

Simposio

INMUNOLOGÍA DE LA TOXOPLASMOSIS

Immunity in toxoplasmosis, the new players

Ermanno Candolfi, Alexander Pfaff, Julie Brunet

Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Toxoplasma gondii is an extraordinarily successful intracellular parasite, infecting almost 30% of humans worldwide. Its infection is an important cause of central nervous system and ocular disease, both in immunocompromised and in certain immunocompetent populations. Oral infection with *Toxoplasma* sporozoites or bradyzoites leads to the rapid spread of quickly replicating cytolytic tachyzoites throughout the whole body.

Toxoplasma easily crosses the blood-retina, -brain and placental barriers. Although parasite-mediated host cell lysis is probably the principal cause of tissue destruction in immunodeficiency states, hypersensitivity and inflammatory responses may underlie severe disease in otherwise immunocompetent individuals. The acute phase of infection lasts for less than around ten days. The parasite causes a very strong type-1 response focused on the interferon-gamma secreted by the T lymphocytes crucial in pathogen clearance. This immune response limits the tissue extension of the parasite, ensuring the survival of the host, but, paradoxically, also aiding the survival of the parasite by converting it into a bradyzoite, an intracellular

quiescent resistant form persisting in the muscle and brain tissues.

The outcome of *Toxoplasma* infection is highly dependent on the immune status of the patients but also on host genetic background and on allelic differences in the large number of effector molecules which the parasite secretes into the host cell which crucially determine the resistance and susceptibility to the various *Toxoplasma* strains.

We will examine the role of CD4+ T cells in systemic and local immunopathology, especially in the eye, associated with *Toxoplasma* infection in relation to the virulence of the infecting strains. We also discuss the ambivalent and sometimes pathogenic roles of cytokines produced by T helper (Th) 1 cells, such as interferon-gamma and the role of newly described players such as Th17 cells, as well as the protective and homeostatic roles of interleukin (IL)-10, transforming growth factor- β and IL-27.

Finally we will try to understand how *Toxoplasma* promotes its survival by evading intracellular microbicidal killing activities by deploying virulence determinants, which are able to disable inducible immunity.



Immunomodulation in ocular toxoplasmosis

Alejandra De la Torre

Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropical, Université de Strasbourg, France;
Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Ocular toxoplasmosis is the most common cause of posterior uveitis (1). It can cause visual impairment and blindness (1,2). It affects patient's quality of life (4), and produces irreversible sequelae (1). Although it is a typical recurrent disease, we still do not know how to avoid recurrences or why they are produced (5). It does not exist an ideal treatment, and those we are applying have controversial efficacy (6).

Considering these circumstances, the main challenges we have today are to really understand the immunopathology (7), how to limit the damage, how to avoid sequelae, how to prevent recurrences, and whether it is possible to develop a new treatment based on immunomodulation more efficient than the current one. Thus, it is essential to look for immune-based intervention supported by a better clinical and pathophysiological understanding that

can lead to more effective strategies to prevent and treat ocular toxoplasmosis.

Treatments with cytokines or anti-cytokines could be considered, with a better understanding of the immune response nature. Several studies showed that Th2 involvement in ocular toxoplasmosis is important in humoral response, Th1 participation plays an important role in limitation of parasite proliferation (8,9), and the role of Th17 is probably related with retinal lesions development.

An additional issue has emerged recently when comparative clinical series have been analyzed between continents. A comparative prospective cohort study of congenitally infected children in Brazil and Europe found that Brazilian children presented eye lesions that were larger, more numerous, and more likely to affect the part of the retina responsible for central vision, compared with their counterparts in Europe (10). Additionally, parasite genotyping indicates that a different parasite strain is responsible for disease in Europe and in South America (11). Differences between strains may be an explanation for the high incidence and rate of complications in South American children compared with those in Europe (11).

Previous and recent (12, De la Torre, *et al.*, 2011, unpublished) comparative data found significant differences in immunological response between South American and European patients with ocular toxoplasmosis. These results support the notion that South American patients should be treated differently to the standard European protocols (13).

In our recent studies, cytokine assays in the aqueous humor showed up-regulation of inflammatory responses in European patients, notably IL-17, which we did not observe in Colombian patients. In a new established mouse model of intraocular tachyzoite injection (Sauer, A, *et al.*, unpublished data), parasite multiplication and pathology showed similar differences between type II and atypical *T. gondii* strains as in human infections. Production of IL-17 and other inflammatory markers, like IL-6, MCP-1 and the Th17 transcription factor ROR γ t was observed upon infection with the type II PRU strain, but much less with the atypical LEF strain.

To establish the role of Th17 responses in PRU infection, intravitreal co-injection of anti IL-17A antibody was done. With this, clinical damage and retinal inflammation were markedly diminished. Notably, IL-17A neutralization also diminished parasite proliferation. The cytokine

and mRNA patterns showed an up-regulation of Th1 responses, particularly IFN- γ production. As IFN- γ is a well-established anti-parasitic factor, it is crucial to study its role in relation to IL-17A. Neutralization of IFN- γ at the same time as IL-17A restored parasite multiplication, but, at the same time, also re-established pathology. Then, IL-17A exerts its anti-parasitic and pathological effects at least partly via IFN- γ production.

In conclusion, the detrimental role of IL-17A has being established in ocular toxoplasmosis (Sauer, *et al.*, unpublished data). Neutralization of this cytokine *in situ* could be an effective means to control pathology without interfering with anti-parasitic mechanisms. Furthermore, there seems to be strain-specific differences in IL-17 induction.

