is a CCR5 antagonist with anti- HIV-1 and anti-chemotactic activities. *J. Biol. Chem*. 284 (24): 16609-16620.
68. Dewin D.R., Catusse, J., Gompels, U.A. 2006. Identification and characterization of U83A viral chemokine, a broad and potent beta-chemokine agonist for human CCRs with unique selectivity and inhibition by spliced isoform. *J. Immunol*. 176: 544-556.
69. Westby M, Van der Ryst E. 2005. CCR5 antagonists: host-targeted antivirals for the treatment of HIV infection. *Antivir. Chem. Chemother*. 16 (6): 339-354.
70. Mendez-Enriquez E., Melendez Y., Martinez F., Baay G., Huerta-Yepez S., Gonzalez-Bonilla C., Fortoul T. I., Soldevila G. and García-Zepeda E. A. 2008. CDIP-2, a synthetic peptide derived from chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13), ameliorates allergic airway inflammation. *Clinic. Exp. Immunol*. 1365-2249.
71. De Mendonca F.L., Da Fonseca P.C. Phillips, R.M., Saldaña, J.W., Williams, T.J., and Pease, J.E. 2005. Site-directed Mutagenesis of CC Chemokine Receptor 1 Reveals the Mechanism of Action of UCB 35625, a Small Molecule Chemokine Receptor Antagonist. *J. Biol. Chem*. 280: 4808-4816.

72. Wise E. L., Duchesnes C., da Fonseca P. C. A., Allen R. A., Williams T. J., and Pease J. E. 2007. Small Molecule Receptor Agonists and Antagonists of CCR3 Provide Insight into Mechanisms of Chemokine Receptor Activation. *J. Biol. Chem.* 282: 27935-27943.
73. Tang C.M., and Insel, P.A. 2005. Genetic variation in G-protein-coupled receptors consequences for G-protein-coupled receptors as drug targets. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 9: 1247-1265.
74. Asarian, L., Yousefzadeh, E., Silverman, A.j., silver, R. 2002. Stimuli from cospecifics influence brain mast cell population in male rats. *Harm. Behav.* 42: 1-12.
75. Fouilloux I., Duplan M.B., Baroukh B., Cherruau M., Saffar J.L., Lesclous, P. 2006. Mast cell activation and degranulation occur early during induction of periosteal bone resorption. *Bone.* 38: 59-66.
76. Belot M.P, Abdennebi-Najar, L., Gaudin, F, Lieberherr M., Godoy, V., Tai'eb, J., Emilie, D., and Machelon V. 2007. Progesterone reduces the migration of mast cells toward the chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 with an accompanying decrease in CXCR4 receptors. *Am J. Phys. End. Met.* 292: 1410-1417.
77. Vassiliadou N., Tucker L., Anderson D.J. 1999. Progesterone-induced inhibition of chemokine receptor expresión on peripheral blood mononuclear cells correlates with reduced HIV-1 infectability in vitro. *J. Immunol.* 162: 7510- 7518.
78. Zhao D., Lebovic D.I., Taylor R.N. 2002. Long-term progestin treatment inhibits RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) gene expression in human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 87: 2514-2519.

79. Beagley K. W., Gockel C. M. 2003. Regulation of the innate and adaptive immunity by female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38: 13-22.
80. Letourneau R, Pang X, Sant G.R., Theoharides T.C. 2003. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38: 13-22.
81. Zhao X. J, McKerr G., Dong Z, Higgins C.A, Carson J., Yang Z. Q, Hannigan B. M. 2001. Expression of estrogen and progesterone receptors by mast cells alone, but not lymphocytes, macrophages or other immune cells in human upper airways. *Thorax.* 56: 205-211.
82. Proudfoot A. E., Power, C.A., Hoogewerf, A.J., Montjovent, M.O., Borlat, F. 1996. Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J. Biol. Chem.* 271: 2599-2603.
83. Marino A.P, da Silva A, dos Santos P, Pinto LM, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Lannes-Vieira J 2004. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation.* 110: 1443-1449.
84. Rookmaaker M. B., Verhaar M. C., de Boer H. C., Goldschmeding R, Joles J. A., Koomans H. A., Groen H-J., and Rabelink T. J. 2007. Met-RANTES reduces endothelial progenitor cell homing to activated (glomerular) endothelium in vitro and in vivo. *Am. J. Phys. Renal. Phys.* 293: 624-630.
85. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Cap. 34. Ana Flisser Steinbruch y Ruy Pérez Tamayo. Primera edición, Editores de textos Mexicanos, 2006. pp. 286-301.

86. Sarfo B. Y., Armah H. B, Irune I., Adjei A. A, Olver C. S, Singh S., Lillard Jr J. W and Stiles J. K. 2005. *Plasmodium yoelii* 17XL infection up-regulates RANTES, CCR1, CCR3 and CCR5 expression, and induces ultrastructural changes in the cerebellum. *Malar. J.* 4:63.
87. Suguitan Jr., A. L., Leke R. G. F., Fouda G., Zhou,A., Thuita L., Metenou S., Fogako J., Megnekou R., and Taylor W. D.2003. Changes in the Levels of Chemokines and Cytokines in the Placentas of Women with *Plasmodium falciparum* Malaria. *J. Infect. Dis.* 188:1074–1082.
88. Van den Steer P.E., Deroost K., Van Aelst I., Geurts N., Martens E., Struyf S., Nie C. Q., Hansen D.S., Matthys P., Van Damme J., and Opdenakker G. 2008. CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by modulating T lymphocyte migration toward IFN- γ -induced chemokines. *Eur. J. Immunol.* 38: 1082-1095
89. John C. C., Opika-Opoka R., Byarugaba J., Idro R., and Boivin M. J. 2006. Low Levels of RANTES Are Associated with Mortality in Children with Cerebral Malaria. *J. Infect. Dis.* 194:837–845
90. Dechkum, N., Hananantachai, H., Patarapotikul, J., OACI, J., Krudsood, S., Looareesuwan, S., and Tokunaga, K. 2006. Monocyte Chemoattractan Protein 1 (MCP-1) gene polymorphism is not associated with severe and cerebral malaria in Thailand. *Jpn. J. Infect Dis.* 59: 239-244.
91. Jaramillo M., Godbout M., and Olivier M. 2005. Hemozoin Induces Macrophage Chemokine Expression through Oxidative Stress-Dependent and –Independent Mechanisms. *J. Immunol.* 174: 475–484.
92. Langhi Jr. D. M., Bordin J.O. 2006. Duffy blood group and malaria. *Hematology.* 11(5/6): 389–398.

93. Lämmermann T, Sixt M. 2008. The microanatomy of T-cell responses. *Immunol. Rev.* 221: 26-43
94. Teixeira C. R., Teixeira, M. J., Gomes, R. B. B., Santos C S., Andrade B. B., Raffaele-Netto I., Silva J. S., Guglielmotti A., Miranda J.C., Barral A., Brodskyn C., and Barral-Netto, M. 2005. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment. *J. Immunol.* 175: 8346–8353.
95. Sarafi M N., Garcia-Zepeda E A., MacLean J A., Charo I.F., and Luster, A D. 1997. Murine Monocyte Chemoattractan Protein (MCP)-5: A novel CC Chemokine that is a Structural and Functional Homologue of human MCP-1. *J. Exp. Med.* 185: 99-109
96. Quinones M. P., Estrada C. A., Jimenez F., Martinez H., Willmon O., Kuziel W. A., Ahuja S. K. Ahuja S. S. 2007. CCL2-independent role of CCR2 in immune responses against *Leishmania major*. *Par. Immunol.* 29: 211–217.
97. Steigerwald M. and Moll H. 2005. *Leishmania major* Modulates Chemokine and Chemokine Receptor Expression by Dendritic Cells and Affects Their Migratory Capacity. *Infect. Immun.* 2564–2567.
98. Ato M., Maroof A., Zubairi S., Nakano H., Kakiuchi T., and Kaye P. M. 2006. Loss of Dendritic Cell Migration and Impaired Resistance to *Leishmania donovani* Infection in Mice Deficient in CCL19 and CCL21. *J. Immunol.* 176: 5486–5493.
99. Yurchenko E., Tritt M., Hay V, Shevach E. M., Belkaid, Y. and Piccirillo C. A. 2006. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. *J. Exp. Med.* 203 (11): 2451–2460.

100. Bhattacharyya S, Ghosh S, Dasgupta B, Mazumder D, Roy S, Majumdar S. 2002. Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. *J. Infect. Dis.* 185:1704-1708.
101. Roychoudhury K., Dasgupta B., Sen P., Laskay T. , Solbach W. , De T., Roy S. 2006. Evidence of direct interactions between the CC-chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and *Leishmania* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 150: 374–377.
102. Coura R J. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102 (1): 113-122
103. Macedo AM., Machado CR., Oliveira, RP., and Pena SDJ. 2004. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99 (1): 1-12.
104. Parada H., Carrasco HA., Anez N., Fuenmayor C., Inglessis I., 1997. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas disease: A clinical, parasitological and histopathological study. *Int. J. Cardiol.* 60: 49-54.
105. Da Silva Manoel-Caetano F. and Silva A. E. 2007. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cad. Saúde Pública.* 23(10):2263-2274.
106. Giordengo L., Fretes R., Diaz, H., Cano R., Bacile, A., Vottero-Cima, E., and Gea, S. 2000. Cruzipain induces autoimmune response against skeletal muscle and tissue damage in mice. *Mus. Nerve.* 23: 1407-1413.
107. Tay J., Lara, R., Velasco, O. y Gutiérrez, M. 1996. Parasitología Médica. Sexta Edición. Méndez Editores. México. pp 107-120.

108. Petray P., Corral, R., Cabeza, P. M. and Laguens. R. 2002. Role of macrophage inflammatory protein 1- α (MIP-1 α) in macrophage homing in the spleen and heart pathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 83: 205-211.
109. Hébert C. A. 1999. Chemokines in disease. *Biol. Clin. Res. Human press.* USA. pp: 3-18.
110. Alberti J. C., Souto, J. T., Marino, A. P., Lannes- Vieira, J., Teixeira, M. M., Farber, J. Gazzinelli, R. T. and Silva, J. S. 2001. Modulation of chemokines production and inflammatory responses in IFN- γ and TNF-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* 158 (4): 1433-1440.
111. Stempin C, Giordanengo L, Gea S, and Cerban F. 2002. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J. Leukoc. Biol.* 72: 727-734.
112. Gutierrez R.S.F., Mineo W.P.T., Pavanelli R.W., Guedes M.M.P., Silva S.J. 2009. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104 (1): 236-245
113. Aliberti J.C.S., Machado, F.S., Souto, J.T., Campenelli, A.P., Teixeira, M.M., Gazzinelli, RT. and Silva, JS. 1999. β -Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 4819-4826.
114. Villalta F., Zhang, Y., Viv., KE., Kapees, J. and Lima, MF. 1998. The cystein/cystein family of chemokines RANTES, MIP-1a, MIP-1b induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect. Immun.* 4690-4695.

115. Talvani A., Rocha, MOC., Barcelos, LS., Gomes YM., Ribeiro, AL and Teixeira, MM. 2004. Elevated concentrations of CCL2 and Tumor Necrosis Factor α in Chagasic cardiomyopathy. *Clin. Infect. Dis.* 38: 943-950.
116. Yamamuchi LM., Aliberti, JC., Baruffi, MD., Portela, RW., Rossi, MA., Gazzinelli, RT., Mineo, JR., and Silva, JS. 2007. The binding of CCL2 to the surface of *Trypanosoma cruzi* induces chemo-attraction and morphogenesis. *Microb. Infect.* 111-118.
117. Hardison JL., Kuziel, WA., Manning, JE., and Lane TE. 2006. Chemokine CC Receptor 2 is important for acute control of cardiac parasitism but does not contribute to cardiac inflammation after infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 193: 1584-1588.
118. Gomes J.A.S., Bahia-Oliveira, LMG., Rocha, MOC., Busek, SCU., Teixeira, MM., Silva, JS., and Oliveira-Correa, R. 2005. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas disease correlates with morbidity in Chagas patients. *Infect. Immun.* 73: 7960-7966.
119. Machado F.S, Koyama, N.S, Carregaro, V, Ferreira, B.R, Milanezi, C.M, Teixeira, M.M, Rossi, M.A, Silva, J.S. 2005. CCR5 Plays a Critical Role in the Development of Myocarditis and Host Protection in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 191(4):627-36.
120. Hardison JL., Wrightsman, RA., Carpenter, PM., Kuziel, WA., Lane, TE., and Manning JE. 2006. The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 74: 135-143.
121. Dolcini G.L., Solana M. E., Andreani G., Celentano A. M., Parodi L.M., Donato A.M., Elissondo N., González Cappa S.M., Giavedoni L.D. and Peralta Martínez L. 2008. *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease agent) reduces HIV-1 replication in human placenta. *Retrovirology.* 5 (53): 1-13

122. Machado F.S, Koyama, N.S, Carregaro, V, Ferreira, B.R, Milanezi, C.M, Teixeira, M.M, Rossi, M.A, Silva, J.S. 2005. CCR5 Plays a Critical Role in the Development of Myocarditis and Host Protection in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 191(4):627-636.

123. Talvani A., Ribeiro, C. S., Aliberti, J. C., Michailowsky, V., Santos P.V., Murta, S.F., Romanha, A.J., Almeida, I. C., Farber, J., Vieira, J-L., Silva, J.S. and Gazzinelli, R.T. 2000. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous INF-g as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microb. Infect.* 851-866.

124. Machado F. S., Martins, G. A., Aliberti, J. C., Mestriner, B. S., Cunha, F.Q. and Silva, J. S. 2000. *Trypanosoma cruzi*- Infected Cardiomyocytes Produce Chemokine and cytokines That Potent Nitric Oxide- Dependent Trypanocidal Activity. *Circulation.* 102: 3003-3008.

125. Machado F.S, Souto J.T, Rossi M.A, Esper L, Tanowitz H.B, Aliberti J, Silva J.S. 2008. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. *Microb. Infect.* 10: 1558-1566.

126. Savino W., Villa-Verde S.M., Mendes da Cruz A. D., Silva-Monteiro E., Perez R.A., Auki M.P., Bottasso, O., Guiñazu N., Barbosa-Silva. S.D., Gea, S. 2007. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cyto .Gro. Fact. Rev.* 18:107–124.

127. Souto-Padron T, Campetella O.E., Cazzulo J.J and De Souza W. 1990. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J. Cell Sci.* 96: 485-490

128. Cazzulo J. J., Stoka, V. and Turk, V. 1997. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Chem.* 378: 1-10.

129. Mottram J. C., Brooks, D. R. and Coombs, G. H. 1998. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 455-460.
130. Gillmor S. A. Craik, C. S. and Fletterick, R. J. 1997. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. *Prot. Sci.* 6: 1603-1611.
131. McGrath M.E., Eakin, A. E., Engel, J. C., McKerrow, J. H., Craik, C. S. and Fletterick, R. J. 1995. The Crystal Structure of Cruzain: A Therapeutic Target for Chagas' Disease. *J. Mol. Biol.* 247: 251-259.
132. Ascenzi P, Salvati, L. M Bolognesi, Colasanti M., Polticelli F. and Venturini G. 2001. Inhibition of Cysteine Protease Activity by NO-donors. *Cur. Prot. Pep. Sci.* 2: 137-153.
133. Cleland W.W. 1979. Substrate inhibition. *Meth. Enzymol.* 63: 500-513
134. Monteiro ACS., Abrahamson, M., Lima APCA., Vannier-Santos, MA., Scharfstein, J. 2001. Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell. Sci.* 114: 3933-3942
135. Salmon D., Do Aido-Machado, R., Dile, A., Leidert, M., Schmetzer, O., Lima, APCA., Scharfstein J., Oschkinat, H., and Pires, JR. 2006. Solution structure and backbone dynamics of the *Trypanosoma cruzi* cysteine protease inhibitor chagasin. *J.Mol. Biol.* 357: 1511-1521.
136. Duschak G.V., Ciaccio M., Nassert JR., Basombrio MA. 2001. Enzymatic activity, protein expression, and gene sequence of cruzipain in virulent and attenuated *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.* 87 (5): 1016-1022.

