



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Estrategias de resistencia de *Trypanosoma cruzi* a  
la activación del complemento**

Autora: Sara Gómez de Frutos

D.N.I.: 51492835K

Tutor: Juan José Nogal Ruiz

Convocatoria: 23 de Junio de 2016

## Índice

---

Resumen.....	2
Abstract.....	2
1.- Introducción.....	3
2.- Objetivo.....	4
3.- Materiales y Métodos.....	4
4.- Resultados.....	5
4.1. Evasión del sistema inmunitario de <i>T. cruzi</i> . Resistencia a la activación del complemento.....	5
4.1.1. Sistema del complemento.....	5
4.2. Mecanismos de evasión de <i>T. cruzi</i> de la activación del sistema del complemento. ....	7
4.2.1. Calreticulina.....	8
4.2.2. Proteína inhibidora del receptor C2 del complemento tri-funcional CRIT.....	9
4.2.3. Factor acelerador de la degradación de los tripomastigotes (T-DAF). ....	10
4.2.4. Ácido siálico y transialidasas. ....	11
4.2.5. Proteínas reguladoras del complemento (CRP). ....	13
4.2.6. Microvesículas.....	14
4.2.7 Gp 58/68.....	15
5.- Conclusiones.....	15
6.- Bibliografía.....	17

## Resumen

---

La enfermedad de Chagas, originada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, afecta a millones de personas, principalmente en América Latina. Para lograr infectar al hospedador de forma efectiva, el parásito presenta diferentes mecanismos que le permiten escapar a la acción del sistema inmunitario. Entre las barreras que debe sobrepasar se encuentra el complemento, un importante componente de la inmunidad innata que forma parte de la primera línea de defensa ante infecciones. No todas las formas del protozoo responden de la misma manera ante este sistema: mientras que los epimastigotes son susceptibles; los tripomastigotes metacíclicos, formas infectantes, son resistentes y capaces de progresar en la infección. Para ello, recurren a diferentes estrategias no del todo conocidas que actúan a distintos niveles, entre las que se encuentran la calreticulina, la proteína reguladora del complemento o el ácido siálico. Todos estos mecanismos, junto con otros factores de virulencia, hacen que *T. cruzi* logre evitar el ataque del sistema inmunitario y lo habilitan para infectar con éxito al hospedador, dando lugar a una de las parasitosis de mayor prevalencia en América Latina.

## Abstract

---

Chagas disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, affects millions of people in Latin America. In order to infect the host, *T. cruzi* evades its immune system. One of the barriers that the parasite needs to overcome is the complement system, a main mechanism of the vertebrate innate immune system against pathogen infection. But just the infection forms of *T. cruzi*, the metacyclic trypomastigotes, are able to escape from this system; in contrast, the epimastigotes are susceptible and suffer the complement lysis. The strategies used by the protozoan to get this objective, such as the calreticulin, the sialic acid or the complement regulatory protein, inhibit the complement at different steps and contribute to infection's progression.

## 1.- Introducción

---

*Trypanosoma cruzi* es el protozoo causante de la enfermedad de Chagas, una infección crónica y sistémica que afecta entorno a 6-7 millones de personas en todo el mundo, principalmente en América Latina<sup>[1]</sup>.

Su ciclo de vida se inicia cuando el vector, una chinche de la familia *Reduviidae* subfamilia *Triatominae*, pica a un hospedador vertebrado infectado e ingiere junto con su sangre tripomastigotes. Cuando alcanzan el intestino del insecto, los tripomastigotes se transforman en epimastigotes, que se multiplican por fisión binaria longitudinal. A los 10 días dan lugar en la porción distal del intestino a tripomastigotes metacíclicos. Tras una nueva ingesta de sangre, la chinche defeca. Sus heces contienen los tripomastigotes metacíclicos, que aprovechando disrupciones en la piel o a través de las mucosas penetran en el nuevo hospedador. Una vez dentro, son fagocitados por los macrófagos y atravesando la membrana de la vacuola fagocítica, se disponen en la matriz citoplasmática. Impiden la fusión lisosomal mediante el incremento del pH citoplasmático de la célula fagocítica. Los tripomastigotes tardan 3 horas en reorganizarse como amastigotes, entonces permanecen quiescentes 35 horas antes de empezar a dividirse. Los amastigotes llevan a cabo en el medio intracelular procesos de fisión binaria cada 10 horas (9 divisiones asincrónicas para producir 500 amastigotes), el 75% se transforma en tripomastigotes sanguíneos, que rompen la célula y salen al torrente sanguíneo. Estas formas se diseminan mediante la circulación y pueden infectar otros tejidos. El ciclo finaliza cuando una nueva chinche se alimenta del hospedador infectado que presenta tripomastigotes en sangre periférica<sup>[2]</sup>. Además existen otros mecanismos de transmisión no vectoriales, como las transfusiones sanguíneas o la transmisión vertical<sup>[3]</sup>, e incluso puede llegar a darse transmisión oral al ingerir alimentos o agua contaminados con heces<sup>[4]</sup>.

