Vacunas anti Try*panosoma cruzi*

Vaccines against *Trypanozoma cruzi*

Silvia Inés Cazorla, Marina Nadia Matos, Natacha Cerny, Andrés Sánchez Alberti, Augusto Bivona, Celina Morales, Emilio Luis Malchiodi.

IDEHU (CONICET-UBA), FFy B, UBA. IMPaM (CONICET-UBA), Fmed, UBA. Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Fmed, UBA.

Palabras Clave: Enfermedad de Chagas, Vacunas experimentales, Vacuna multicomponente

La enfermedad de Chagas tradicionalmente endémica en 21 países de Centro y Sudamérica, se ha extendido a regiones urbanas, y no endémicas de América del Norte y Europa, un fenómeno conocido como la globalización de la enfermedad de Chagas. Los agentes quimioterapéuticos para su tratamiento, tienen limitada efectividad y no son inocuos, no existiendo vacunas seguras y efectivas para la prevención y/o tratamiento de esta parasitosis. Más aún, la exploración de vacunas contra *T. cruzi* ha sido evitada debido al temor de que la inmunización podría exacerbar, más que prevenir, la enfermedad. Sin embargo, crecientes evidencias indican que es la persistencia del parásito en los tejidos infectados, y no la respuesta inmune inducida por él, lo que mejor se correlaciona con la inducción y mantenimiento del proceso infeccioso.

En la búsqueda de una respuesta immune protectiva frente a la infección por el parásito, seleccionamos proteínas clave para la supervivencia del parásito y para el desarrollo de la infección, cuya capacidad inmunoprotectiva analizamos en combinación con adyuvantes de última generación y utilizando diferentes vías de inoculación.

Aspectos destacados de la cruzipaína (Cz), principal cisteína proteasa de *T. cruzi*, en la vida parasitaria, la señalan como un blanco potencial para la generación de una respuesta inmune protectiva. Como primer paso analizamos la capacidad inmunoprotectora de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium atenuada AroA como sistema de vehiculización “delivery system” del ADN de Cz (SCz). Además, con el objeto de optimizar la respuesta inmune desencadenada por una vacuna basada en el ADN, probamos la coadministración de *S*Cz y de *Salmonella* transportando el gen del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF), así como protocolos de “Prime-Boost” en donde ratones inmunizados con dos dosis de SCz, recibían luego dosis de refuerzo de Cz recombinante (rCz) coadministrada con ODN-CpG o MALP-2 (un agonista de TLR2/6). Observamos que los animales que recibieron cuatro dosis de *S*Cz por vía oral, desencadenaron una respuesta principalmente a nivel de mucosas medida en términos de IgA secretora y proliferación de tejidos linfoides asociados a mucosa gástrica, con baja respuesta a nivel sistémico. Por el contrario, aquellos ratones que recibieron dos dosis de SCz seguidas por un “boost” con rCz-ODN-CpG desencadenaron una fuerte respuesta inmune a nivel sistémico en términos de IgG específicas, proliferación de esplenocitos, secreción de IFN-γ e hipersensibilidad retardada. Al desafío con tripomastigotes todos los ratones, independientemente del plan de inmunización, mostraron una disminución significativa de la parasitemia respecto al grupo control. La inmunoprotección conferida por *S*Cz, fue abolida por depleción de las células T tanto CD4+ como CD8+. La respuesta inmune fue efectiva incluso durante la fase crónica de la infección por *T. cruzi*. Los ratones inmunizados presentaron una disminución del daño tisular reflejado en estudios histopatológicos, y de enzimas marcadoras de daño muscular (CK, AST y LDH). La capacidad adyuvante de *Salmonella* fue eficiente en la estimulación de una respuesta inmune protectiva, que no logramos mejorar por la adición del plásmido que codifica al GM-CSF, ni tampoco de rCz coadyuvada con ODN-CpG o MALP-2.

Paralelamente ensayamos la capacidad inmunoprotectiva de Tc52, una glutatión transferasa de *T. cruzi* implicada en la invasión celular, con propiedades inmunomoduladoras, y conservada entre diferentes cepas del parásito. Tc52 posee dos dominios uno N-terminal, que posee el sitio activo, y otro C-terminal, de función desconocida. Nos propusimos el diseño de una vacuna profiláctica contra la infección por *T. cruzi*, utilizando el ADN codificante para Tc52 y sus dominios, con el objetivo de identificar la menor porción de la molécula necesaria para generar inmunoprotección. Inicialmente estudiamos la respuesta inmune y la protección generada al inmunizar por vía oral con el ADN codificante para Tc52, N-term y C-term, transportados por *Salmonella* (*S*Tc52, *S*N-term y SC-term). Los ADN codificantes para los tres antígenos indujeron respuestas inmunes humoral y celular específicas para Tc52 en el modelo murino, protegiendo frente a la infección tanto en fase aguda como crónica. No obstante, las inmunizaciones con *S*Tc52 y *S*N-term generaron mayor protección respecto al grupo que recibió SC-term, en términos de parasitemia, sobrevida y pérdida de peso corporal.

Finalmente, en un intento de mejorar las respuestas protectivas generadas por Cz y Tc52 en forma individual, diseñamos un vacuna multicomponente mediante la coadministración de *S*Cz+*S*Tc52+*S*Tc24. Tc24 es una proteína ligadora de Ca++, que se asocia a los rafts lipidícos de la membrana flagelar de *T. cruzi.* Tc24 jugaría un rol clave en el proceso de la movilidad flagelar, y por lo tanto en la invasión de tripomastigotes a la célula huésped. Ratones inmunizados con *S*Cz+*S*Tc52+*S*Tc24 presentaron una fuerte respuesta inmune de Ac frente a cada uno de los antígenos, respecto a los ratones que recibieron los antígenos en forma individual. Más importante aún, estos anticuerpos mediaron la lisis de tripomastigotes, e inhibieron de la invasión de tripomastigotes a células vero. Luego del desafío con el parásito, ratones que recibieron la vacuna multicomponnete, presentaron bajas parasitemias. La pérdida de peso luego de la infección, fue observada en todos los ratones, excepto en aquellos que recibieron *S*Cz+*S*Tc24+*S*Tc52. La inmunización con *S*Cz+*S*Tc24+*S*Tc52 limitó además la injuria que *T. cruzi* provoca en músculo esquelético, mientras que los ratones controles presentaron focos inflamatorios, necrosis y nidos de amastigotes. A los 100 dpi, observamos que los niveles séricos de las enzimas asociadas a daño muscular fueron significativamente menores en los grupos inmunizados con *S*Cz+*S*Tc24+*S*Tc52 respecto al grupo control.

La vacuna multicomponente mejoró todos los parámetros analizados en comparación con la inmunización con los antígenos en forma individual, poniendo de manifiesto los beneficios de una vacuna multiantigénica. Desafortunadamente, dada la capacidad del parásito de evadir la respuesta inmune y sobrevivir en un hospedador inmunocompetente, es poco probable que una vacuna contra *T. cruzi* sea efectiva en conferir inmunidad esterilizante. La vacuna multiantigénicas generó una respuesta inmune contra un amplio espectro de antigénicos involucrados en diversos mecanismos de invasión y rutas metabólicas, lo que permitió un mejor control de la infección.