137. Serveau C., Lalmanach G., Juliano MA., Scharfstein J., Juliano L. and Gauthier F. 1996. Investigation of the substrate specificity of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, through the use of cystatin-derived substrates and inhibitors. *J. Biochem.* 313: 951- 956
138. Del Nery E., Juliano, MA., Meldal, M., Svendsen, I., Scharfstein J., Walmsley, A., and Juliano L. 1997. Characterization of the substrate specificity of the major cystein protease (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* using a portion-mixing combinatorial library and fluorogenic peptides. *J. Biochem.* 323: 427-433.
139. Wagner A. S. J, Cezari M.H.S., Lima A.P.C. A., Scharfstein J., Chagas J.R., Tersariol I. L. S., Juliano M. A. and Juliano L. 2001. Comparison of the specificity, stability and individual rate constants with respective activation parameters for the peptidase activity of cruzipain and its recombinant form, cruzain, from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 268: 6578–6586
140. Sterin-Borda L., Giordengo L., Joensen, L., and Gea S. 2003. Cruzipain induces autoantibodies against cardiac muscarinic acetylcholine receptors. Functional pathological implications. *Eur. J.Immunol.* 33: 2459-2468.
141. Duschak VG., Riarte, A., Segura, EL., Laucella, SA. 2001. Humoral immune response to cruzipain and cardiac dysfunction in chronic Chagas disease. *Immunol. Lett.* 78: 135-142.
142. Arnholdt ACV., Piuvezam, MR., Russo, DM., Lima, APC., Pedrosa, RC., Reed, SG., and Scharfstein J. 1993. Analysis and partial epitope mapping of human T cell responses to *Trypanosoma cruzi* cysteinyl proteinase. *J. Immunol.* 151: 3171-3179.
143. Schnapp AR., Eickhoff, CS., Sizemore, D., Curtis III, R., and Hoft DF. 2002. Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Infect. Immun.* 9: 5065- 5074.

144. Berasain P, Carmona C, Frangione B, Cazzulo J.J, Goñi F. 2003. Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130: 23–29.
145. Adam S. H, Thor G. T, Hviid L, Saleh H, Hazrait M, Kemp M and Kharazmi A.1994. The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T-cells. *J. Immunol.* 152: 4542- 4548.
146. Buxbaum U.L., Denise H, Coombs H.G, Alexander, J. Mottram, J.C., and Scott, P. 2003. Cysteine Protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. *J. Immunol.* 171: 3711-3717.
147. De Souza L.S, Lang T, Prima. R, Hellio R. and Antoine J.C. 1995. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J. Cell. Sci.* 108:3219.
148. Schulz O, Sewell H.F. and Shakib F. 1998. Proteolytic cleavage of CD25, the subunit of the human T cell interleukine 2 receptor by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J. Exp. Med.* 187: 271.
149. Cameron P, McGachy A, Anderson M, Andrew P, Coombs H.G, Mottram J.C, Alexander J and Plevin R. 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania maxicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NFkB signaling pathway. *J. Immunol.* 173: 3297-3304.
150. Kelsal B. L. and Ravdin J.I. 1993. Degradation of human immunoglobulin A by *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 168: 1319-1322.

151. Tran V.Q, Herdman D.S, Torian B.E. and Reed S.L. 1998. The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. *J. Infect Dis.* 177: 508-511.
152. Reed S.L, Ember J.A, Herdman D.S, DiScipio R.G, Hugli T.E, Gigli I. 1995. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J. Immunol.* 155(1):266-74.
153. Que X, Kim S.H, Sajid M, Eckmann L, Dinarello C. A, Mckerrow J. H. and Reed S. L. 2003. A surface amebic cysteine proteinase inactivates Interleukine-18. *Infect. Immun.* 71(3): 1274-1280.
154. Pertuz S, Ostoa P, Benitez I, Soldevilla G, Olivos A. and Garcia E. 2004. *Entamoeba histolytica* cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leukocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Par. Immunol.* 26, 237–241.
155. Sztejn M.B, Cuna W. R and Kierszenbaum F. 1990. *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8 and IL-2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. *J. Immunol.* 144: 3558.
156. Kierszenbaum F, Cuna W. R, Beltz L. A. and Sztejn M.B. 1990. A secretion product (s) of *Trypanosoma cruzi* that inhibit proliferation and IL-2 Receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* 144: 4000-4004.
157. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. 2000. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood.* 96(8):2673-81.

158. Berahovich RD, Miao Z, Wang Y, Premack B, Howard MC, Schall TJ. 2005. Proteolytic activation of alternative CCR1 ligands in inflammation. *J. Immunol.* 174(11): 7341-51.
159. Delgado M.B., Clark-Lewis I, Loetscher P., Langen H., Thelen M., Baggiolini M., Wolf M. 2001. Rapid inactivation of stromal cell factor-1 by cathepsin G associated with lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 31 (3): 699-707
160. McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood.* 100(4): 1160-7.
161. McQuibban G.A., Gong J.H., Tam E.M., McCulloch C.A., Clark-Lewis I, Overall C.M. 2000. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science.* 289 (5482): 1202-1206.
162. Wolf M, Clark-Lewis I, Buri C, Langen H, Lis M, Mazzucchelli L. 2003. Cathepsin D specifically cleaves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha, macrophage inflammatory protein-1 beta, and SLC that are expressed in human breast cancer. *Am. J. Pathol.* 162(4): 1183-90.
163. Dean R.A., Cox J. H., Bellac C. L., Doucet A., Starr A. E. and Overall C. M. 2008. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR + CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood.* 112: 3455-3464.
164. Labriola C, Sousa M, Cazzulo JJ. 1993. Purification of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* by affinity chromatography. *Biol. Res.* 26(1-2):101-7.

165. La Fleur A. M., Lukacs N. W., Kunkel S. L. and Matsukawa A. 2004. Role of CC chemokine CCL6/C10 as a monocyte chemoattractant in a murine acute peritonitis. *Med. Inflamm.* 13: 349-355
166. Parsons S. A., Mewburn J. D., Truesdel P. and Greer P. A. 2007. The Fps/Fes kinase regulates leucocyte recruitment and extravasation during inflammation. *Immunology.* 1365-2567.
167. Montesinos M C., Desai A. and Cronstein, B. N. 2006. Suppression of inflammation by low-dose methotrexate is mediated by adenosine A2A receptor but not A3 receptor activation in thioglycollate-induced peritonitis. *Arthr. Res. Ther.* 8(53): 1186-1914.
168. Guzmán-Bracho C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends Parasitol.* 17(8): 372-376.
169. Beucher M., Meira W.S.F., Zegarra V, Galvao L. M.C., Chiari E., Norrissa K. A. 2003. Expression and purification of functional, recombinant *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein. *Prot. Expr. Pur.* 27: 19–26
170. Bosseno M.F., Barnabé C., Magallón Gastélum E., Lozano Kasten F., Ramsey J., Espinoza B. and Brenière S.F. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 40(2): 627-632
171. Espinoza B., Vera-Cruz J. M., Gonzalez H., Ortega E., and Hernandez R. 1998. Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Trop.* 15:63–72.
172. Culley F.J., Brown A., Conroy D. M., Sabroe I., Pritchard D. I and Williams T. J. 2000. Eotaxin Is Specifically Cleaved by Hookworm Metalloproteases Preventing Its Action In Vitro and In Vivo. *J. Immunol.* 165: 6447–6453.

173. Lannes-Vieira J., Coutinho Silverio J., Resende Pereira I., Ferreira Vinagre N., Marcelo Espinola Carvalho C., Neto Paiva C., Alice da Silva A. 2009. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors - how to make a dream come true. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.104(1): 226-235.

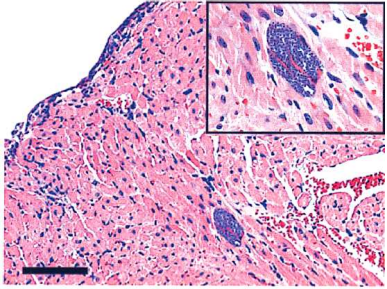
174. Marinho C. R. F., Bucci D. Z., Dagli M.L. Z., Bastos K. R. B, Grisotto M. G., Sardinha L. R., Baptista C. R. G. M., Goncalves C. P., D'Imperio Lima M. R. and Alvarez J. M. 2004. Pathology Affects Different Organs in Two Mouse Strains Chronically Infected by a *Trypanosoma cruzi* Clone: a Model for Genetic Studies of Chagas' Disease. *Infect. Immun.* 72 (4): 2350–2357.

175. Martins G. A., Campanelli A. P., Silva R. B., Tadokoro C. E., Russo M., Cunha F. Q., Rizzo L. V. and Silva J. S. 2004. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Micr. Infect.* 6:1133–1144.

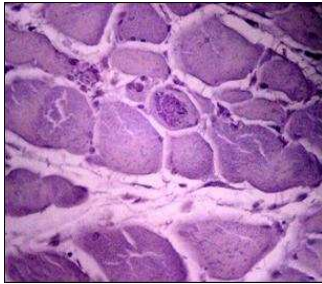
15. ANEXOS

Anexo 1.

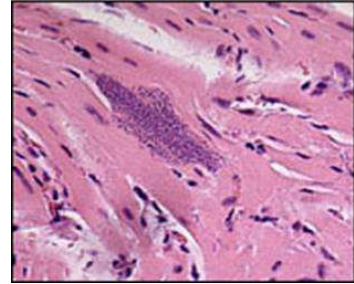
Figuras Suplementarias



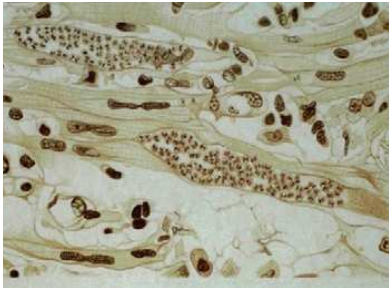
(174)



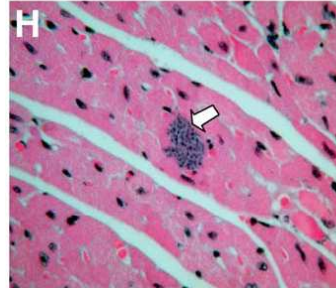
(I. B.H)



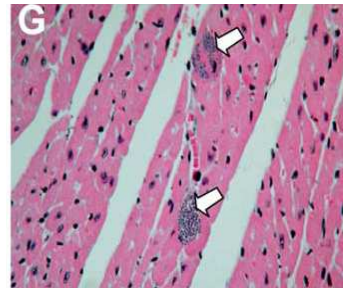
(I. B.H)



(173)



(175)



(175)

IBH: Modelo murino de infección con *Trypanosoma cruzi* aislado Querétaro desarrollado por Itzel Benítez Hernández.



ELSEVIER

Immunobiology ■ (■■■■) ■■■-■■■

Immunobiology

www.elsevier.de/imbio

Proteolytic cleavage of chemokines by *Trypanosoma cruzi*'s cruzipain inhibits chemokine functions by promoting the generation of antagonists

I. Benítez-Hernández^a, E. Méndez-Enríquez^a, P. Ostoa^a, T. Fortoul^b, J.A. Ramírez^c, C. Stempin^d, F. Cerbán^d, G. Soldevila^a, E.A. García-Zepeda^{a,*}

^aDepartamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. CP. 04510, México

^bDepartamento de Biología Celular y Tisular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

^cDepartamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

^dDepartamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

Received 9 May 2009; received in revised form 4 June 2009; accepted 8 June 2009

Abstract

Chagas disease is a chronic inflammatory disease caused by infection with *Trypanosoma cruzi*. Although it had a decline in recent years, it still affects millions of people in Latin America. The host immune response against this parasite is complex and relies on the development of an efficient T cell-mediated response; however, *T. cruzi* displays a number of evasion mechanisms allowing it to remain undetected even for years. One of these is the secretion of anti-inflammatory molecules such as proteases and the modulation of biological functions of chemokines. Our objective was to analyze the effect of a major cysteine protease, cruzipain, on a number of critical functions of several CC chemokines, both *in vitro* and *in vivo*. Initially, using a murine model of *T. cruzi* infection, we demonstrated that CCL-2 and CCL-12 chemokines are highly expressed at different stages and correlated with an increase in the expression of cruzipain. In addition, we demonstrated that cruzipain is capable of differentially cleaving CCL-2 and CCL-12 chemokines, as well as CCL-13. Analysis of the proteolysed products identified unique cleavage sites in these chemokines. These cruzipain-modified chemokine products were tested in chemotaxis assays using monocytic cells. We found that cruzipain treated-CCL-2 maintained its biological activity, in contrast to the closely related CCL-12 and CCL-13 chemokines, which showed little or null agonist activity after treatment. Furthermore, based on this analysis, a 14-mer cruzipain-derived chemokine peptide (CDCP-1) was chemically synthesized and tested for agonist activity using *in vitro* chemotaxis assays. Interestingly, CDCP-1 showed antagonist activity affecting *in vitro* migration of monocytic cells and calcium flux release. In conclusion, our results demonstrate that cruzipain modulates biological functions of chemokines through proteolytic cleavage, by generating chemokine-derived peptides with antagonist activities. This event could play a role during the latest phases of Chagas disease, when the parasite may differentially modulate chemokine-mediated inflammatory responses.

© 2009 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Chagas disease; Inflammation; Chemokines; Antagonist; Cruzipain

*Corresponding author. Tel.: +52 5 56 22 38 90; fax: +52 5 56 22 33 69.

E-mail addresses: garciaze@servidor.unam.mx, garciaze@biomedicas.unam.mx (E.A. García-Zepeda).

Introduction

Trypanosoma cruzi is the intracellular protozoan parasite that affects Latin American countries causing Chagas disease. Recent estimates indicate an overall prevalence of approximately 9.8 million people (Hotez et al. 2008). This disease is one of the leading causes of cardiomyopathy and heart failure in endemic regions (Marin-Neto et al. 2007), and has recently re-emerged as an opportunistic infection in AIDS patients (Cordova et al. 2008; Rivera et al. 2004). *T. cruzi* is transmitted by a blood-feeding triatomine insect vector, although blood transfusion and organ transplantation can also occur (Moncayo and Ortiz Yanine 2006).

Chagas disease is characterized by the development of an acute phase displaying high parasitaemia and a variable clinical course, also featuring an intermediate and a chronic phase ranging from asymptomatic to severe cardiac disease. It is known that 30% of the individuals that have had a previous contact with the parasite develop eventually the chronic phase of the disease (Barrett et al. 2003).

The immune response in Chagas disease is characterized by a process that involves a protective humoral response and a vigorous T-cell-mediated inflammatory response, in which T cells are reactive to soluble and membrane-associated antigens but can also be cross-reactive to self-antigens, developing autoimmunity in the chronic stage of the disease (Kierszenbaum 1999; Girones et al. 2005).