Originalmente la enfermedad de Chagas estaba confinada a áreas rurales y pobres de Sur y Centro América. En los últimos 20 años, gracias al control de las chinches y el estudio de los bancos de sangre, se han reducido los casos de esta patología. Tanto la incidencia como el número de muertes se han visto fuertemente disminuidas, pasando de 700.000 nuevos casos en 1990 a 41.200 en 2006 y de 50.000 a 12.500 muertes en los mismos años<sup>[1]</sup>. Sin embargo, el fenómeno de la inmigración ha hecho que aparezcan casos de infección por *T. cruzi* en regiones en las que en

tradicionalmente no estaban presentes como Norteamérica o Europa. España es, después de Estados Unidos, el país que recibe más inmigrantes infectados<sup>[3]</sup>.

El periodo de incubación tras la picadura del vector es de una o dos semanas. Los síntomas suelen ser leves e inespecíficos, incluyen fiebre, malestar general, hepatoesplenomegalia y linfocitosis atípica. En raras ocasiones aparece un nódulo característico denominado chagoma o edema palpebral (signo de Romana). La amplia mayoría de las infecciones agudas no llegan a detectarse. Menos de un 1% de los casos presenta una fase aguda severa que cursa con meningoencefalitis o miocarditis<sup>[4]</sup>.

Cuando se supera la fase aguda, la respuesta inmunitaria logra controlar la replicación del parásito y los síntomas remiten espontáneamente. Entonces se pasa a la fase crónica. La mayor parte de las personas permanecen sin sintomatología, pero quedan infectados de por vida. Se estima que un 20-30% de los infectados, tras el paso de años o décadas, acaban desarrollando la cardiomiopatía crónica de Chagas. También pueden aparecer alteraciones gastrointestinales, que afectan predominantemente al esófago, colon o ambos, y que son el resultado de daño a las neuronas intramurales<sup>[4]</sup>.

En cuanto al tratamiento, el fármaco de elección es el benznidazol, que suele curar la infección aguda y previene la aparición de de las manifestaciones crónicas<sup>[5]</sup>. Durante la fase aguda se establecen cifras serológicas de curación cercanas al 100%. Sin embargo, en la fase crónica son mucho menores, siendo mayor en menores de 12 años que en adultos<sup>[2]</sup>.

## 2.- Objetivo

---

El principal objetivo del presente trabajo es llevar a cabo una descripción de las diferentes estrategias que presenta *Trypanosoma cruzi* en la evasión al complemento, un poderoso mecanismo inmunitario capaz de eliminar microorganismos infecciosos.

## 3.- Materiales y Métodos

---

Se ha realizado una revisión bibliográfica de artículos científicos publicados en revistas y libros especializados. Para ello, hemos acudido a las fuentes bibliográficas disponibles en internet.

En particular, hemos consultado trabajos de investigación disponibles en las páginas de PubMed, Sciencedirect y ResearchGate.

## 4.- Resultados

---

### 4.1. Evasión del sistema inmunitario de *T. cruzi*. Resistencia a la activación del complemento.

La capacidad de un parásito de sobrevivir y multiplicarse en el hospedador depende en gran medida de su habilidad para inhibir o evadir la respuesta inmunitaria del mismo. Uno de los primeros obstáculos que encuentra *T. cruzi* durante la infección es la activación del complemento, un mecanismo crítico en la contención y eliminación de microorganismos patógenos que actúa tanto antes del desarrollo de la inmunidad adquirida como después<sup>[6]</sup>.

#### 4.1.1. Sistema del complemento

El sistema del complemento es un poderoso mecanismo inmunitario constituido por proteínas solubles, proteasas y receptores de unión a membrana que identifican y eliminan microorganismos infecciosos y restos celulares. Cumple distintas funciones en la respuesta inmunitaria como el reconocimiento de células extrañas, comunicación con la respuesta inmunitaria adaptativa y su activación o la remoción de restos celulares<sup>[7]</sup>.

En la actualidad se conocen tres rutas de activación del complemento: la clásica, la alternativa y la de las lectinas.

La ruta clásica se inicia con el reconocimiento de complejos antígeno-anticuerpo por la proteína C1q en una superficie celular extraña. C1q interacciona con C1r y C1s dando lugar al complejo C1. C1r activa a C1s, lo que conduce a la activación proteolítica de C4 y C2 y la formación de la convertasa C3 de la ruta clásica (C4b2a).

La ruta de las lectinas se estimula por el reconocimiento de carbohidratos de la superficie de muchos microorganismos (PAMPs, patrones moleculares asociados a patógenos) por parte de lectinas de unión a manano (MBL) y las ficolinas H y L. Estas moléculas se unen a MASPs (serán proteasas asociadas a MBL) que hidrolizan C4 y C2, generando la convertasa C3 (C4b2a).

La ruta alternativa se inicia con la hidrólisis espontánea, o por parte de las C3 convertasas de las otras rutas, de C3 nativo en ausencia de una molécula central de reconocimiento. Su punto de partida es C3b, que se fija a la superficie celular. A este fragmento se le une el factor B, que es hidrolizado por el factor D. El fragmento Bb del factor B queda unido a C3b, lo que constituye la convertasa C3 de la ruta (C3bBb).