However, there is also controversy about the specific role of the immune response during Chagas disease, since it has been associated with both protection and host damage or pathogenesis (Andrade and Andrews 2005). The initial innate immune response is characterized by recognition of GPI by TLR-2 (Campos and Gazzinelli 2004), TLR-4 (Medeiros et al. 2007), and TLR-9 (Bafica et al. 2006). This recognition uses both MyD88- and TRIF-dependent activation pathways in macrophages and dendritic cells. Additionally, polymorphonuclear cells can take up the intracellular form of *T. cruzi* and kill the parasite by their myeloperoxidase activity and hydrogen peroxide (H₂O₂) production. A key event in this early stage of infection is macrophage activation, where IFN- γ produced by NK cells, promote their activation allowing nitric oxide production and trypanocidal activity (Silva et al. 2003). At this stage, concerted action of chemokines and cytokines have a role in regulating the recruitment and activation of leukocytes that might display specific anti-parasite functions (Teixeira et al. 2002; Savino et al. 2007). Adaptive immune responses are linked to effective CD8⁺ T cell responses. In this context, it has been reported a potential protective role for these CD8⁺ T cells with either a CD44^{high}CD62L^{low} effector-like phenotype or a CD127^{low} memory phenotype in

experimental infection (Martin and Tarleton 2004, 2005; Bixby and Tarleton 2008).

During the invasion process, *T. cruzi* releases a number of molecules with different biological properties, including proteases. One of these is cruzipain, the major proteinase of the parasite, which is expressed differentially as a complex mixture of isoforms in all the developmental stages of the cycle. Cruzipain is a highly mannosylated cysteine protease of about 47–60 kDa, which may play an important role in several pathological processes associated to host cell invasion (Aparicio et al. 2004), immune evasion and autoimmunity (Tarleton 2003; Girones et al. 2005). Cruzipain participates in promoting macrophage infection during the first steps of parasite-macrophage recognition, as demonstrated by the use of anti-cruzipain antibodies and protease inhibitors (Souto-Padron et al. 1990). Furthermore, it is also regarded as a highly immunogenic protein, since immunization with cruzipain induces protective immunity against parasite challenge (Schnapp et al. 2002). Interestingly, this adaptive response observed in murine models, is strain-dependent. C57BL/6 mice have an IFN- γ -mediated Th1 response whereas the immunization of BALB/c mice triggers a Th2 response (Guinazu et al. 2004). In addition, cruzipain could be used as a disease marker, since it has been identified in sera of Chagasic patients (Martinez et al. 1991; Fonseca et al. 2005). Thus, all these characteristics indicate that cruzipain might be a good candidate for therapeutic use (Olliaro et al. 2002; Urbina 2002).

There is no information about how parasite-derived proteases could be modulating the biological activity of chemokines at the different phases of *T. cruzi* infection. The main objective of this study was to further explore the role of cruzipain on the modulation of the biological activities mediated by three closely related CC chemokines, CCL-2, CCL-12 and CCL-13. These chemokines have not been thoroughly studied in Chagas disease. Here, we present data showing that cruzipain is capable of modifying the biological functions of chemokines through proteolytic cleavage. The resulting modified chemokines or their proteolysed peptides might interfere with leukocyte recruitment during *in vivo* infection, revealing a novel mechanism of evasion of the immune response employed by *T. cruzi*.

Materials and methods

Parasites and reagents

A *T. cruzi* Querétaro strain was propagated in monolayers of Vero cells in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco BRL-Life Technologies,

Rockville, MD, USA) supplemented with 10% of inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL-Life Technologies, Rockville, MD, USA) and infective trypanomastigotes were isolated as described (Tardieux et al. 1994; Fernandez-Presas et al. 2001). Unless otherwise indicated, all reagents were purchased from Sigma (Sigma Chemical, S.L., MO, USA). Recombinant human and murine chemokines were obtained from Peptotech, Inc. (Rocky Hill, NJ, USA).

Murine model of *Trypanosoma cruzi* infection

Groups of 4–6 Balb/c AnN female mice (6–8 weeks old) were obtained from our animal facilities (IIB, UNAM) and maintained under pathogen-free conditions. Mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 10^3 blood-form trypanomastigotes. Infected and controls (non-infected) mice were sacrificed at 15, 30 and 60 days post-infection. Parasitemia was monitored every 3 days in blood from the tail of the infected animals. Parasite numbers were taken from analysis under light microscope. Animal experiments were performed according to the Guidelines from our Institutional Animal Care and BioSafety Committee.

Cell lines

The human monocytic cell line THP-1 (ATCC TIB-202) was cultured in RPMI media (GIBCO-Life Technologies, Rockville, MD, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, sodium pyruvate, non-essential amino acids, and penicillin/streptomycin (GIBCO-Life Technologies, Rockville, MD, USA).

Immunohistochemical analysis

Heart and skeletal muscle tissues were obtained from both infected and non-infected animals. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues were processed for immunohistochemical analysis to identify cruzipain, CCL-12 and CCL-2 chemokines. To detect cruzipain expression, a polyclonal rabbit anti-cruzipain antibody was generated using purified protein. Chemokines were identified using a polyclonal rabbit anti-CCL-12 and goat anti-CCL-2 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP and rabbit anti-goat IgG (H+L)-HRP (Zymed, Carlsbad, CA, USA) were used as secondary antibodies. Di-amino-benzidine (Sigma Chemical, S.L., MO, USA) peroxidase substrate was used as a chromogen accordingly to manufacturer's conditions. Cells were quantified by morphometrical analysis of four sections from each animal ($40\times$ magnification). The mean values were calculated at the different time points of the infection.

Cruzipain purification and enzymatic activity determination

Cruzipain was purified by affinity chromatography using ConA-Sepharose as previously described (Labriola et al. 1993). Analysis of the purified cruzipain (50–100 $\mu\text{g/ml}$) was performed by a 10% SDS-PAGE (Laemmli 1970) electrophoresis and silver staining. Protease activity was carried out on a 10% SDS-PAGE gel co-polymerized with 0.1% (w/v) gelatin. After electrophoresis, gels were washed with 25% isopropanol in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.9) to remove SDS (Hou and Lin 1998) and incubated, under shaking conditions, in a solution of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.9) overnight. After incubation, a clear proteolysis in the gel was observed after Coomassie brilliant blue R-250 (BioRad, Hercules, CA, USA) staining. Additionally, the enzymatic activity of cruzipain was determined using a synthetic chromogenic substrate, Bz-Pro-Phe-Arg-pNA, as previously reported (Cazzulo et al. 1996). The reaction was analyzed by spectrophotometry at 410 nm. The cysteine protease papain was used as positive control and E-64 [L-trans-epoxy-succinyl-leucyl-amido (4-guanidino) butane] was used as inhibitor of cysteine proteases (1 μM).

In vitro cleavage of chemokines

To identify the *in vitro* effect of cruzipain on chemokines, pre-activated cruzipain (0.01–1 μM) was incubated with different concentrations of CCL-2, CCL-12 and CCL-13 chemokines (ranging between 1 and 6.25 μM) at different time points (0 and 120 min). At the end of the incubation, the reaction was stopped by adding Laemmli's electrophoresis sample buffer to the mixture and heated to 90 °C for 5 min. Proteolysed chemokines (1–6.25 μM) were subjected to electrophoresis on a 16% SDS-PAGE under reducing conditions. After electrophoresis, gels were analyzed by silver staining (Pierce, Rockford, IL, USA). Pre-stained low molecular weight markers (4–120 kDa) were included (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Analysis of proteolysed chemokines by HPLC and mass spectrometry

Cruzipain-derived chemokine products were analyzed and purified by HPLC using a gradient system of 0–60% acetonitrile. An analytic C18 Vydac chromatographic column was used with a flux of 1.0 ml/min and monitored at 1230 nm. Selected fractions were dried in a SpeedVac (Savant Instruments, New York) and maintained at –20 °C until further analysis. Mass spectrometry analysis was performed at the Unidad de Proteómica (IBT, Cuernavaca, Mexico) using a

Finnigan LCQDuo ion trap mass spectrometer (Thermo Electron Co-Finnigan, San Jose, CA, USA) as described elsewhere (Batista et al. 2004).

Chemotaxis assay

Migration of THP-1 monocytic cells in response to chemoattractants and proteolysed chemokine products was performed using a modified Boyden's chamber (NeuroProbe, Inc., Cabin John, MD, USA) as described (Garcia-Zepeda et al. 1996b) with little modifications. Briefly, the upper chamber contained 1×10^6 cells/ml and the lower chamber contained the intact (58 nM) or proteolysed chemokine in Hank's balanced salt solution buffer (HBSS) (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA). Cells were labelled during 20 min at 37 °C with 0.5 μM calcein-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) before chemotaxis assays, washed and loaded into the chemotaxis chambers. Chemotaxis was allowed by incubation during 90 min at 37 °C. The number of migrating cells through a 5-μm pore polycarbonate filter was quantified using a Molecular Imager FX (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Each experiment was performed by triplicate.

Chemotaxis inhibition assay

Inhibition of the chemotaxis assay by a cruzipain-derived chemokine peptide-1 (CDCP-1): ²⁴LKSY-VITTSRCPQK³⁸ (AnaSpec, San Jose, CA, USA) was performed on the monocytic cell line THP-1, as described above. Calcein-labelled monocytic cells were pre-incubated 15 min, at 4 °C, with different concentrations of peptide (1.4–11.2 nM) or CCL-13 (58 nM) as control, before assay. After incubation, cells were washed 2 × and exposed to CCL13 (58 nM) in a chemotaxis assay as described.

Calcium flux release assay

Effect of chemokines and peptides on intracellular calcium flux release was determined as described (Mendez-Enriquez et al. 2008). In brief, cells (1×10^7 /ml) were loaded with a solution containing 6 μg/ml Fura-Red (Molecular Probes), 10 μg/ml Fluo-3 (Molecular Probes), and 0.1% pluronic acid (Molecular Probes), in RPMI/2% fetal calf serum (FCS) media for 45 min at 37 °C, in the dark. After incubation, cells were centrifuged, washed twice with RPMI/ 2% FCS, adjusted to 1×10^6 cells/ml and kept at 4 °C. Analysis was performed using a FACScan cytometer (Becton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) using the FACS Assistant software (Becton and Dickinson). Changes of cytosolic-free calcium were monitored after addition of peptide (28.6 nM) or chemokines (58–60 nM). Fluo-3

and Fura Red were excited at 488 nm with Fluo-3 emission detected at 515–535 nm and Fura Red emission detected at 665–685 nm. The data is presented as the relative ratio of fluorescence of Fluo3/Fura Red.

Statistical analysis

The Student's *t*-test was used to analyze the statistical significance of the differences observed in the chemotaxis assays. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. An ANOVA one-way with Tukey's test for multiple comparisons was used to determine morphometrical differences between samples ($p < 0.05$).

Results

Analysis of chemokine expression in a murine model of chagas disease

We have developed a murine model of infection with a *T. cruzi* Querétaro strain in Balb/c mice. In our model, we have observed a typical inflammatory immune response in several tissues, characterized by the presence of mononuclear cells. In this study, we were interested in analyzing the expression of two members of the CCL/MCP chemokine subfamily, CCL-2 and CCL-12, and investigated a possible correlation with the levels of expression of cruzipain in the heart and skeletal tissues. We focused our analysis at 15, 30 and 60 days post-infection (p.i.). By immunohistochemistry, we observed increased expression levels of CCL-12 (Fig. 1A, panels e and f), CCL-2 (Fig. 1A, panels i–k) and cruzipain (Fig. 1A, panels m and n) in skeletal tissues of infected mice compared to non-infected (NI) controls (Fig. 1A, panels h, l and p). Expression of these chemokines correlated with the presence of a mononuclear cell infiltrate in the tissue as determined by H&E (Fig. 1A, panels a–c) and quantified by morphometrical analysis (Fig. 1B). By day 60 p.i., the mononuclear infiltrate decreased (Fig. 1A, panel c), and correlated with a decrease also in the expression of CCL-2 and CCL-12 chemokines and cruzipain (Fig. 1A, panels g, k and o). Analysis of cardiac tissue of infected animals at 15 and 30 days post-infection (p.i.) revealed strong expression of CCL-12 (Fig. 2A, panels e and f), CCL-2 (Fig. 2A, panels i–k) and cruzipain (Fig. 2A, panels m and n). This data correlated also with an increase in the presence of a mononuclear infiltrate in the tissue (Fig. 2B). Interestingly, by day 60 p.i., the expression of CCL-12 (Fig. 2A, panel g) and cruzipain (Fig. 2A, panel o) decreased but not that of CCL-2 (Fig. 2A, panel k), correlating with the observation of a reduction in the number of infiltrating mononuclear cells (Fig. 2B).

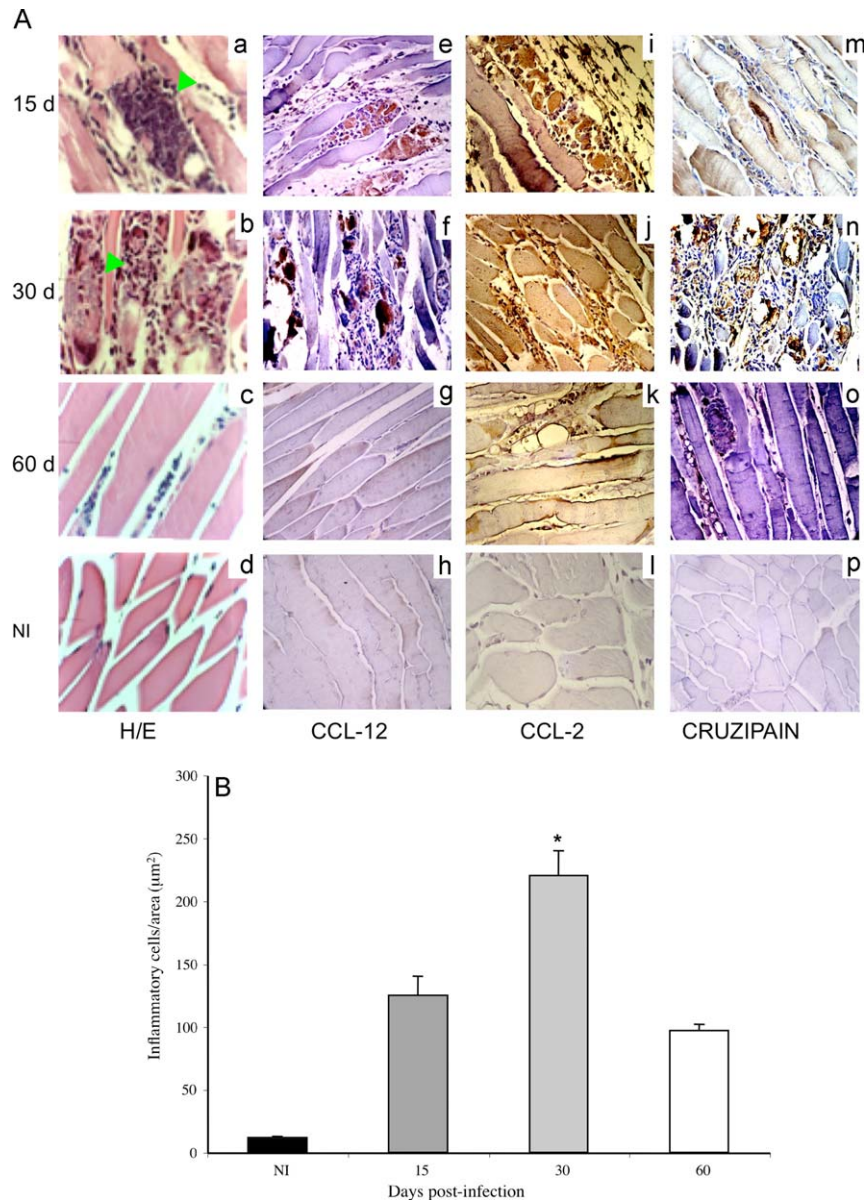


Fig. 1. Effect of *Trypanosoma cruzi* infection on the expression of CC chemokines and cruzipain in skeletal murine tissue: (A) histochemical analysis of chemokine and cruzipain expression in skeletal-infected murine tissue. (a–d) Representative haematoxylin/eosin (H/E) tissue staining at 15, 30 and 60 days post-infection (p.i.). Head arrows indicate presence of an amastigote nest (15 days) and destruction of the nest (30 days). (e–h) Immunohistochemical analysis of CCL-12 expression. (i–l) Analysis of CCL-2 expression. (m–p) Cruzipain expression. NI: A representative non-infected tissue section. (B) Morphometrical analysis of the inflammatory cells observed in infected skeletal tissue at 15, 30 and 60 days p.i. Cell infiltrate area (mm^2) from selected areas is shown in the histograms and analyzed as described in Methods. A representative experiment is shown ($n = 6$), $*p < 0.001$.

Purification and characterization of cruzipain

Cruzipain was obtained using Con-A Sepharose affinity chromatography. Purity was analyzed by SDS-PAGE electrophoresis as it is shown in Fig. 3A. The purified protease (panel a) has a molecular mass of 57 kDa, although a lower molecular weight protein is also observed of approximately 51 kDa. Cruzipain represent a complex of several isoforms

with high proteolytic activity on co-polymerized gelatin gels as shown in (panel b). Protease activity was also analyzed by using a specific chromogenic peptide substrate Bz-Pro-Phe-Arg-pNA and determined by a colorimetric assay. Purified cruzipain was capable to hydrolyse the synthetic peptide comparatively to papain control. A specific cysteine protease inhibitor (E-64) inhibited its enzymatic activity up to 80% (Fig. 3B).

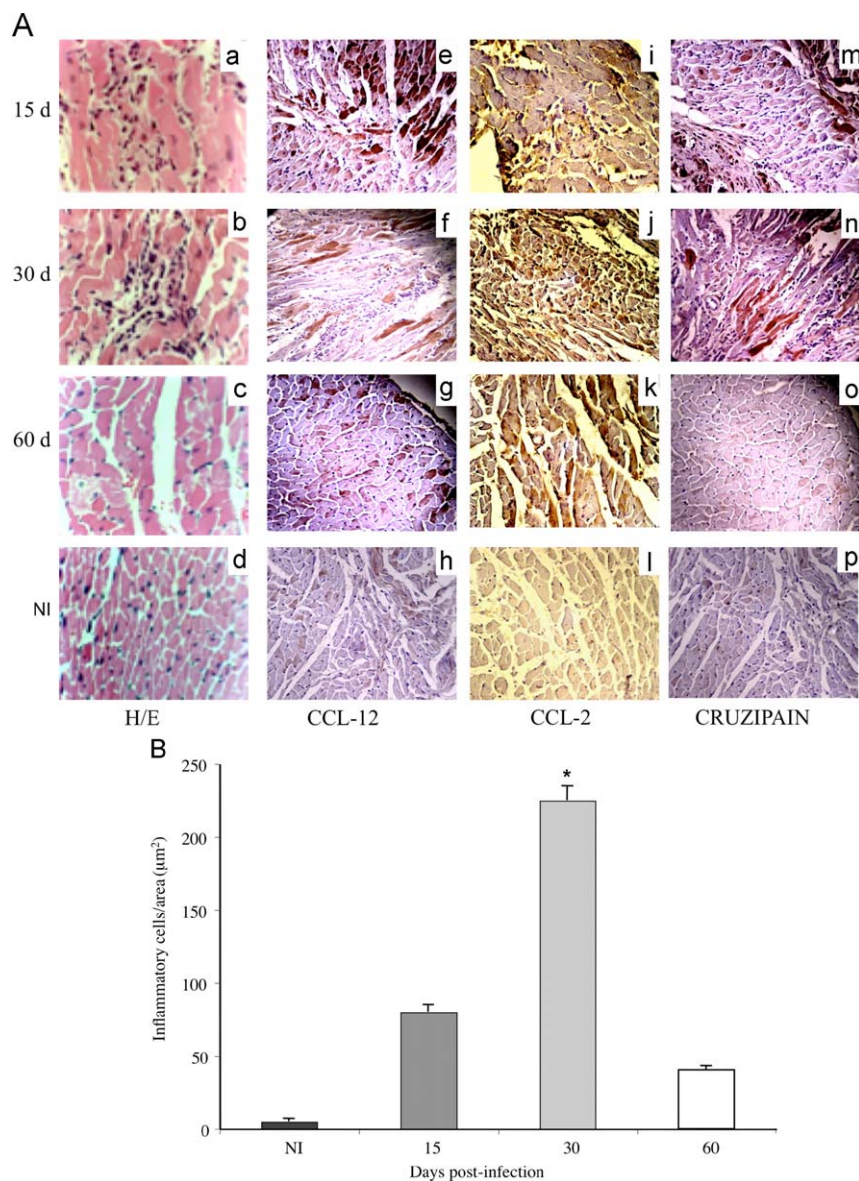


Fig. 2. Analysis of the expression of CC chemokines and cruzipain in cardiac tissue from *Trypanosoma cruzi*-infected mice. (A) Histochemical analysis of chemokine and cruzipain expression in cardiac tissue. (a–d) Haematoxylin/eosin (H/E) tissue staining at 15, 30 and 60 days post-infection (pi). (e–h) Immunohistochemical analysis of CCL-12 expression. (i–l) CCL-2. (m–p) Cruzipain expression. NI: A representative non-infected tissue section. (B) Quantitative analysis of the recruited inflammatory cells in the infected tissues at 15, 30 and 60 days. Cell infiltrate area (mm²) from selected areas is shown in the histograms and analysed as described in Methods. A representative experiment is shown ($n = 6$), * $p < 0.005$.

Cruzipain-mediated cleavage of chemokines and identification of chemokine-derived proteolytic products

To determine if the chemokines expressed in the tissues from *T. cruzi*-infected mice were substrates of cruzipain, we incubated chemokines (1–6.25 µM) with purified (Fig. 3A) and active (Fig. 3B) cruzipain (0.1–1 µM) in the presence or absence of the protease inhibitor E64, as described in Methods. After 2 h incubation, the products were analyzed by SDS-PAGE,

separated by HPLC and sequenced by mass spectrometry. As it is shown in Fig. 4A, cleavage of murine CCL-12, resulted in the generation of a number of low molecular weight peptides ranging between 8 and 4 kDa (lane 3) compared to untreated CCL-12 (lane 2). Addition of E-64 inhibited most of the cruzipain activity (lane 4). In contrast, we observed a different proteolytic pattern when murine recombinant CCL-2 (Fig. 4B) or human recombinant CCL-13 (Fig. 4C) were tested under same conditions. In both cases, lower molecular weight peptides (ranging 1–5 kDa) were identified.

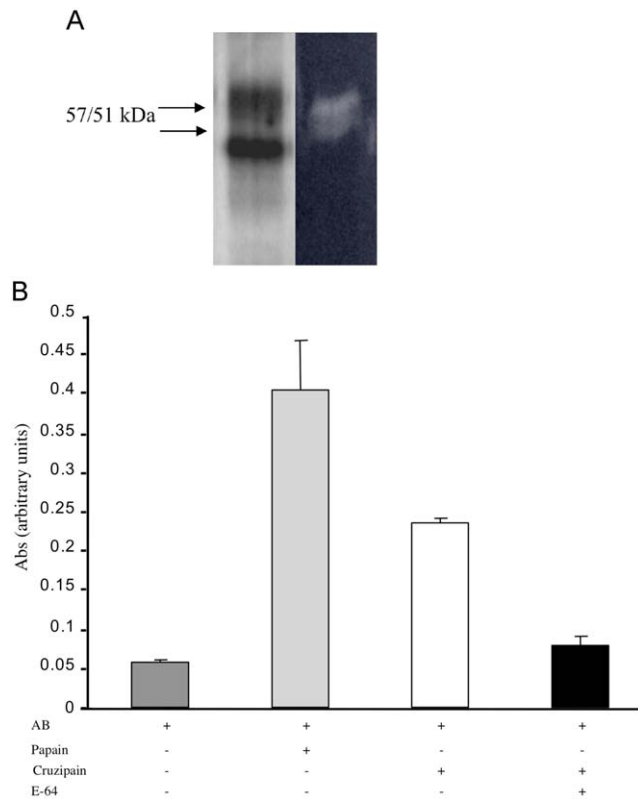


Fig. 3. Electrophoretic and functional analysis of Con-A purified cruzipain: (A) electrophoretic analysis of Con-A purified cruzipain. (a) Silver stain of a SDS-PAGE electrophoresis gel of the purified cruzipain. Molecular weight is shown on left. (b) Zymogram analysis of Con-A purified cruzipain. Co-polymerized gelatin assay showing cruzipain proteolytic activity as described in Methods. After separation by electrophoresis, the gelatin gel was stained with Coomassie Blue to visualize cysteine protease activity. (B) Analysis of cruzipain specific activity. To verify the functional activity of purified cruzipain, a quantitative assay based on the hydrolysis of the synthetic peptide *N*-Benzoyl-Pro-Phe-Arg-pNitroanilide was performed as described in Methods. Cruzipain activity was compared to papain. In addition, control activity of cruzipain was determined after addition of E-64 protease inhibitor (1 μ M).

After HPLC purification, sequencing of the low molecular proteolytic chemokine products was performed using electrospray ionization mass spectrometry. Deconvolution of the mass spectrometry data revealed that in CCL-2, the cruzipain scissile peptide bond was found between amino acid residues S_{14} - F_{15} , S_{33} - R_{34} , and S_{100} - E_{101} , whereas in murine CCL-12, amino acid residues K_{26} - S_{27} and F_{43} - R_{44} were found. In human CCL-13, amino acid residues R_{25} - L_{26} , K_{39} - A_{40} and Y_{63} - M_{64} were determined.

Functional analysis of cruzipain-mediated proteolysed chemokines

To evaluate the potential effect of cruzipain-mediated proteolysis on chemokine-mediated functions, we per-

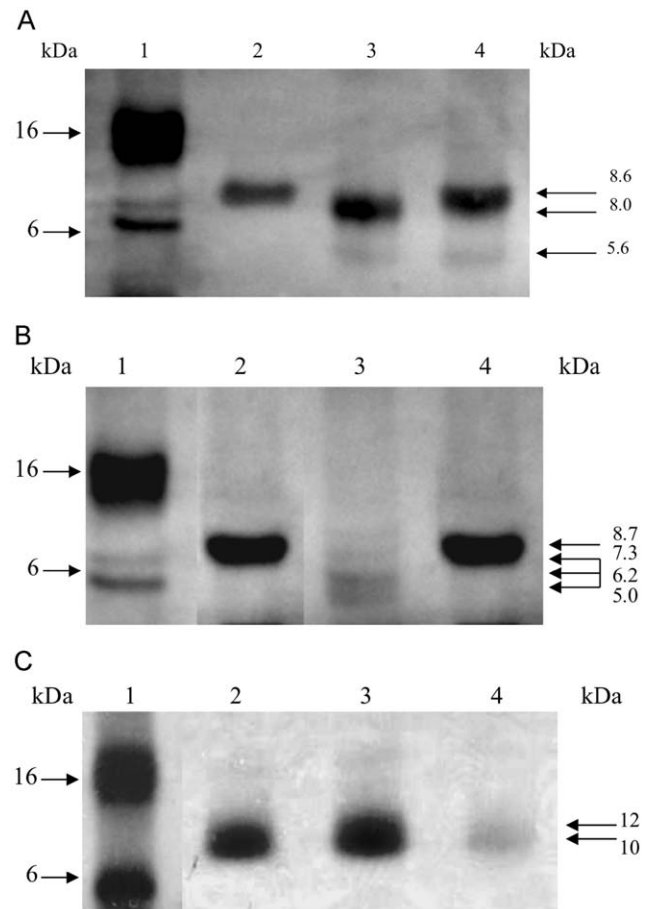


Fig. 4. Cruzipain has a proteolytic effect on CC chemokines: (A) electrophoretic analysis of the cruzipain-mediated proteolysis of chemokines. Cleavage of CCL-12 chemokine by cruzipain was performed as described in Methods. Pre-activated cruzipain (0.1 μ M) was incubated with chemokines (6.25 μ M) in activation buffer at 37 $^{\circ}$ C, for 120 min. Treated samples were separated by SDS-PAGE and proteolytic products were analyzed by silver staining. Lane 1: molecular weight markers (kDa). Lane 2: CCL-12. Lane 3: CCL-12 plus cruzipain. Lane 4: CCL-12 plus E-64-treated cruzipain. (B) Electrophoretic analysis of cruzipain-treated CCL-13. Lane 1: molecular weight markers (kDa). Lane 2: CCL-13, Lane 3: CCL-13 plus cruzipain, Lane 4: CCL-13 plus E64-treated cruzipain. A representative experiment ($n = 3$) is shown in the figure ($p > 0.001$). (C) Electrophoretic analysis of cruzipain-treated CCL-2 chemokine. Lane 1: Low molecular weight markers (kDa). Lane 2: CCL2. Lane 3: E64-treated cruzipain plus CCL-2. Lane 4: cruzipain-treated CCL-2. Arrows indicate low molecular weight peptides.

formed a chemotaxis assay using mononuclear cells, as described in Methods. First, our results showed that the chemotactic activity of cruzipain-treated CCL-12 was significantly reduced ($> 50\%$) compared to untreated controls (Fig. 5A). Addition of E-64 almost completely recovered its chemotactic function. We also analyzed the biological activity of cruzipain-treated CCL-13. As observed in Fig. 5B, cruzipain treatment significantly

reduced CCL-13-mediated chemotaxis of the THP-1 monocytic cell line (almost 75%), compared to untreated CCL-13. Chemotactic responses were recovered in presence of E-64. In contrast, cruzipain did not have an inhibitory effect on CCL-2-mediated chemotaxis. Instead, cruzipain treatment appeared to have a slightly increase in monocyte chemotaxis (Fig. 5C). These contrasting results might be related to differences in the amino acid sequences recognized by cruzipain on these chemokines. In fact, analysis by mass spectrometry

of cruzipain-derived chemokine products showed clear differences in their sequence. Thus, cruzipain may have preference for sequences including S-R/F in CCL-2 in contrast to K-/S/A or R-L/T sequences found in close-related CCL-12 and CCL-13 chemokines (Fig. 6). This recognition may also be influenced by accessibility or structural differences of chemokines.

Functional evaluation of cruzipain derived chemokine peptides (CDCPs)

Next, we decided to evaluate whether any of the peptides derived from the cruzipain-treated chemokines (CDCPs) may have any biological functions. First, we tested them in for either agonism or antagonism in monocytic chemotaxis assays. In Fig. 7A, we showed the results of using CDCP-1: 24 LKSYVITTSRCPQK 38 , a small molecular weight peptide (1.6 kDa) derived from CCL-13 proteolysis. In this figure, CDCP-1 significantly reduced CCL-13-mediated monocyte migration at different concentrations (1.4–11.2 nM). This effect was dose-dependent and comparable to the effect of pre-incubation with untreated CCL-13 (58 nM). To our knowledge, this is the first report on a cruzipain-treated chemokine-derived peptide with antagonist functions.

Additionally, we analyzed the effect of the CDCP-1 peptide (28.6 nM) on the modulation of intracellular calcium flux release induced by CC and CXC chemokines (Fig. 7B). Interestingly, our results showed inhibition of CCL-13-mediated calcium fluxes but not CCL-2 and CXCL-1, suggesting that CDCP-1 may be acting on specific CC chemokine receptors.