En el caso de la ruta clásica y de la de las lectinas, la hidrólisis de C3 que genera C3b la lleva a cabo la convertasa C3 (C4b2a); mientras que la ruta alternativa la convertasa C3 que realiza esta hidrólisis es la C3bBb. C3b puede unirse a las convertasas anteriores, dando lugar a la convertasa C5 (C4b2a3b o C3bBb3b), que escinde a C5 generando los fragmentos C5a y C5b. El fragmento C5b se asocia con C6 y C7. El complejo C5bC6C7 se inserta en la membrana del microorganismo y se une a C8. Posteriormente se polimeriza C9, generándose el complejo de ataque a la membrana, que forma un poro en la misma y termina produciendo la lisis de la célula<sup>[7]</sup> (Figura 1).

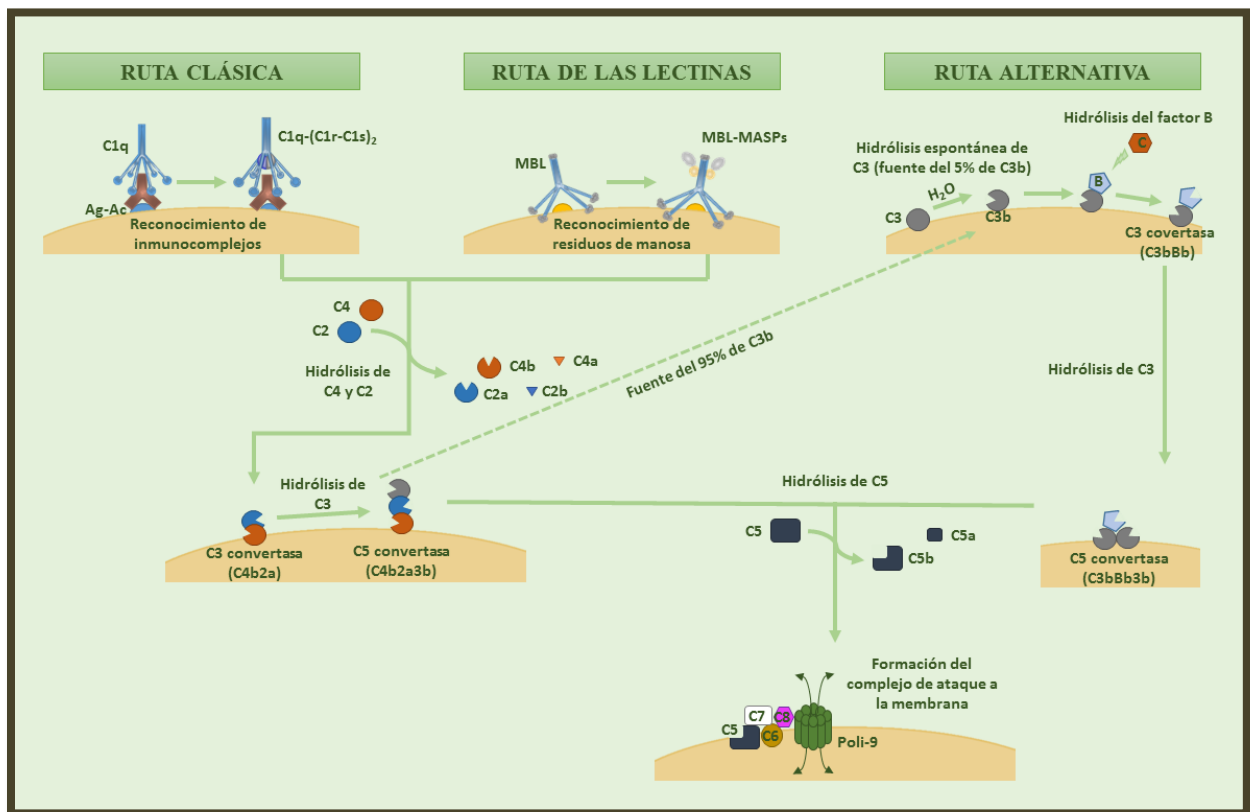


Figura 1. Esquema de las rutas de activación del Sistema del Complemento

Respecto a la actuación del complemento ante la infección por *T. cruzi*, pueden diferenciarse dos tipos de activación dependiendo del tiempo transcurrido tras la misma:

- Activación temprana: depende principalmente del reconocimiento de los PAMPs por la ruta de las lectinas. A su vez, la formación de C3b por esta ruta conduce a una activación de la ruta alternativa.
- Activación tardía: cuando el patógeno logra escapar de la ruta de las lectinas, puede seguir siendo detectado por la ruta clásica, tras la formación de anticuerpos específicos. Además, MBL también puede unirse a los anticuerpos y activar así la ruta de las lectinas. También se genera C3b, que puede dar inicio a la ruta alternativa<sup>[8]</sup>.