Discussion

Chagas disease remains a clinically important parasitic disease in Central and South America. Effective immune responses against *T. cruzi* infections rely on a

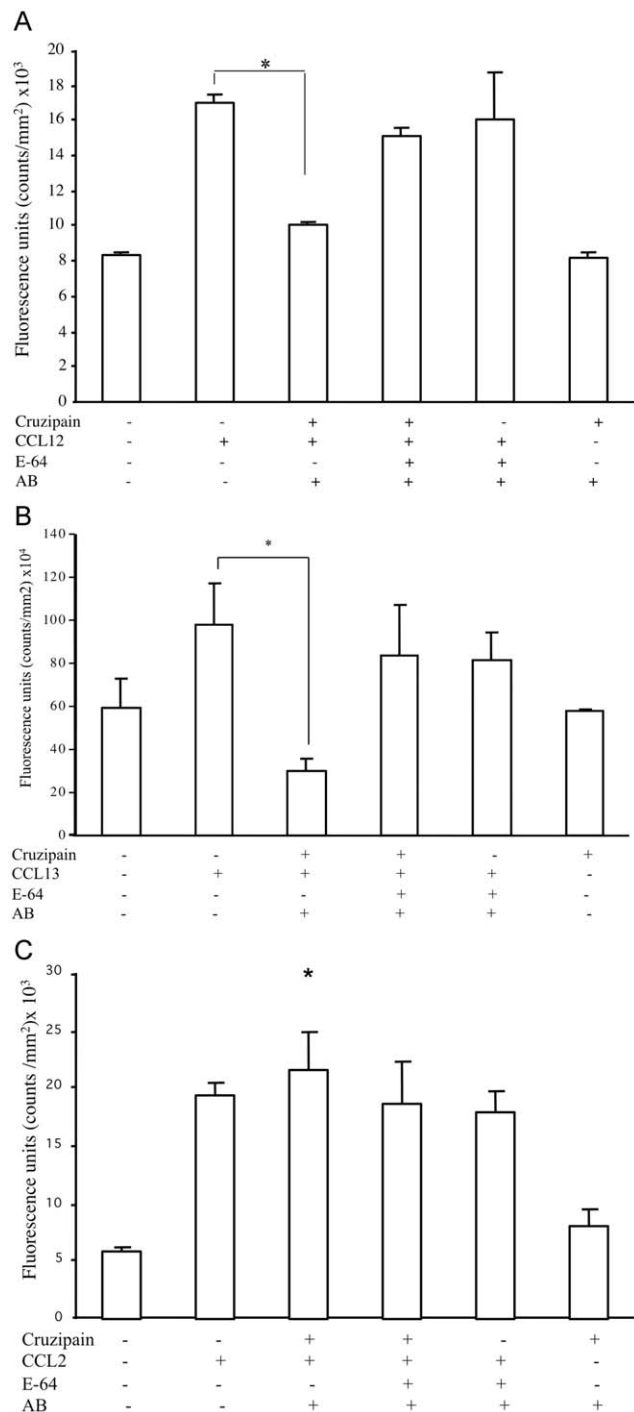


Fig. 5. Cruzipain affects chemokine-dependent migration on monocytes: (A) analysis of the chemoattractant activity of either untreated or cruzipain-treated CCL-12 chemokine. A significant inhibitory effect on THP-1 monocytes was observed with the proteolysed CCL-12; however, when cruzipain was treated with E-64 inhibitor (1 μ M), the chemotactic activity was recovered. A representative experiment (triplicates, $n = 3$) is shown in the figure ($*p = 0.05$). (B) Cell migration assays in response to cruzipain-treated CCL-13 and compared to untreated CCL-13 (58 nM). As a control, cruzipain (0.1 μ M) was pre-treated with E-64 inhibitor. A representative experiment ($n = 3$) is shown in the figure ($*p > 0.002$). (C) Chemotaxis assay of THP-1 monocyte cells using cruzipain-treated CCL-2, in presence or absence of E-64 inhibitor, as described above. A representative experiment ($n = 3$) is shown in the figure ($*p > 0.05$).



Fig. 6. Cruzipain-mediated proteolysis of CC chemokines generates low molecular weight peptides. After proteolysis, resulting chemokine products were separated by HPLC and sequenced by MS/LC as described in methods. This analysis determined that cleavage of CCL-12 generated peptides K26-S27 and R44-T45 as indicated by arrows. Mass spectrometry analysis of cruzipain-treated CCL-13-treated generated peptides: R24-L25, K38-A39 and Y62-M63. CCL-2-treated revealed the generation of peptides, S14-F15, T32-S33, S100-E101, respectively.

combination of innate and adaptative immune responses. Chemokines, acting in concert with cytokines, have an important role in regulating these immune responses. However, *T. cruzi* has evolved a series of mechanisms to evade this response and persist in the host. Some of these mechanisms include the release of molecules that induce T-cell suppression, inhibition of secretion of pro-inflammatory cytokines, modulation of expression of HLA and CD40-L, induction of host-cell apoptosis (Brodszynski et al. 2002; Zambrano-Villa et al. 2002; Lopes et al. 2007) and release of proteases, such as oligopeptidase B, and cysteine proteases like cruzipain (McKerrow et al. 2006; Scharfstein et al. 2008).

Cruzipain accounts for most of the major proteolytic activity of *T. cruzi*. It has been associated to the invasion process of host cells through the triggering of the kinin b2 receptor pathway (Aparicio et al. 2004; Scharfstein et al. 2000). In addition, cruzipain promotes an alternative activation of macrophages by increasing arginase I activity and reducing NO production, leading to enhanced *T. cruzi* survival. Tyrosine and MAP kinases have been implicated as key signalling components of this macrophage activation pathway, which may also be affected by cruzipain (Stempin et al. 2002, 2004). Furthermore, cruzipain may interact directly with the immune system by recognizing molecules such as immunoglobulins (Bontempi and Cazzulo 1990) and complement (Kipnis and da Silva 1989) as substrates. In this report we intended to study the specific role of cruzipain in modifying the biological functions of chemokines.

Recent evidence has shown a correlation between the increase in the expression of several CC and CXC chemokines and their receptors and the progression of *T. cruzi* infection, both in experimental models and in human disease. In this report, we analyzed first the infection of a susceptible mouse strain, Balb/c, with a little characterized Querétaro *T. cruzi* strain, and

evaluated chemokine expression in several tissues, in particular heart and skeletal muscle. This *T. cruzi* strain has been previously evaluated in a murine model of infection, showing some similarities with the human disease, such as increased levels of pro-inflammatory cytokines, and cardiac and tissue parasitism in the chronic phase of disease (Monteón and Reyes Lopez, 1989; Reyes et al. 2006).

In our experimental model of infection, we found increased levels of CCL-2, CCL-5 (data not shown) and CCL-12 chemokines by immunohistochemistry and qRT-PCR (data not shown) in the infected heart and skeletal muscles of these mice, and correlated with the histological observations of a moderate inflammatory mononuclear cell infiltration in heart and skeletal tissues and cruzipain expression.

Next, to test our working hypothesis that pathogen-derived proteases can modulate the inflammatory immune responses by chemokine cleavage, we proceeded to analyze the effect of cruzipain on two important biological functions of CC chemokines: induction of chemotaxis and calcium flux release, using mononuclear cells as targets. Our results clearly demonstrate that there is a role for cruzipain in the regulation of these chemokine-mediated functions.

Now, it is clear that chemokines are substrates for various proteases, including matrix metalloproteinases (MMPs) (Opdenakker et al. 2001; Van Den Steen et al. 2003; Zhang et al. 2003), serine and cysteine proteases (Ludwig et al. 2002; Zabel et al. 2006). Both at the NH₂- and the COOH-terminus, chemokines can be processed, generating a range of either truncated or modified proteins with contrasting biological functions. This proteolytic processing is part of a complex mechanism of regulation of chemokine functions that may affect the final outcome of the inflammatory immune response. Such is the case for CXCL-8/IL-8, a chemokine that requires of proteolytic processing for amplification of its functions (Ohashi et al. 2003;

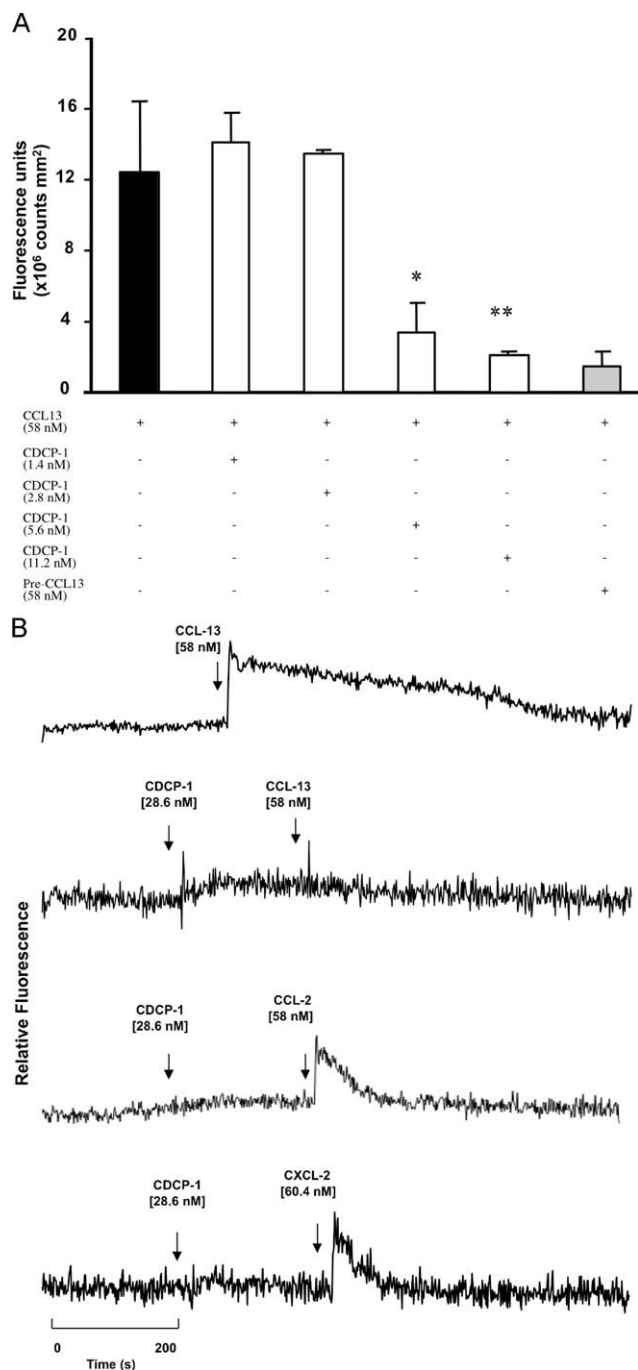


Fig. 7. Cruzipain derived chemokine peptide 1 (CDCP-1) inhibits chemokine-dependent functions: (A) inhibition of chemotaxis using THP-1 cells and different concentrations of CDCP-1 (1.4–11.2 nM) and CCL-13 (58 nM) as described in Methods. The data represents the mean of three experiments performed by triplicates (** $p > 0.05$). (B) Calcium flux release assays induced by CDCP-1 and chemokines were monitored by flow cytometry as described in Methods. Results are displayed as a relative fluorescence ratio of Fluo3/Fura Red. THP-1 cells (10^6 /ml) were stimulated with CDCP-1 (28.6 nM) and chemokines CCL-13, CCL-2 and CXCL-12 (58–50 nM), at different time points (arrow indicates time of addition). Tracings shown are taken from a representative experiment ($n = 3$).

Padrines et al. 1994; Van den Steen et al. 2000). MMPs have shown proteolytic effect on the MCP chemokines subfamily, in particular by removal of a NH₂-terminal tetra-peptide, generating truncated chemokines with reduced biological functions (McQuibban et al. 2000, 2002).

There is growing evidence showing the effect of pathogen-derived proteases as modulators of the chemokine functions. Some bacterial proteases such as gingipains of *Porphyromonas gingivalis*, alkaline phosphatases and elastases of *Pseudomonas aeruginosa* have shown proteolytic effects on CXC and CC chemokines. These proteases have important effects on the biological functions such as chemokine-mediated chemotaxis (Dias et al. 2008; Leidal et al. 2003).

Parasite-derived proteases have also been reported to modify chemokine-mediated functions. In one of these studies, the specific role of secretory/excretory antigens of *Necator americanus* (NES), on eosinophil recruitment, was investigated in response to CCL-11 (Culley et al. 2000). CCL-11 is one of the main chemoattractants of eosinophils during inflammatory and allergic responses (Garcia-Zepeda et al. 1996b). Interestingly, it was found that a metalloprotease present in the NES was responsible for a proteolytic effect on CCL-11, but not for other chemokines like CXCL-8 or CCL-23; this would imply that under certain conditions, such as during the establishment of the parasite, or as part of the mechanisms of tissue invasion, proteases may act differentially on chemokine targets. Moreover, our group found that a cysteine protease from *Entamoeba histolytica* (EhCP2) cleaves differentially chemokines CCL-2, CCL-13 and CXCL-8, decreasing their chemotactic activity on monocytic cells and granulocytic cells, respectively. These results suggest that *E. histolytica* is capable of regulating the immune response by cleaving chemokines that control leukocyte recruitment to the infection site (Pertuz Beloso et al. 2004).

Although there are few reports describing the proteolytic role of cruzipain regulating the immune response (Berasain et al. 2003; Giordanengo et al. 2002), no data has yet been reported regarding any direct effect of cruzipain on either cytokines or chemokine functions. In this report, we have focused on the analysis of the effect of cruzipain on two murine chemokines CCL-2 and CCL-12, which were highly expressed following experimental *T. cruzi* infection, and CCL-13, the human orthologue of the murine CCL-12 (Sarafi et al. 1997; Garcia-Zepeda et al. 1996a). Cruzipain showed proteolytic effects on all chemokines tested. CCL-13 was the most susceptible to the action of cruzipain compared to CCL-2. As it has been reported, cruzipain's substrate preference varies according to the adjacent amino acid in any of the substrate positions, although it appears to prefer basic amino acids (Serveau et al. 1996; Del Nery et al. 1997; Lima et al. 2001). Analysis of the biological

functions of proteolysed chemokines showed interesting differences. Monocyte-mediated chemotaxis using CCL-13 and CCL-12-treated chemokines was reduced. In contrast, CCL-2-treated chemokine showed no reduction but a slightly increase in the chemotaxis assays. These results are comparable to those previously reported for other CXCL-8 and CXCL-5 chemokines (Cox et al. 2008; Dean et al. 2008; Pertuz Belloso et al. 2004), which after being protease-treated, displayed enhanced chemotactic activities.

This differential proteolytic effect on CC chemokines may have an impact on the *in vivo* regulation of the type and number of the inflammatory cells recruited into the parasite's niches. In fact, it has been noticed a paucity in the recruitment of mononuclear cells at different time points during *T. cruzi* infection. In our murine model, we observed a reduction in the number of mononuclear cells that correlated with a reduction in the chemokine expression. However, a more detailed analysis of this correlation needs to be performed *in vivo*, by *in situ* determination of active cruzipain.

Analysis of cruzipain-treated chemokine products by HPLC and standard mass spectrometric techniques resulted in a library of small peptides in the size range of 10–60 aa; one of these, a 14-mer peptide (CDCP-1) spanning amino acids ²⁴L–³⁸K in the core of CCL-13 was selected, synthesized and analyzed for its biological functions. When CDCP-1 was tested in *in vitro* chemotaxis assays, it did not show agonist but antagonist effects. Surprisingly, CDCP-1 reduced CCL-13-mediated monocyte chemotaxis. Also, it showed an antagonist effect on CCL-13-mediated calcium flux release. Although it has been reported that either NH₂-truncated MCP's (Dean et al. 2008; McQuibban et al. 2002) or peptides derived from the NH₂-terminal residue of chemokines had antagonist functions (Mendez-Enriquez et al. 2008), this finding would be the first to demonstrate that a chemokine core peptide sequence has biological effects.

Altogether, these results suggest that during the development of the inflammatory process, *T. cruzi*'s cruzipain may be actively processing chemokines, generating modified or truncated chemokines with reduced biological activities. Additionally, these modified chemokines may change their affinities for specific chemokine receptors, modifying the characteristics of the infiltrating leukocytes at the site of the infection (Proost et al. 2006). Although, so far, it has not been possible to identify *in vivo* these modified chemokines or their proteolysed derivatives, it is feasible to hypothesize that active proteases from pathogens such as *T. cruzi* may utilize this mechanism to evade the immune system. Furthermore, as reported with other tissue and activated leukocyte-derived proteases (Sachse et al. 2006; Hiraguchi et al. 2008), cruzipain is capable to induce chemokine secretion (Schmitz et al. 2009), thus enhan-

cing the possibilities of generating a rich microenvironment where both processed and unprocessed chemokines may have a regulatory role of the inflammatory process.