Existen diferencias en la sensibilidad que presenta *T. cruzi* a la acción lítica del complemento en sus diferentes estados. Se sabe que los epimastigotes son sensibles a este sistema y presentan la capacidad de activar todas las rutas del complemento<sup>[9]</sup>. Los tripomastigotes metacíclicos, por el contrario, son resistentes<sup>[7]</sup>. Sin embargo, al estudiar la respuesta de estas formas *in vitro* se observa que no todas las cepas se comportan de la misma manera. Algunas de ellas son altamente sensibles y otras altamente resistentes. *In vivo*, *T. cruzi* podría presentar estrategias de evasión al complemento que involucrasen al vector o al propio hospedador, como la inducción de la fagocitosis por parte de macrófagos o neutrófilos o la adquisición de inhibidores del complemento desde la saliva o el contenido intestinal del vector<sup>[9]</sup>.

#### 4.2. Mecanismos de evasión de *T. cruzi* de la activación del sistema del complemento.

*Trypanosoma cruzi* presenta diferentes mecanismos para evitar la activación del complemento, entre ellos:

1. Calreticulina (TcCRT)
2. Proteína inhibidora del receptor C2 del complemento tri-funcional (CRIT)
3. Proteína reguladora del complemento (CRP)
4. Factor de decaimiento de la aceleración de tripomastigotes (T-DAF)
5. Microvesículas
6. Ácido siálico y transialidasas
7. Gp 58/68



#### 4.2.1. Calreticulina

La calreticulina es una proteína de unión dependiente de calcio que se encuentra presente en numerosos organismos, como insectos, nematodos, protozoos o plantas. Los humanos también la expresan en todas sus células, exceptuando los eritrocitos<sup>[10]</sup>.

Cabe destacar el alto grado de conservación que presenta. La calreticulina humana (HuCRT) tiene una similitud de aproximadamente un 50% con la de otras especies como *T. cruzi* (TcCRT), llegando a ser del 80% en algunas regiones<sup>[10]</sup>. En todas las calreticulinas se observan unos dominios comunes: N, P y C. En el caso de los dominios N y P, la secuencia de aminoácidos se encuentra altamente conservada. Además, contiene un dominio S dividido entre el dominio N y P, relacionado con la unión a componentes del complemento. También incluye el péptido señal KDEL (KEDL en *T. cruzi*), una secuencia de retención en el retículo endoplasmático característica de proteínas que se localizan en este orgánulo. Sin embargo, se ha observado que TcCRT se transloca a la superficie del parásito<sup>[10]</sup>.

Cumple diferentes funciones: chaperona tipo lectina, almacenamiento y señalización de calcio, modulación de la expresión génica, adhesión celular, mejora de la fagocitosis mediada por C1q, inhibición de la angiogénesis y del crecimiento tumoral, inhibición de la formación del poro por parte de las células T y NK e inhibición de la ruta de activación del complemento dependiente de C1q<sup>[10]</sup>.

La HuCRT puede unirse a la región colagenosa de C1q<sup>[11]</sup> y a otros miembros del grupo de las colectinas como MBL<sup>[15]</sup>. La TcCRT también presenta la capacidad de unión a estas moléculas con la consiguiente inhibición de la ruta clásica y de las lectinas.

Los estudios realizados en este campo indican que, a diferencia de HuCRT, TcCRT se une a C1 (tanto C1q como C1s) de forma dosis dependiente<sup>[11]</sup>. La inhibición de la función enzimática de C1 por parte de TcCRT podría deberse a la interacción directa con las serínproteasas. Sin embargo, pese a que interacciona con C1s y C1r, se ha observado que TcCRT no inactiva a C1s<sup>[13]</sup>. Otro de los resultados obtenidos es que TcCRT previene la unión de C1r y C1s a C1q, pero no libera a las serínproteasas de C1 una vez se han unido a C1q<sup>[11]</sup>. Por último, la inhibición de la función del componente C1 no está relacionada con la capacidad de la calreticulina para unir calcio, ya que ocurre tanto en medios ricos como en pobres en este elemento<sup>[11]</sup>.

La interacción con los componentes de C1 da lugar a la inhibición de la ruta clásica del complemento, pero TcCRT también altera la ruta de las lectinas. No solo interfiere con la unión de MBL a la manosa<sup>[13]</sup> sino que también interacciona con la ficolina L, lo que supone una inhibición de entre 35 a 64% de la activación de la ruta<sup>[12]</sup>.

El hecho de que TcCRT se una a C1q también impide la eliminación de complejos inmunes, ya que es un proceso mediado por esta molécula. En ausencia del complemento, los complejos pueden escapar de la eliminación por parte del sistema fagocítico mononuclear y acabar en tejidos donde desatan una respuesta inflamatoria. La formación y deposición de los complejos en tejidos estarían relacionadas con la patogenia de la enfermedad de Chagas<sup>[10]</sup>.

Además, C1q y MBL se unen a células apoptóticas y estimulan su fagocitosis mediante la unión a CRT (también conocida como cC1qR) en su superficie, que a su vez se une a CD91. Tanto los tripomastigotes como los epimastigotes son capaces de fijar en su superficie C1q. Se ha observado que C1q potencia la fagocitosis de tripomastigotes por parte de fagocitos mononucleados y fibroblastos en ausencia de cantidades adicionales de C3 o de inmunoglobulinas. Por lo que puede afirmarse que la TcCRT, además de inhibir la activación del complemento, induce la fagocitosis del parásito y aumenta su infectividad. Lo mismo ocurriría con la colectina MBL, con capacidad de inducir la fagocitosis<sup>[10]</sup>.