In summary, we have demonstrated that cruzipain has the capacity to proteolyse chemokines that are important in the recruitment of inflammatory cells during the course of the *T. cruzi* infection. This proteolytic effect may represent a novel modulatory mechanisms used by this parasite to evade the immune response. Thus, *in vivo* studies using CDCP-1 as an antagonist will be of relevance for a better understanding of the modulatory effects of *T. cruzi* at different stages of infection. Finally, this is the first description of a novel immune evasion mechanism promoted by the major protease of *T. cruzi* based on chemokine cleavage.

Acknowledgements

Authors acknowledge technical assistance from Gisela Dupont, and Dr. Cesar Ferreira. We also thank Veronica Rodríguez and Judith Reyes for processing tissue samples for histological analysis, Dr. Roberto Hernandez and Juliana Herrera for providing *T. cruzi* strains. A CONACYT Grant #52498 provided financial support. I.B.H. and E.M.E. were supported by a CONACYT Doctoral scholarship.

References

- Andrade, L.O., Andrews, N.W., 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (10), 819–823.
- Aparicio, I.M., Scharfstein, J., Lima, A.P., 2004. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infect. Immun.* 72 (10), 5892–5902.
- Bafica, A., Santiago, H.C., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R.T., Sher, A., 2006. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 177 (6), 3515–3519.
- Barrett, M.P., Burchmore, R.J., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J., Krishna, S., 2003. The trypanosomiasis. *Lancet* 362 (9394), 1469–1480.
- Batista, C.V., del Pozo, L., Zamudio, F.Z., Contreras, S., Becerril, B., Wanke, E., Possani, L.D., 2004. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 803 (1), 55–66.
- Berasain, P., Carmona, C., Frangione, B., Cazzulo, J.J., Goni, F., 2003. Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130 (1), 23–29.

- Bixby, L.M., Tarleton, R.L., 2008. Stable CD8+ T cell memory during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 181 (4), 2644–2650.
- Bontempi, E., Cazzulo, J.J., 1990. Digestion of human immunoglobulin G by the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 58 (3), 337–341.
- Brodskyn, C., Patricio, J., Oliveira, R., Lobo, L., Arnholdt, A., Mendonca-Previato, L., Barral, A., Barral-Netto, M., 2002. Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. *Infect. Immun.* 70 (7), 3736–3743.
- Campos, M.A., Gazzinelli, R.T., 2004. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediat. Inflamm.* 13 (3), 139–143.
- Cazzulo, J.J., Bravo, M., Raimondi, A., Engstrom, U., Lindeberg, G., Hellman, U., 1996. Hydrolysis of synthetic peptides by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*, provides evidence for self-processing and the possibility of more specific substrates for the enzyme. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 42 (5), 691–696.
- Cordova, E., Boschi, A., Ambrosioni, J., Cudos, C., Corti, M., 2008. Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-infected patients in Argentina, 1992–2007. *Int. J. Infect. Dis.* 12 (6), 587–592.
- Cox, J.H., Dean, R.A., Roberts, C.R., Overall, C.M., 2008. Matrix metalloproteinase processing of CXCL11/I-TAC results in loss of chemoattractant activity and altered glycosaminoglycan binding. *J. Biol. Chem.* 283 (28), 19389–19399.
- Culley, F.J., Brown, A., Conroy, D.M., Sabroe, I., Pritchard, D.I., Williams, T.J., 2000. Eotaxin is specifically cleaved by hookworm metalloproteases preventing its action *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* 165 (11), 6447–6453.
- Dean, R.A., Cox, J.H., Bellac, C.L., Doucet, A., Starr, A.E., Overall, C.M., 2008. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx. *Blood* 112 (8), 3455–3464.
- Del Nery, E., Juliano, M.A., Lima, A.P., Scharfstein, J., Juliano, L., 1997. Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 272 (41), 25713–25718.
- Dias, I.H., Marshall, L., Lambert, P.A., Chapple, I.L., Matthews, J.B., Griffiths, H.R., 2008. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* increase the chemotactic and respiratory burst-priming properties of the 77-amino-acid interleukin-8 variant. *Infect. Immun.* 76 (1), 317–323.
- Fernandez-Presas, A.M., Zavala, J.T., Fauser, I.B., Merchant, M.T., Guerrero, L.R., Willms, K., 2001. Ultrastructural damage of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes exposed to de complemented immune sera. *Parasitol. Res.* 87 (8), 619–625.
- Fonseca, S.G., Moins-Teisserenc, H., Clave, E., Ianni, B., Nunes, V.L., Mady, C., Iwai, L.K., Sette, A., Sidney, J., Marin, M.L., 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.
- García-Zepeda, E.A., Combadiere, C., Rothenberg, M.E., Sarafi, M.N., Lavigne, F., Hamid, Q., Murphy, P.M., Luster, A.D., 1996a. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J. Immunol.* 157 (12), 5613–5626.
- García-Zepeda, E.A., Rothenberg, M.E., Ownbey, R.T., Celestin, J., Leder, P., Luster, A.D., 1996b. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat. Med.* 2 (4), 449–456.
- Giordanengo, L., Guinazu, N., Stempin, C., Fretes, R., Cerban, F., Gea, S., 2002. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. *Eur. J. Immunol.* 32 (4), 1003–1011.
- Girones, N., Cuervo, H., Fresno, M., 2005. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 296, 89–123.
- Guinazu, N., Pellegrini, A., Giordanengo, L., Aoki, M.P., Rivarola, H.W., Cano, R., Rodrigues, M.M., Gea, S., 2004. Immune response to a major *Trypanosoma cruzi* antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice. *Microbes Infect.* 6 (14), 1250–1258.
- Hiraguchi, Y., Nagao, M., Hosoki, K., Tokuda, R., Fujisawa, T., 2008. Neutrophil proteases activate eosinophil function *in vitro*. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 146 (Suppl. 1), 16–21.
- Hotez, P.J., Bottazzi, M.E., Franco-Paredes, C., Ault, S.K., Periago, M.R., 2008. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2 (9), e300.
- Hou, W.C., Lin, Y.H., 1998. Activity staining of pectinesterase on polyacrylamide gels after acidic or sodium dodecyl sulfate electrophoresis. *Electrophoresis* 19 (5), 692–694.
- Kierszenbaum, F., 1999. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (2), 210–223.
- Kipnis, T.L., da Silva, W.D., 1989. Evasion of *Trypanosoma cruzi* from complement lysis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22 (1), 1–16.
- Labriola, C., Sousa, M., JJ, C., 1993. Purification of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* by affinity chromatography. *Biol. Res.* 26 (1–2), 101–107.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680–685.
- Leidal, K.G., Munson, K.L., Johnson, M.C., Denning, G.M., 2003. Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade human RANTES, MCP-1, and ENA-78. *J. Interferon Cytokine Res.* 23 (6), 307–318.
- Lima, A.P., dos Reis, F.C., Serveau, C., Lalmanach, G., Juliano, L., Menard, R., Vernet, T., Thomas, D.Y., Storer, A.C., Scharfstein, J., 2001. Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114 (1), 41–52.

- Lopes, M.F., Guillermo, L.V., Silva, E.M., 2007. Decoding caspase signaling in host immunity to the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Trends Immunol.* 28 (8), 366–372.
- Ludwig, A., Schiemann, F., Mentlein, R., Lindner, B., Brandt, E., 2002. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) on T cells cleaves the CXC chemokine CXCL11 (I-TAC) and abolishes the stimulating but not the desensitizing potential of the chemokine. *J. Leukoc. Biol.* 72 (1), 183–191.
- Marin-Neto, J.A., Cunha-Neto, E., Maciel, B.C., Simoes, M.V., 2007. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115 (9), 1109–1123.
- Martin, D., Tarleton, R., 2004. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol. Rev.* 201, 304–317.
- Martin, D.L., Tarleton, R.L., 2005. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 174 (3), 1594–1601.
- Martinez, J., Campetella, O., Frasc, A.C., Cazzulo, J.J., 1991. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is antigenic in human infections. *Infect. Immun.* 59 (11), 4275–4277.
- McKerrow, J.H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., Sajid, M., 2006. Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol.* 1, 497–536.
- McQuibban, G.A., Gong, J.H., Tam, E.M., McCulloch, C.A., Clark-Lewis, I., Overall, C.M., 2000. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289 (5482), 1202–1206.
- McQuibban, G.A., Gong, J.H., Wong, J.P., Wallace, J.L., Clark-Lewis, I., Overall, C.M., 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties *in vivo*. *Blood* 100 (4), 1160–1167.
- Medeiros, M.M., Peixoto, J.R., Oliveira, A.C., Cardilo-Reis, L., Koatz, V.L., Van Kaer, L., Previato, J.O., Mendonca-Previato, L., Nobrega, A., Bellio, M., 2007. Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Leukoc. Biol.* 82 (3), 488–496.
- Mendez-Enriquez, E., Melendez, Y., Martinez, F., Baay, G., Huerta-Yepez, S., Gonzalez-Bonilla, C., Fortoul, T.I., Soldevila, G., Garcia-Zepeda, E.A., 2008. CDIP-2, a synthetic peptide derived from chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13), ameliorates allergic airway inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 152 (2), 354–363.
- Moncayo, A., Ortiz Yanine, M.I., 2006. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 100 (8), 663–677.
- Monteon, V.M., Reyes Lopez, P.A., 1989. Mechanisms of innate and acquired resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 59 (5), 529–535.
- Ohashi, K., Naruto, M., Nakaki, T., Sano, E., 2003. Identification of interleukin-8 converting enzyme as cathepsin L. *Biochim. Biophys. Acta* 1649 (1), 30–39.
- Olliaro, P., Lazdins, J., Guhl, F., 2002. Developments in the treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 7 (1), 61–67.
- Opendakker, G., Van den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Van Coillie, E., Masure, S., Proost, P., Van Damme, J., 2001. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J. Leukoc. Biol.* 69 (6), 851–859.
- Padrines, M., Wolf, M., Walz, A., Baggiolini, M., 1994. Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3. *FEBS Lett.* 352 (2), 231–235.
- Pertuz Belloso, S., Ostoa Saloma, P., Benitez, I., Soldevila, G., Olivos, A., Garcia-Zepeda, E., 2004. *Entamoeba histolytica* cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite Immunol.* 26 (5), 237–241.
- Proost, P., Struyf, S., Van Damme, J., 2006. Natural post-translational modifications of chemokines. *Biochem. Soc. Trans.* 34 (Pt 6), 997–1001.
- Reyes, J.L., Terrazas, L.I., Espinoza, B., Cruz-Robles, D., Soto, V., Rivera-Montoya, I., Gomez-Garcia, L., Snider, H., Satoskar, A.R., Rodriguez-Sosa, M., 2006. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 74 (6), 3170–3179.
- Rivera, J., Hillis, L.D., Levine, B.D., 2004. Reactivation of cardiac Chagas' disease in acquired immune deficiency syndrome. *Am. J. Cardiol.* 94 (8), 1102–1103.
- Sachse, F., von Eiff, C., Stoll, W., Becker, K., Rudack, C., 2006. Induction of CXC chemokines in A549 airway epithelial cells by trypsin and staphylococcal proteases—a possible route for neutrophilic inflammation in chronic rhinosinusitis. *Clin. Exp. Immunol.* 144 (3), 534–542.
- Sarafi, M.N., Garcia-Zepeda, E.A., MacLean, J.A., Charo, I.F., Luster, A.D., 1997. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *J. Exp. Med.* 185 (1), 99–109.
- Savino, W., Villa-Verde, D.M., Mendes-da-Cruz, D.A., Silva-Monteiro, E., Perez, A.R., Aoki Mdel, P., Bottasso, O., Guinazu, N., Silva-Barbosa, S.D., Gea, S., 2007. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18 (1-2), 107–124.
- Scharfstein, J., Monteiro, A.C., Schmitz, V., Svensjo, E., 2008. Angiotensin-converting enzyme limits inflammation elicited by *Trypanosoma cruzi* cysteine proteases: a peripheral mechanism regulating adaptive immunity via the innate kinin pathway. *Biol. Chem.* 389 (8), 1015–1024.
- Scharfstein, J., Schmitz, V., Morandi, V., Capella, M.M., Lima, A.P., Morrot, A., Juliano, L., Muller-Esterl, W., 2000. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J. Exp. Med.* 192 (9), 1289–1300.
- Schmitz, V., Svensjo, E., Serra, R.R., Teixeira, M.M., Scharfstein, J., 2009. Proteolytic generation of kinins in tissues infected by *Trypanosoma cruzi* depends on CXC chemokine secretion by macrophages activated via Toll-like 2 receptors. *J. Leukoc. Biol.*
- Schnapp, A.R., Eickhoff, C.S., Scharfstein, J., Hoft, D.F., 2002. Induction of B- and T-cell responses to cruzipain in the murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.* 4 (8), 805–813.

- Serveau, C., Lalmanach, G., Juliano, M.A., Scharfstein, J., Juliano, L., Gauthier, F., 1996. Investigation of the substrate specificity of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, through the use of cystatin-derived substrates and inhibitors. *Biochem. J.* 313 (Pt 3), 951–956.
- Silva, J.S., Machado, F.S., Martins, G.A., 2003. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front. Biosci.* 8, s314–s325.
- Souto-Padron, T., Campetella, O.E., Cazzulo, J.J., de Souza, W., 1990. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite–host cell interaction. *J. Cell. Sci.* 96 (Pt 3), 485–490.
- Stempin, C., Giordanengo, L., Gea, S., Cerban, F., 2002. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J. Leukoc. Biol.* 72 (4), 727–734.
- Stempin, C.C., Tanos, T.B., Coso, O.A., Cerban, F.M., 2004. Arginase induction promotes *Trypanosoma cruzi* intracellular replication in Cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathways. *Eur. J. Immunol.* 34 (1), 200–209.
- Tardieux, I., Nathanson, M.H., Andrews, N.W., 1994. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca^{2+} transients. *J. Exp. Med.* 179 (3), 1017–1022.
- Tarleton, R.L., 2003. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol.* 19 (10), 447–451.
- Teixeira, M.M., Gazzinelli, R.T., Silva, J.S., 2002. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.* 18 (6), 262–265.
- Urbina, J.A., 2002. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.* 8 (4), 287–295.
- Van den Steen, P.E., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J., Opdenakker, G., 2000. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96 (8), 2673–2681.
- Van Den Steen, P.E., Wuyts, A., Husson, S.J., Proost, P., Van Damme, J., Opdenakker, G., 2003. Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *Eur. J. Biochem.* 270 (18), 3739–3749.
- Zabel, B.A., Zuniga, L., Ohyama, T., Allen, S.J., Cichy, J., Handel, T.M., Butcher, E.C., 2006. Chemoattractants, extracellular proteases, and the integrated host defense response. *Exp. Hematol.* 34 (8), 1021–1032.
- Zambrano-Villa, S., Rosales-Borjas, D., Carrero, J.C., Ortiz-Ortiz, L., 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 18 (6), 272–278.
- Zhang, K., McQuibban, G.A., Silva, C., Butler, G.S., Johnston, J.B., Holden, J., Clark-Lewis, I., Overall, C.M., Power, C., 2003. HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* 6 (10), 1064–1071.

Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases, 2007:
ISBN: 81-308-0166-3 Editor: Luis I. Terrazas

Modulation of the inflammatory immune response by parasite proteases

Itzel Benitez-Hernandez and Eduardo A Garcia-Zepeda
Departamento de Immunologia, Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. CP 04510, México

Abstract

Proteases play a major role in the life cycle of parasitic organisms. They are involved in a number of important functions such as metabolism, invasion and replication inside host cells. Parasite proteases can be divided according to their substrate specificities Exopeptidases and Endopeptidases. There are five main subgroups according to their mechanism of action; Serine, Cysteine, Aspartic, Threonine and Metallo-proteases.

Although they have been targets for chemotherapy, there is little information about their regulatory role on the immune system. In this review, we focused on

Correspondence/Reprint request: Dr. Eduardo A. Garcia-Zepeda, Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, CP 04510, Mexico. E-mail: garcaiaze@servidor.unam.mx

the biological role of Cysteine proteases and their modulatory activities on the inflammatory immune response in diseases such as Leishmaniasis, Amoebiasis, Trypanosomiasis and Necatoriasis.

Introduction

1. Proteases: Classification and mechanisms of action

Proteases hydrolyze peptide bonds between amino acids of proteins to generate biologically active molecules or to the disassembly of proteins. They are also called proteolytic enzymes or proteinases. Proteases are found naturally in all organisms and constitute 2-5% of genome content (1). Enzymes are involved in several physiological events including, cytoskeleton reorganization, cellular fusion and differentiation, protein synthesis, hormone activation and inactivation, growing, fecundation, immunologic defense, degradation of the endocytosed material, necrosis, blood clotting, complement activation, apoptosis and production of vasoactive products (2).

Based on their substrate specificities, proteases are traditionally divided into two major groups: 1) *Exopeptidases*, proteases with preference by the Carboxi-terminal group (carboxipeptidases) or by the Amino-terminal of the polypeptidic chain (aminopeptidases), and 2) *Endopeptidases*, proteases that cleave within the polypeptide chain.

Likewise, proteases can be subclassified into five main types based on their catalytic mechanism: Serine, Cysteine, Aspartic, Threonine and Metallo-proteases (3).

Although some proteases may have a relatively non-specific substrate preference and probably functioning in general catabolism, there are other proteases with a very limited substrate preference facilitating specific cell processes. These activities are influenced by specific environment conditions such as pH, temperature, substrate and enzyme concentration.

Cysteine proteases require an essential cysteine residue in the active site's substrate for hydrolysis. The thiol-group is enhanced as a nucleophile due to the close proximity of an active histidine site which acts as a proton donor-general base. The two ionisable groups of the thiolate–imidazolium allow a broad pH range of enzymatic activity. The mechanism of hydrolysis has been elucidated and well documented; the enzyme is transiently bound to the substrate and forms unstable tetrahedral intermediates prior to returning to an active enzyme state. Many Cysteine proteases are synthesized as precursors that contain a pro-domain and a mature (catalytic) domain. Cysteine proteases which are targeted to an intracellular compartment or those that are secreted also include a signal or leader sequence around 15-22 amino acids. (4).

Serine proteases are defined by the presence of a serine residue in their active domain. The mechanism of action is based on a nucleophilic attack of the targeted peptidic bond by a serine. In many cases the nucleophilic

property of the group is improved by the presence of a histidine, held in a "proton acceptor state" by an aspartate.

Aspartic proteases are a class of evolutionarily conserved proteolytic enzymes that have been characterized in a variety of species. They are very active at acidic or nearly neutral pH, and have two aspartic acids in the active site. In this family of enzymes, a water molecule is the active nucleophile that attacks the scissile peptide bond in a substrate. This water molecule is then activated by two aspartic acid residues. These enzymes differ from cysteine and serine proteases in which they make use of appropriate amino acid side-chains as the attacking nucleophile (3)

Metallaproteases, can be divided in Endoproteases, which are characterized by acting on the removal of single residues from the Carboxy-terminus of a polypeptide substrate, and Endopeptidases which catalyze the hydrolysis of non-terminal peptide bonds. These enzymes bind essential metal ions (typically zinc) at their active site, enabling the polarization of the target scissile peptide bond before nucleophilic attack and subsequent cleavage (3).

2. Parasite proteases: Their role in parasite's life cycle

Progress in the understanding of the physiological roles of proteases in parasite's life cycle revealed that they accomplish specific functions, many critical to their life cycle or pathogenicity. In particular, Cysteine proteases have functional diversity as a consequence of their unique nucleophilicity, adaptability to different substrates and stability in different biological environments. These proteases play key roles in immunoevasion, enzyme activation, virulence, tissue and cellular invasion, antigen presentation and it is clear that they may represent viable drug targets for a wide variety of parasitic infections.

Throughout migration within or between hosts, parasite proteases are used to help tissue and cellular invasion as well as to facilitate tissue migration. There are many examples of parasite proteases involved in tissue or cell invasion, in most of the cases, serine and metalloproteases have a major role unlike cysteine proteases. In addition, little is known about the biological roles or occurrence of aspartic proteases in some parasitic protozoa, this class of proteolytic enzymes include pepsins, renins, cathepsins D and E, and chymosins. These proteases contain conserved activation domains as well as N-glycosylation and phosphorylation sites (5). Aspartic proteases function equally in both intra and extracellular degradation of proteins, which includes food digestion, processing of peptide hormones, antigens and immunoglobulins. These characteristics makes them a likely target for the development of antiparasitic drugs.

3. Inflammatory process in parasitic diseases

Parasites invade tissues by a combined action of proteases and soluble factors, this is followed by disruption of the epithelial barrier as a result of degradation of the extracellular matrix allowing them to gain access to other tissues via portal circulation. Initial host immune responses against parasites rely on a number of factors such as, genetic host background, and parasite load and virulence, among others. As the infection takes place, an inflammatory immune response is developed, involving the participation of leukocytes and soluble mediators. This is a complex process and is regulated by a combined action and participation of molecules such as cytokines, integrins, adhesins, as well as chemokines.

3.1 Chemokines and their receptors

Chemokines are chemotactic cytokines of low molecular weight, with important functions not only as chemoattractants but also in homeostasis, leukocyte activation and host defense. They induce leukocyte migration and activation by binding to specific seven transmembrane spanning heterotrimeric G protein-coupled receptors. Chemokines are divided in four families according to the characteristics of their conserved cysteines in the NH₂-amino terminal: C, CC, CXC, and CX₃C. Upon chemokine binding, a cascade of intracellular secondary mediators turn on very specific and organized programs in the cells such as a re-organization of cytoskeleton and directed migration.

This chemokine receptor signaling is transient. The G α subunits of the heterotrimeric G-protein have an intrinsic GTPase activity to hydrolyze GTP and reunite with G $\beta\gamma$ to return to the initial conformation of inactive heterotrimers (6) Chemokine binding to a particular receptor is determined by affinity, which varies between ligands and does not necessarily translate into functional potency (7).

It is not clear whether chemokines remain soluble to induce biological functions. In fact, it is presumable that chemokines may interact with endothelial Glycoaminoglycans (GAGs) *in vivo*, favoring their presentation and interaction with leukocyte cell surface receptors. GAGs are sulfated sugars, such as heparin sulfate and chondroitin sulfate. GAGs may not only interfere with chemokine diffusion, but also supply highly specific substrates onto which chemokines messages are printed (8) It has not been determined whether GAG-bound chemokines can signal as complexes or if chemokines must first dissociate from GAGs to interact with their receptors. Consequently, the regulation of *in vivo* activity of chemokines may take place at the level of their GAG immobilization and mobilization (8).

Chemokines may also amplify the immune responses against parasites by activating leukocytes to release soluble factors and mediators acting directly to kill. Nevertheless, they also become the target of the parasite proteases as part of their evasion immune response mechanisms.

Table 1. Regulatory effects of parasite proteases on immune responses.

PARASITE	PROTEASE	TARGET	BIOLOGICAL EFFECT	REFERENCE
<i>Leishmania</i>	C-terminal region of CP	Lymphocytes	Development of a Th2 type response and large lesion size in susceptible mice	10, 11
<i>Leishmania</i>	C-terminal extension of CP	T and B lymphocytes	Induction of higher levels of IgG2 in asymptomatic visceral Leishmaniasis	12
<i>Leishmania</i>	Gp 63 (Zinc dependent endopeptidase)	CD4 molecule	ND	13
<i>Leishmania mexicana</i>	CP-B	T lymphocytes	Deletion of CP-B genes of <i>L. mexicana</i> enhance IFN- γ production	15
<i>Leishmania amazonensis</i>	CP	MHC II	Antigen presentation affected	16
<i>Leishmania mexicana</i>	CP	CD25 molecule	Reduction in lymphocytes proliferation	17
<i>Leishmania mexicana</i>	CP	Transcriptional factor NF κ B	Almost complete reduction of IL-12 production	18
<i>Entamoeba histolytica</i>	CP	Human IgA	Complete IgA degradation. Mucosal immunity affected	22
<i>Entamoeba histolytica</i>	CP	Human IgG	Degradation of IgG Evasion of humoral immune response	23
<i>Entamoeba histolytica</i>	CP	Complement component C3	Cleavage of C3. Activation of the alternative pathway. Passive lysis of non-pathogenic strains of <i>Entamoeba</i>	24
<i>Entamoeba histolytica</i>	CP	Complement components C3, C5 and C3a, C5a	Degradation and lost of biological activities; platelet aggregation (C3a) and chemotaxis (C5a)	25
<i>Entamoeba histolytica</i>	CP	IL-1 β	Cytokine activation and promotion of intestinal inflammation	27
<i>Entamoeba histolytica</i>	Cysteine protease5 (EhCP5)	IL-18	Degradation and lost of cytokine activity	28
<i>Entamoeba histolytica</i>	Cysteine protease2 (EhCP2)	Chemokines CCL2, CCL13 and CXCL8	Cleavage of CCL2 and CCL13 lost their activity. Activation of immature CXCL8 and lost of the chemotactic activity of mature CXCL8	29
<i>Trypanosoma cruzi</i>	ND	CD3, CD4 and CD8 molecules	Inhibition of lymphocyteactivation	32
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Secretory/ product (ND)	IL-2R	Suppression of IL-2R expression and lymphoproliferation	33
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cruzipain	Arginase	Up regulation of arginase in J774 cells. Production of IL-10 and TGF- β	34
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cruzipain	Macrophages	Uncontrolled parasite replication	34
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cruzipain	IgG	Degradation of all IgG subclasses in a specific manner	35
<i>Necator americanus</i>	Derp1 (cysteine protease)	Basophiles	Production of IL-4, IL-5 and IL-13 cytokines in a doses dependent manner	37
<i>Necator americanus</i>	Metalloprotease	CCL11	Reduction of Chemotactic activity	38

ND: Not Determined

CP: Cysteine protease

4. Parasite proteases and the immune system

It has long been hypothesized that parasite proteases participate in evasion of the host immune system by degrading immune effectors or modulating the cellular immune response, next, we will focus on the specific role of several proteases derived from clinically important parasites such as *Leishmania* spp, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi* and *Necator americanus*.

4.1 Leishmaniasis

Leishmaniasis is one of the best studied parasitic diseases, it is caused by different species of the intracellular protozoan of the genus *Leishmania*. Depending on the parasite species and on the immunological status of the host, the amastigote forms produce a broad spectrum of diseases ranging in severity from cutaneous lesion to a potentially fatal systemic infection.

The outcome of experimental leishmaniasis in mice is determined by T cell-mediated immune responses. It has been demonstrated that in absence of a Th1 response, there is a faulty immune response that promotes a non-healing disease (9). This finding has prompted to search for *Leishmania* antigens responsible for the polarization of Th1 to Th2 responses. Interestingly, there is evidence that the C-terminal region of a Cysteine protease (CP) of *Leishmania* may have a role in the induction of T-cell responses in genetically susceptible mice (10). It has been reported that a previous sensitization of susceptible Balb/c mice with a peptide derived from the C-terminal domain sequences of *Leishmania*'s CP, had a weak but significant reduction on lesion size after challenging with *L. amazonensis*. This finding may correlate with a Th1/Th2 polarization, since in vitro studies using T cells derived from susceptible mice developed a Th2 type response when challenged with this peptide (11).

In addition, it has been demonstrated that the C-terminal region of *Leishmania* CP is highly immunogenic; in an experimental model of visceral in dogs *Leishmaniasis*, it was found the total levels of IgG (IgG2 superior than IgG1) reached higher values in asymptomatic dogs (12)

Regarding the activity of *Leishmania* proteases on molecules involved in the immune response, it has been shown that *Leishmania* glycoprotein gp63, which is a zinc-dependent endopeptidase, reduces the expression of the T-cell surface marker CD4. Although the biological significance of CD4's cleavage by gp63 is not clear, it may result that it is more susceptible to proteases than other surface molecules (13).

Cysteine proteases may account for differences in the immunologic and pathologic responses. That is the case of the CPB protease of *Leishmania mexicana* which inhibits Th1 responses and the protective immune response in C3H/HeJ mice. In these experiments, it was shown that IFN- γ production was enhanced in the infected mice using a CPB deficient *L. mexicana* strain. When

L. mexicana CPB gene was transfected into *L. major*, the typically early increase in IFN- γ response, diminished. *L. major* possesses homologous genes to those from *L. mexicana* (14), although the CP activity in *L. major* is less abundant. This may indicate that the specificities of the enzymes are quite different between *Leishmania* species and may help to explain the different disease outcomes (15).

Other proteins cleaved by *Leishmania*'s CP include MHC-Class II molecules (16) and CD25, which is cleaved by *L. mexicana*'s CP, causing a reduction in lymphocyte proliferation (17). More recently, it has been demonstrated that also *Leishmania mexicana* CP are capable of cleaving the Nuclear Factor kappa B (NFkB), as a result, the production of macrophage cytokines such as IL-12 is almost completely abolished (18).

More recently, the observation that *Leishmania* parasites may interact directly with chemokines (CCL3, CCL4 and CCL5) has increased the complexity of the regulatory role of parasites and their secreted molecules. It was found that chemokines CCL 3, 4 and 5 bind to the same site in the promastigote form but with different affinities. This chemokine binding to *Leishmania* induces intracellular signals as evidence by intracellular Ca⁺⁺ mobilization which is likely to be G-protein mediated similar to that observed in the mammalian host (19). This may evidence a new mechanism by which these parasites may overcome the activation of the immune response mediated by chemokines.

Altogether, these findings show that, proteases have an important role in suppressing the immune response to *Leishmania* species and that a difference in CP's expression could help to explain differences in disease outcomes

4.2 Amoebiasis

Entamoeba histolytica is an invasive human intestinal protozoan parasite that penetrates the host intestinal walls producing liver abscesses. *E. histolytica* contains higher levels of proteases than the morphologically identical but not pathogenic *E. dispar*. It has been proposed that cysteine proteases among others, were the responsible for the inflammation and necrosis observed in rat tissue infected with *E. histolytica* (20, 21). *E. histolytica* cysteine protease (CP) are capable of cleaving human IgA (22) and also IgG in a dose dependent manner (23). Thus, *E. histolytica* may be evading the humoral immune response by cleaving antibodies which are implicated in both local mucosal immune responses and in charge of preventing an invasive amoebiasis.

The extracellular cysteine proteinases of *E. histolytica* trophozoites activate the complement alternative pathway by cleaving C3 and leading to passive lysis of nonpathogenic, but not of pathogenic strains (24). In addition, C5 is also cleaved by *E. histolytica* proteases producing C5a-like complement

components. This and C3a-like byproducts have a reduction in their functional activities such as platelet aggregation and chemotaxis respectively (25).