#### 4.2.2. Proteína inhibidora del receptor C2 del complemento tri-funcional CRIT.

*T. cruzi* activa la ruta de las lectinas mediante la unión de MBL o las ficolinas H y L a su superficie. Sin embargo, los tripomastigotes que expresan en su membrana una proteína que actúa como receptor de C2, denominada CRIT (*C2 receptor inhibitor trispanning*), son capaces de inhibir la activación de esta vía y su lisis por parte del complemento<sup>[6]</sup>. Se encuentra de forma fisiológica en diferentes células humanas, como los podocitos o la musculatura lisa, y su homología con la proteína de *T. cruzi* es elevada<sup>[14]</sup>.

CRIT es una proteína transmembrana de 32 kDa. Su primer dominio extracelular del extremo N-terminal (ed1) presenta una secuencia homóloga con la cadena  $\beta$  del componente C4 del complemento, por lo que compite con éste por la unión a C2. Al producirse la unión, CRIT inhibe la activación de C2 por parte de C1s<sup>[15]</sup>.

Al llevar a cabo la secuenciación de aminoácidos, se observa que los dominios transmembrana y ed1 son casi idénticos en distintas especies, como la humana y *T. cruzi*. Los resultados del análisis genético también revelan una elevada relación entre ambos genes, lo que sugiere que parásitos humanos como *T. cruzi* o *Schistosoma* pudieran haber adquirido el gen de CRIT del propio hospedador. Según esta teoría, tanto CRIT humano como el de *T. cruzi*, descenderían de un mismo gen antecesor<sup>[17]</sup>.

Los tripomastigotes metacíclicos, formas infectantes y resistentes al complemento, presentan esta proteína. Además, se ha comprobado que los epimastigotes transgénicos que la expresan son más resistentes a la lisis mediada por el complemento por la ruta clásica y de las lectinas, pero no por la alternativa<sup>[15]</sup>.

Para estudiar de forma más precisa CRIT en *T. cruzi*, hay que tener en cuenta que *T. cruzi* se divide en dos líneas divergentes: clase I y II. La clase I presenta una transmisión silvestre o selvática e infecta a marsupiales y desdentados (osos hormigueros, armadillos y perezosos); mientras que la clase II tiene un ciclo de transmisión sinantrópica y doméstico, afectando principalmente a humanos. Como ejemplos de cada clase podrían tomarse la cepa Colombia en el caso de la clase I y la cepa Y para la II. La expresión de la proteína difiere entre los tripomastigotes de ambas cepas, así como la activación del complemento. Al comparar la sensibilidad de cada una, se ha observado que la susceptibilidad de la Colombia es mayor que la Y<sup>[15]</sup>.

#### 4.2.3. Factor acelerador de la degradación de los tripomastigotes (T-DAF).

Una de las estrategias que presentan los tripomastigotes para evitar la lisis mediada por el complemento consiste en impedir que se inicie la cascada de activación. El parásito expresa varias moléculas que actúan en esta línea, entre ellas se encuentra una glicoproteína análoga al factor acelerador de la degradación humano (DAF), que se denomina factor acelerador de la degradación de los tripomastigotes (T-DAF)<sup>[16]</sup>. DAF es una glicoproteína capaz de proteger las células del hospedador de la lisis mediada por el complemento al evitar la formación de la C3 convertasa. T-DAF se localiza en la superficie del tripomastigote e interfiere con la C3 convertasa, acelerando la regulación negativa de las rutas clásica y alternativa<sup>[17]</sup>.

T-DAF (también denominado CRP-10) de *T. cruzi* y DAF de humanos presentan un 27% de homología<sup>[17]</sup>. La proteína DAF humana está compuesta por cuatro unidades repetidas de estructura similar, denominadas repeticiones consenso cortas (SCRs), que también se encuentran en otras proteínas de unión a C3/C4 que regulan el complemento. Cada SCR contiene una secuencia de aminoácidos altamente conservada que incluye un triptófano, dos prolinas y cuatro cisteínas. Las secuencias de T-DAF abarcan 1,5 SCRs, pero no presentan las secuencias conservadas. Además, es posible que T-DAF tenga otras funciones relacionadas con la unión del ácido siálico o la actividad transialidasa, ya que presenta secuencias características de esta superfamilia<sup>[18]</sup>.

Se sabe que DAF está unido a la membrana por un anclaje de fosfatidilinositol y, sin embargo, T-DAF está presente en el líquido sobrenadante de los cultivos de tripomastigotes. Aunque no se ha llegado a una evidencia clara de que T-DAF tenga el mismo anclaje, se cree que podría ser así y que una fosfolipasa endógena podría romper el anclaje liberándolo al medio<sup>[16]</sup>.

#### 4.2.4. Ácido siálico y transialidasas.

*T. cruzi* presenta un denso glucocálix cuya composición varía dependiendo de la forma en la que se encuentre. Se observa en su superficie ácido siálico, pese a no ser capaz de sintetizarlo. Presenta este compuesto gracias a una enzima, la transialidasa (TcTS), que toma el ácido siálico de glicoconjugados del hospedador y los transfiere a mucinas del parásito. Esta actividad es crucial en la patogénesis, porque la unión de ácido siálico a la superficie del parásito permite su evasión de la activación del complemento<sup>[19]</sup>.

Cabe destacar que la actividad de la TcTS en epimastigotes no es más que el 17% de la que tiene en tripomastigotes y que su estructura no es la misma en los dos estados. La localización donde se encuentran los epimastigotes, el intestino medio del triatomino, no es tan rica en conjugados del ácido siálico como lo es el entorno del tripomastigote, por lo que se explica en parte la diferencia en la actividad de la enzima<sup>[19]</sup>.

TcTS forma parte de una gran familia de proteínas cuyos miembros pueden clasificarse en cuatro grupos en función de la homología de su secuencia y sus funciones. Las TS activas, denominadas SAPA (*shed acute-phase antigen*), expresadas por los tripomastigotes y los

epimastigotes, forman parte del grupo I. El grupo II está compuesto por glicoproteínas de superficie gp85 implicadas en el ataque y adhesión a células del hospedador. Dentro del grupo III destaca FL-60, una proteína con capacidad de inhibir la ruta clásica y la alternativa del complemento. El grupo IV incluye proteínas que presentan una secuencia característica de la familia (VTVxNVxL), aunque todavía no se conoce bien su función. Los últimos estudios de secuenciación han demostrado que la familia es aún más compleja y podría tener más grupos y subgrupos<sup>[20]</sup>.

Se sabe, por estudios de cristalografía, que TcTS consta de dos dominios: el extremo N-terminal con el dominio catalítico unido por una hélice  $\alpha$  al dominio C-terminal, tipo lectina, que no interviene en la actividad de la enzima. La estructura del dominio catalítico es similar a la de otras sialidasas, pero presenta ciertas diferencias que podrían explicar las distintas funciones que puede desempeñar<sup>[19]</sup>.

A su vez, tiene dos centros activos:

- Sitio de unión al ácido siálico. Todas las sialidasas presentan este centro, pero en el caso de TcTS se observan algunas particularidades.
- Sitio de unión a la galactosa.

También se ha observado que, pese a que la transialidasa haya perdido su actividad catalítica, sigue siendo capaz de unirse al ácido siálico o a la galactosa, funcionando como una lectina. De hecho, hay una superfamilia de transialidasas que contienen el dominio FLY con gran capacidad de unión a células epiteliales. Esta afinidad podría estar relacionada con el tropismo a la vasculatura del corazón. Existe incluso una transialidasa (ASP-1), expresada principalmente en amastigotes, que no presenta actividad transialidasa ni se une al ácido siálico<sup>[19]</sup>.

La TcTS está anclada a la membrana del parásito por GPI. Gracias a la actuación de una fosfolipasa puede liberarse al torrente sanguíneo y liberar ácido siálico que se puede unir a las mucinas del parásito, con el consiguiente efecto disuasorio de la respuesta inmunitaria<sup>[19]</sup>.

La presencia de ácido siálico en la superficie supone una ventaja para el parásito:

- En su forma de epimastigote el ácido siálico interviene en la adhesión a la ampolla rectal del triatomino.

- Protege al tripomastigote de la acción del complemento en el hospedador inhibiendo la ruta alternativa de activación.
- Interviene en la adhesión e invasión por parte del tripomastigote.
- Interviene en el escape de la vacuola parasitófora<sup>[19]</sup>.

Respecto al efecto que tiene la presencia del ácido siálico en la superficie del parásito sobre el complemento, se ha comprobado que disminuye su activación. De hecho, cuando se trata al tripomastigote con sialidasas y posteriormente se estudia el efecto del complemento, se observa que aumenta la lisis en relación a aquellos que no habían sido tratados en un 5% <sup>[20][21]</sup>. Además, si también se usa un suero humano que no presenta ácido siálico, el porcentaje de parásitos lisados asciende entre un 5 y 24% respecto a la cifra anterior, ya que la transialidasa no puede tomar el compuesto de glicoconjugados humanos <sup>[21]</sup>.

#### 4.2.5. Proteínas reguladoras del complemento (CRP).

Las CRPs son glicoproteínas de membrana ancladas mediante GPI con capacidad de inhibir la ruta clásica y la alternativa del complemento<sup>[6]</sup>.

Están presentes en los tripomastigotes pero no en los epimastigotes. Sin embargo, cuando se induce su expresión en estos últimos se observa que se protegen frente al complemento<sup>[6]</sup>.

El genoma de *T. cruzi* contiene múltiples copias de CRP cuyos genes comparten una secuencia similar a la superfamilia de las transialidasas (TS). Dentro de las transialidasas, las CRPs son uno de las tres subfamilias con escasa actividad TS <sup>[22]</sup>.