IL-18 is also a pro-inflammatory cytokine involved in Th1/Th2 polarization, promotes IFN γ production in the intestinal epithelial cells. This cytokine as well as IL-1 β lack a signal peptide, both are synthesized as biologically inactive precursors, these cytokines are naturally processed by caspase-1 and then are released as mature proteins (26) It was demonstrated that a cysteine protease of *E. histolytica* posses the capacity to generate an active IL-1 β promoting intestinal inflammation and, as a consequence, tissue damage during amoebiasis (27). Interestingly, Cysteine proteinase 5 (EhCP5), which is highly expressed in *E. histolytica* but not in *E. dispar* is capable of cleaving both immature and mature IL-18; as a consequence, this proteolysed cytokine lost its functional activity (28). This may suggest that by blocking the activation system mediated by cytokines during the Th1/Th2 polarization, *E. histolytica* can avoid the immune response.

More recently, our group found that *Entamoeba histolytica* cysteine protease 2 (EhCP2) cleaves chemokines CCL2, CCL13 and CXCL8. Interestingly, chemokines CCL2 and 13 were degraded by EhCP2, decreasing their chemotactic activity on monocytic cells. CXCL8 is present as an immature protein (77 aa) that requires processing by MMPs derived from neutrophils producing a more active mature protein of 72 aa. EhCP2 was able to cleave both chemokine forms leading to activation of the immature form with 100% of migratory activity on granulocytes in contrast with the mature forms which was degraded by EhCP2 and lost its chemotactic activity in more that 75% on granulocytic cells (29) These results suggest that *E. histolytica* is capable of regulating the immune response by cleaving chemokines that control leukocyte recruitment to the infection site.

4.3 Trypanosomiasis

One of the most important parasitic diseases in Latin America is the Chagas disease, which is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Its life cycle is very complex; it includes an intermediary host, which is a blood-sucking triatomine. Herein, the parasite develops into an infective metacyclic trypomastigote, which is released with the insect faeces. When a triatomine bites, it deposits its faeces onto the host skin and the parasite penetrates when the host scratches. Then, the parasite differentiates into the replicative amastigote form into host cells cytoplasm, after several binary divisions parasites differentiate into infective trypomastigote and are released into the blood and tissue spaces perpetuating the parasite's life cycle.

Chagas disease is characterized by three complex phases: acute, indeterminate and chronic. *Trypanosoma* may remain unnoticed within the host

up to more than 40 years; when noticed, promotes heart disease accompanied of other deadly pathologies in the nervous system and autoimmunity.

Currently, research has made a steady progress about some of the mechanisms involved in *Trypanosoma*'s modulation of the host immune response. It was shown that some soluble factor, found in the supernatant of *T. cruzi*'s culture, induce immunosuppression. Also, *T. cruzi* trypomastigotes have a direct effect on lymphocyte function as it was evidenced by the inhibition of mitogen-induced proliferation. The expression of high and low affinity IL-2R by human lymphocytes was also affected but not the IFN- γ and IL-2 production (30, 31). Additionally, in co-cultures of *T. cruzi* trypomastigotes with mitogen activated human PBMC, the expression of molecules such as CD3, CD4 and CD8 was inhibited (32). This may be caused by secreted proteins (30-100 kDa). In addition, this effect was reversible, which indicated that direct PBMC-*T. cruzi* contact was not required to cause immunosuppression (33).

The most abundant Cysteine protease in the life cycle of *Trypanosoma cruzi* is cruzipain. This protease has a modulatory role on alternative macrophage activation. Cruzipain up-regulates the expression of arginase in J774 cells, an enzyme that compete with iNOS for the substrate L-arginine, generating urea and L-ornithine instead of nitric oxide. Also, this protease induces IL-10 and TGF- β expression. Macrophages pre-treated with cruzipain had uncontrolled parasite replication compared to LPS-mediated macrophage activation (34). Cruzipain's roles may be not only promoting parasite early penetration, invasion and replication, but also participating in the alternative activation of macrophages. Altogether, as an evasive mechanism allowing parasite replication and dissemination within host cells during a long period of time. It is important to notice that Cruzipain in this case is working as a protein without enzymatic activity.

There are few reports on Cruzipain acting as a protease on the inflammatory immune response. It was demonstrated that Cruzipain cleaves IgG subclasses in a very specific manner. Specifically, Cruzipain cleaves the hinge region of all human IgG subclasses and the number and location of the cleavage sites along the hinge regions, varied depending on the subclass. Also it was demonstrated that depending on the pH values, cruzipain has different preferences by IgG subclasses. At pH near to 7, Cruzipain has little or no effect, whereas at acid pH, Cruzipain has good proteolytic activity in as little time as few hours. Cruzipain has a marked effect on IgG1 and IgG3 subclasses but not in IgG2 and IgG4 subclasses (35) It is well known that complete antibodies play a major role in combating trypanosomatid infections so, with these results is inferred that Cruzipain may modulate, differentially, the host humoral immune responses during development of Chagas disease.

4.4. Necatoriasis

Necator americanus is the second most prevalent helminthic infection after ascariasis. This parasite lives in the small intestine of its host, which may be a mammal such as a dog, cat, or human. *N. americanus* predominates in America, Sub-Saharan Africa, Southeast Asia, China and Indonesia. They exist primarily in sandy or loamy soil and cannot live in clay or muck; they need warm earth where temperatures are over 18°C. Rainfall averages must be more than 1000 mm a year and only if these conditions exist, the parasite eggs can successfully hatch.

N. americanus invades the lower intestine and can lead to a severe blood loss resulting in anemia. This can be accompanied with cardiac and pulmonary complications. Most adult parasites do not survive morer than 1-2 years within the host. Transmission does not require an intermediate host.

The most significant risk of hookworm infection is anemia, secondary to loss of iron and protein in the gut. The worms suck blood voraciously and damage the mucosa. However, the blood loss in the stools is not visibly apparent. Hookworm infection is rarely fatal, but anemia can be significant in the heavily infected individuals.

The immune response generated for the control of helminthic infections is characterized by a typical Th2 cytokine profile (IL-4, IL-13), while the humoral immune response is characterized by IgE production. It is well known that human basophils exposed to parasite or byproducts, produce IL-4 and IL-13 after IgE-dependent stimulation (36). It was investigated the role of helminthic proteases and the basophil's expression of Th2 cytokines. Many of the regulatory activities of proteases may correlate with their ability to directly activate cells via protease-activated receptors (PAR). PAR may provide a link between proteolytic activity and the activation of cytokine release by basophils. Studies on the Derp1 cysteine protease demonstrated a dose-dependent manner activation of Th2 cytokines, IL-4, IL-5 and IL-13(37). These cytokines participate in the development of allergic immune responses to helminthic parasites, although the exact mechanisms involved are unknown.

More recently, the role of hookworm proteases on the function of eotaxin was investigated. Eotaxin (CCL11), is one of the main chemoattractant of eosinophils during inflammatory and allergic responses. The specific role of secretory/ excretory antigens on the regulation of eosinophil recruitment in response to CCL11 was investigated. *In vivo* studies demonstrated that pre-incubation of CCL11 with *Necator americanus* excretory/secretory products (NES) had a significant reduction in the recruitment of eosinophils. The addition of proteases inhibitors to NES prevented it. *In vitro* analysis demonstrated proteolysis of CCL11 but not CXCL8. Interestingly, it was found that a metalloprotease present in the NES, was solely responsible for the proteolytic effect (38). Apparently, *N. americanus* metalloprotease has selectivity on

CCL11 but not other cytokines such as Il-5, CXCL8 or CCL23, this would imply that under certain conditions, such as during the establishment of the parasite, proteases may have a differential modulatory effect. CCL11 is one of the major chemoattractants of eosinophils, it is known that they can degranulate toxic products to induce the expulsion of parasites from the infection site and promote the elimination of hookworms. The immune system can be modulated by proteins secreted by parasites, in this case evading the excessive recruitment of eosinophils by the cleavage of CCL11, but allowing differential cell recruitment by other cytokines or chemokines.

5. Concluding remarks

Parasite proteases are considered as potential targets for the development of novel therapeutical and as serodiagnostic agents. Some of these proteins are excretory-secretory (ES) products that facilitate invasion of host tissues, participate in the digestion of host proteins and contribute to evade the host immune responses.

Our knowledge of how these protease are capable of modulating the immune response is scarce but in steady progress. Defining their specific roles and proposing strategies to overcome their effects on the immune system may be part of the novel alternatives to parasite.

Acknowledgements

This work was supported (EGZ) by a CONACYT Grant # 33365-N. IBH was supported by a Doctoral Fellowship from CONACYT and DGEP-UNAM

References

1. Sajid M and Mckerrow J. H. 2002. Cystein proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 120: 1- 21
2. Lecaille F, Kaleta J, and Bromme D. 2002. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem.Rev.* 102: 4459-4488
3. Barret A. J. Classification of peptidases.1994. *Methods Enzymol.* 244: 1-15
4. Turk D, Guncar G, Podobnik M, Turk B. 1998. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol. Chem.* 379 (2): 137-47
5. Fuseka M, Větvičková V. 2005. Dual role of cathepsin D: ligand and protease. *Biomed. Papers* 149 (1): 43–50
6. al-Aoukaty A, Schall T. J, Maghazachi A.A. 1996. Differential coupling of CC chemokine receptors to multiple heterotrimeric G protein in human interleukin 2-activated natural killer cells. *Blood.* 87: 4255-60
7. Xanthou G, Duchesnes C. E, Williams T. J, Pease J.E. 2003. CCR3 functional responses are regulated by both CXCR3 and its ligands CXCL19, CXCL10 and CXCL11. *Eur. J. Immunol.* 33: 2241-50

8. Proudfoot A.E.I. 2006. The biological relevance of chemokine–proteoglycan interactions. *Biochemical Society Transactions*. Vol. 34, part 3
9. Himmelrich H, Parra-Lopez C, Tacchini- Cottier F, Louis J.A and Launois P. 1998. The IL-4 rapidly produced in BALAB/c mice after infection with *Leishmania major* down- regulates IL-12 receptor B2-chain expression on CD4 T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. *J. Immunol.* 161: 6156-61
10. Alves C.R. Pontes de Carvalho L.C. Souza A.L.A and Giovanni De-Simone S. 2001. A strategy for the identification of T-cell epitopes on *Leishmania* cysteine proteinases. *Cytobios*; 104. 33-41
11. Alves C.R, Benevolo-De-Andrade T.C, Alves J.L, and Pirmez. 2004. Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis. *Parasite Immunology.* 26: 127-135
12. Nakhaee A, Taheri T, Taghikhani M, Mohebbali M, Salmanian A-H, Fasel N and Rafati S. 2004. Humoral and cellular immune responses against Type I cysteine proteinase of *Leishmania infantum* are higher in asymptomatic than symptomatic dogs selected from a naturally infected population. *Veterinary parasitology.* 119: 107-123
13. Adam S. H, Thor G. T, Hviid L, Saleh H, Hazrait M, Kemp M and Kharazmi A.1994. The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T-cells. *Journal of immunology.* 152, 4542- 4548
14. Sakanari, J.A., Nadler, S.A, Chan V.J., Engel J.C., Leptak, C. and Bouvier J. 1997. *Leishmania major*: comparison of the cathepsin-L and B-like cysteine protease genes with those of other trypanosomatids. *Exp.Parasitol.* 85: 63-70
15. Buxbaum U.L., Denise H, Coombs H.G, Alexander, J. Mottram, J.C., and Scott, P. 2003. Cysteine Protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. *Journal of immunology.* 171: 3711-3717
16. De Souza L.S, Lang T, Prima. R, Hellio R. and Antoine J.C. 1995. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J. Cell. Sci.* 108:3219
17. Schulz O, Sewell H.F. and Shakib F. 1998. Proteolytic cleavage of CD25, the subunit of the human T cell interleukine 2 receptor by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J. Exp. Med.* 187: 271
18. Cameron P, McGachy A, Anderson M, Andrew P, Coombs H.G, Mottram J.C, Alexander J and Plevin R. 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania maxicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NFkB signaling pathway. *Journal of immunology.* 173: 3297-3304
19. Roychoudhury K, Dasgupta B, Sen P, Laskay T, Solbach W, De T. and Roy S. 2006. Evidence of direct interactions between the CC-chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and *Leishmania* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology.* Article in press
20. Becker I, Perez-Tamayo R., Montfot I, Alvizouri A.M. and Perez-Monfort R. 1998. *Entamoeba histolytica*: role of amebic proteinases and polymorphonuclear leukocytes in acute experimental amebiasis in the rat. *Exp Parasitology.* 67(2): 268-80
21. Perez-Tamayo R, Becker I, Montfot I, Ostoa-Saloma P, and Perez-Monfort R. 1991. Role of leukocytes and amebic proteinases in experimental rat testicular necrosis produced by *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res.* 77(3):192-6

22. Kelsal B. L. and Ravdin J.I. 1993. Degradation of human immunoglobulin A by *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 168: 1319-1322
23. Tran V.Q, Herdman D.S, Torian B.E. and Reed S.L. 1998. The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. *J. Infect Dis.* 177: 508-511
24. Reed S.L and Gigli I. 1990. Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. Initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. *J. Clin. Invest.* 86: 1815-22
25. Reed S.L, Ember J.A, Herdman D.S, DiScipio R.G, Hugli T.E, Gigli I. 1995. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J Immunol.* 1;155(1):266-74
26. Kim S.H, Azam T, Novick D, Yoon D.Y, Reznikov L.L, Buffer P, Rubinstein M and Dinarello C.A. 2001. Site-specific mutations in the mature form of human IL-18 with enhanced biological activity and decreased neutralization by IL-18 binding protein. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 98:3304-3309
27. Zhang Z, Yan L, Wang L, Seydel K. B, Li E, Ankri S, Mirelman D and Stanley S.L. 2000. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin 1-beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol. Microbiol.* 37: 5442-5548
28. Que X, Kim S.H, Sajid M, Eckmann L, Dinarello C. A, Mckerrow J. H. and Reed S. L. 2003. A surface amebic cysteine proteinase inactivates Interleukine-18. *Infection and Immunity.* 71(3): 1274-1280
29. Pertuz S, Ostoa P, Benitez I, Soldevilla G, Olivos A. and Garcia E. 2004. *Entamoeba histolytica* cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leukocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite Immunology.* 26, 237-241
30. Beltz L A, Sonnenfeld C and Kierszenbaum F. 1989. Inhibition by *Trypanosoma cruzi* of interferon-gamma production by mitogen stimulated mouse spleen cells. *Int. J. Parasitol.* 19: 555-62
31. Kierszenbaum F, Szein M.B and Beltz A. 1989. Decrease human IL-2 receptor expression due to a protozoan pathogen. *Immunol Today.* 10: 129-33
32. Szein M.B, Cuna W. R and Kierszenbaum F. 1990. *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8 and IL-2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. *Journal of Immunol.* 144: 3558
33. Kierszenbaum F, Cuna W. R, Beltz L. A. and Szein M.B. 1990. A secretion product (s) of *Trypanosoma cruzi* that inhibit proliferation and IL-2 Receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Immunology.* 144: 4000-4004
34. Stempin C, Giordanengo L, Gea S, and Cerban F. 2002. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J. Leukoc. Biol.* 72: 727-734
35. Berasain P, Carmona C, Frangione B, Cazzulo J.J, Goñi F. 2003. Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 130: 23-29
36. Redrup A. C, Howard B. P, MacGlashan Jr.D. W, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein L. M, Schroeder J. T. 1998. Differential regulation of IL-4 and IL-13 secretion by

-
- human basophiles: their relationship to histamine release in mixed leukocyte cultures. *J. Immunol.* 160: 1957–1964
37. Phillips C, Coward W R., Pritchard D. I and Hewitt R. A. 2003. Basophils express a type 2 cytokine profile on exposure to proteases from helminthes and house dust mites. *J. Leukoc. Biol.* 73: 165–171
38. Culley F. J, Brown A. Conroy D. M, Sabroe I, Pritchard D. I. and Williams T. J. 2000. Eotaxin Is Specifically Cleaved by Hookworm Metalloproteases Preventing Its Action *In Vitro* and *In Vivo*. *The Journal of Immunology*, 165: 6447–6453