En función de los estudios de secuenciación, las CRPs de *T. cruzi* pueden dividirse en dos grupos: HSG y LSG. Ambos son funcionales, es decir, regulan la ruta alternativa del complemento. Puesto que los dos tercios más próximos al extremo amino terminal de estas proteínas presentan mayor similitud, cabe esperar que la actividad reguladora del complemento resida en esta región. Además, también se conservan en estos dos tercios, cuatro sitios de N-glicosilación, así como la distancia entre los mismos. Dado que se ha demostrado que la inhibición de la N-glicosilación disminuye la unión de CRP a C3b<sup>[20]</sup>, el mantenimiento de los sitios de N-glicosilación del extremo amino terminal también apoyaría la teoría de que es esta zona la que tiene actividad reguladora del complemento. En el extremo carboxilo terminal se observa mayor grado de diversidad, por lo que

se piensa que no interviene en la unión a C3b y que podría actuar extendiendo el dominio funcional más allá de la membrana, como ocurre en DAF. Esta suposición se sustenta en el hecho de que la región es rica en aminoácidos alifáticos, hidrofóbicos, y que contiene varios sitios de O-glicosilación<sup>[22]</sup>.

El proceso por el que CRP regula el complemento no es del todo conocido. Se sabe que se une a C3b y C4b mediante interacciones no covalentes. La unión de CRP a los componentes del complemento podría ser una diana farmacológica para el desarrollo de una vacuna experimental frente a *T. cruzi*<sup>[22]</sup>.

#### 4.2.6. Microvesículas

Los tripomastigotes metacíclicos inducen en las células sanguíneas la liberación al medio de fragmentos de membrana plasmática en forma de microvesículas. El proceso ocurre rápido, tan solo unos minutos tras el contacto parásito-hospedador, y es calcio dependiente. Estas microvesículas son capaces de formar un complejo en la superficie del parásito con la convertasa C3, lo que da lugar a su estabilización e inhibición y aumenta la supervivencia de *T. cruzi*. Además, incrementan la capacidad para invadir células, gracias a que transportan TGF- $\beta$ , una citoquina que podría aumentar la capacidad de invasión de células epiteliales y cardíacas, y también podría contribuir en la fibrosis durante la fase aguda de la infección<sup>[24]</sup>.

El mecanismo por el cual los tripomastigotes pueden producir la liberación de las microvesículas es aún desconocido, aunque es posible que gp82 y la oligopeptidasa B del parásito estén involucradas, ya que inducen un incremento transitorio de calcio intracelular en las células del hospedador<sup>[24]</sup>.

Se ha observado que las microvesículas pueden unirse a moléculas de activación del complemento como C1q, C3b, C4b y las ficolinas L y H, aunque no las inhiben, por lo que no impiden el reconocimiento celular por parte del complemento. Sin embargo, sí que evitan el depósito del C3b de la ruta clásica y de las lectinas, en un 62 y 56%, respectivamente. Y en menor medida de la ruta alternativa en un 37%<sup>[24]</sup>.

Las microvesículas se unen a la convertasa C3 de la vía clásica (C4b2a) en la superficie del tripomastigote e inhiben la hidrólisis y activación del componente C3. La inhibición del

complemento a este nivel tiene varias consecuencias: inhibe la lisis mediada por el complemento en todas sus rutas, no se generan las anafilotoxinas C3a y C5a (importantes en el reclutamiento de células del sistema inmunitario) y también se altera la opsonización, que media la fagocitosis durante la infección<sup>[24]</sup>.

No solo *T. cruzi* incrementa los niveles de microvesículas, también se han encontrado niveles altos en situaciones como embarazo, malaria, trombosis o cáncer. La liberación de microvesículas puede estar inducida por células monocíticas de sangre periférica. En el caso de los parásitos, las células monocíticas de sangre periférica migran al sitio de infección, lo que explicaría las elevadas concentraciones de microvesículas en esta localización <sup>[24]</sup>.

#### 4.2.7 Gp 58/68.

*Trypanosoma cruzi* expresa en su superficie una glicoproteína de peso molecular 58 kDa en su estado no reducido y 68 kDa en su estado reducido, gp 58/68, que actúa como receptor de fibronectina/colágeno <sup>[25]</sup>

Gp 58/68 es capaz de inhibir de manera dosis dependiente la formación de la convertasa C3 de la ruta alternativa del complemento, por lo que contribuye a la resistencia a la lisis de los tripomastigotes. Actúa uniéndose al factor B y evitando su unión al componente C3b que se encuentra fijado a la superficie del parásito <sup>[25]</sup>.

## 5.- Conclusiones

---

*T. cruzi* es capaz de evadir mediante diferentes estrategias una de las primeras barreras que ofrece el cuerpo humano ante una infección, el sistema del complemento. Esta capacidad de resistencia unida a otros factores de virulencia, como sistemas de detoxificación, o moléculas de adhesión que favorecen la invasión celular o el escape del fagolisosoma <sup>[10]</sup>, hacen que el parásito lleve a cabo el proceso de infección con éxito.

Los mecanismos que *T. cruzi* presenta para evadir al sistema del complemento actúan sobre distintos puntos del mismo: impiden la formación de la convertasa C3 o la inhiben, protegen frente



a la deposición de componentes como C3 sobre la superficie del parásito o mimetizan moléculas del propio hospedador.

A su vez, las estrategias que permiten a *T. cruzi* escapar al sistema del complemento, y por lo tanto a su lisis, también son susceptibles de convertirse en dianas farmacológicas y puntos de actuación para el desarrollo de vacunas. Sin embargo, la mayor parte de las tácticas desarrolladas por el protozoo no se entienden completamente, se necesitaría conocerlas en mayor profundidad para poder llegar a establecer una estrategia terapéutica que permitiese bloquear alguna de ellas con la consiguiente activación del complemento.

## 6.- Bibliografía

---

1. WHO: World Health Organization [Internet]. [Actualizado en Marzo de 2016; citado 4 Abril 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/#>
2. Muro A, López Abán J, Ternavasio de la Vega H.G., Pérez Arellano, J.L. “Infecciones por protozoos flagelados hemotisulares II. Enfermedad de Chagas. Tripanosomosis africana” *Medicine* 2010; 10 (54): 3632-3641
3. Rassi A, Marín-Nieto J.A. “Chagas disease” *Lancet* 2010; 375: 388-402
4. Bern C, M.D., M.P.H. Chaga’s disease. *N ENGL J MED.* 2015; 373: 456-466
5. Pinto AY, Ferreira AG Jr, Valente Vda C, Harada GS, Valente SA. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon región of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Rev Panam Salud Publica* 2009; 25: 77-83
6. Osorio L, Ríos I, Gutiérrez B, González J. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes and infection* 14 (2012) 1390-1402
7. Tapia V, Galdames P, Ramírez G. Mecanismos de evasión del sistema del complemento utilizados por *Trypanosoma cruzi*. *Avances en Ciencias Veterinarias* 2012 V27 N°2 10-19
8. Cestari I, Evan-Osses I, Schlapbach J, de Messias-Reason I, Ramirez M. Mechanism of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. *Molecular immunology* 53 (2013) 328-334
9. Cestari I, Ramirez MI. Inefficient Complement System Clearance of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes Enables Resistant Strains to Eukaryotic Cells. *PLoS ONE* 2010 5(3): e9721

10. Ferreira V, Molina MC, Valck C, Rojas A, Aguilar L, Ramírez G. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Molecular Immunology* 40 (2004) 1279-1291
11. Valck C, Ramírez G, López N, Ribeiro CH, Maldonado I, Sánchez G. Molecular mechanism involved in the interaction of the first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* calreticulin. *Molecular immunology* 47 (2010) 1516-1521
12. Sosoniuk E, Vallejos G, Kenawy H, Gaboriaud C, Thielens N, Fujita T. *Trypanosoma cruzi* calreticulin inhibits the complement lectin pathway activation by direct interaction with L-Ficolin. *Molecular Immunology* 60 (2014) 80-85
13. Ramírez G, Valck C, Molina MC, Ribeiro CH, López N, Sánchez G. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: A novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite Surface and promotes infectivity. *Immunobiology* 216(2010) 265-273
14. Inal JM, Hui KM, Miot S, Lange S, Ramírez MI, Schneider B. Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning: A Novel Human Complement Inhibitory Receptor. *J Immunol* 2005; 174:356-366
15. Cestari I, Evan-Osses I, Freitas JC, Inal JM, Ramírez MI. Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning Confers an Increased Ability to Resist Complement-Mediated Lysis in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Infectious Disease* 2008; 198:1276-1283
16. Joiner KA, Dias da Silva W, Rimoldi MT, Hammer CH, Sher A, Kipnis TL. Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertases. *The Journal of Biological Chemistry* 1988; 263: 11327-11335
17. Tambourgi DV, Kipnis TL, Dias da Silva W, Joiner KA, Sher A, Heath S. A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated

- complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. *Infection and immunity* 1993; 69: 3656-3663
18. Tomlinson S, Raper J. Natural human immunity to trypanosomes. *Parasitology Today* 1998; 14: 354-359
  19. Giorgi ME, de Lederkremer RM. Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. *Carbohydrate Research* 2011; 346: 1389-1393
  20. Norris K, Schrimpf JE. Biochemical analyses of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun* 1994 62:236-243
  21. Cestari I, Evan-Osses I, Freitas JC, Inal JM, Ramírez MI. Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning Confers an Increased Ability to Resist Complement-Mediated Lysis in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Infectious Disease* 2008; 198:1276-1283
  22. Beuche M, Norris KA. Sequence Diversity of the *Trypanosoma cruzi* Complement Regulatory Protein Family. *Infection and Immunity* 2008 78: 750-758
  23. Cestari I, Ansa-Addo E, Deolindo P, Inal JM, Ramirez I. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *J Immunol* 2012; 188:1942-1952
  24. Fischer E, Ouaiissi MA, Velge P, Cornette J, Kazatchkine MD. Gp 58/68, a parasite component to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunology* 1988; 65: 299-303.