References

- Holland GN. Ocular toxoplasmosis: A global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *Am J Ophthalmol.* 2003;136:973-88.
- De LaTorre A, López-Castillo CA, Gómez-Marín JE. Incidence and clinical characteristics in a Colombian cohort of ocular toxoplasmosis. *Eye.* 2009;23:1090-3.
- De La Torre A, González G, Díaz-Ramírez J, Gómez-Marín JE. Screening by ophthalmoscopy for *Toxoplasma* retinochoroiditis in Colombia. *Am J Ophthalmol.* 2007;143:354-6.
- De La Torre A, González, Montoya-Gutiérrez JM, Marín-Arango V, Gómez-Marín JE. Quality of life assessment in ocular toxoplasmosis. *Ocul Immunol Inflamm.* 2011, en prensa.
- de La Torre A, Ríos-Cadavid AC, Cardozo-García CM, Gomez-Marín JE. Frequency and factors associated with recurrences of ocular toxoplasmosis in a referral centre in Colombia. *Br J Ophthalmol.* 2009;93:1001-4.
- Stanford MR, Gilbert RE. Treating ocular toxoplasmosis: Current evidence. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:312-5.
- Garweg JG, Candolfi E. Immunopathology in ocular toxoplasmosis: Facts and clues. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:211-20.
- Gaddi PJ, Yap GS. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunol Cell Biol.* 2007;85:155-9.
- Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, Mahdi RM, Clarke GL, Nussenblatt RB, et al. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med.* 2007;13:711-8.
- Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, Wallon M, *et al.* for The European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT) ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2:e277.

11. Gómez-Marín JE. *Toxoplasma* strain nomenclature. J Infect Dis. 2009;200:1012.
12. Garweg JG, Ventura AC, Halberstadt M, Silveira C, Muccioli C, Belfort RJ, *et al.* Specific antibody levels in the aqueous humor and serum of two distinct populations of patients with ocular toxoplasmosis. Int J Med Microbiol. 2005;295:287-95.
13. Sauer A, de La Torre A, Gómez-Marín J, Bourcier T, Garweg J, Speeg-Schatz C, *et al.* Prevention of retinochoroiditis in congenital toxoplasmosis: Europe versus South America. Pediatr Infect Dis J. 2011.



Prospectos de péptidos como candidatos de vacunas en toxoplasmosis

Néstor Iván Cardona

Grupo de Estudio en Parasitología Molecular, Centro de Investigaciones Biomédicas,
Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

La inmunidad protectora contra patógenos causantes de diferentes enfermedades infecciosas se logra luego de la inducción de una respuesta inmunitaria celular y humoral. Éste es el principal objetivo en la búsqueda de un candidato para la vacuna. Recientemente, una de las estrategias que se están evaluando en la búsqueda de candidatos para vacunas es el uso de péptidos sintéticos de proteínas constitutivas que, por lo general, se encuentran en la superficie de los patógenos o hacen parte de los procesos de invasión a la célula huésped.

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular capaz de infectar gran variedad de mamíferos y aves. Aunque la infección en humanos inmunocompetentes es, generalmente, asintomática, la toxoplasmosis presenta serios problemas médicos como la toxoplasmosis ocular. La infección durante el embarazo puede resultar en complicaciones neurológicas y oculares del feto, por lo que se considera como un problema de salud pública.

La necesidad de identificar un candidato para la vacuna contra esta infección, que permita activar una respuesta protectora y generar memoria, se hace evidente, ya que hasta el día de hoy no existe ningún tipo de agente quimioterapéutico que cura o impida la infección en el humanos.

En búsqueda de un candidato para la vacuna se han reportado en la literatura científica varias estrategias, entre las que se incluye el uso de péptidos sintéticos que corresponden a proteínas secretoras y de superficie de *T. gondii* (SAG, GRA6 y ROP18). En nuestro laboratorio se está trabajando con péptidos de la proteína P30 de *T. gondii*, la cual es el antígeno mayor de superficie y contra la que va dirigida la mayor parte de la respuesta inmunitaria dependiente de anticuerpos. Dos estudios independientes en ratones y datos nuestros en sueros humanos, coinciden en que de todos los posibles péptidos lineales de la

proteína P30 de *Toxoplasma*, el comprendido entre los aminoácidos 301 a 319 (péptido 2017) es el que induce una mayor respuesta humoral e, igualmente, una buena protección ante un reto letal en el ratón. Esta estrategia de mapeo antigénico ha permitido determinar en el ratón, que algunos péptidos inducen sólo respuesta humoral sin inducir protección y otros inducen protección sin respuesta humoral, y por ello, el péptido 2017 es notable por poseer ambas características.

La utilización de péptidos sintéticos como herramienta para encontrar candidatos para la vacuna se ve como una metodología que representa múltiples ventajas, entre las cuales vale citar algunas como:

- a) los péptidos sintéticos producidos por varios métodos como HPLC o espectroscopía de masas y otras están libres de contaminantes como endotoxinas,
- b) se pueden producir a un costo razonable y en grandes concentraciones,
- c) los productos liofilizados pueden permanecer estables a temperatura ambiente y por largos periodos, y
- d) se pueden modificar para lograr o aumentar la respuesta inmunitaria y la protección en los huéspedes.

Lecturas recomendadas

1. Blanchard N, González F, Schaeffer M, Joncker NT, Cheng T, Shastri AJ, *et al.* Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. Nat Immunol. 2008;9:937-44.
2. Cardona N, *et al.* *Toxoplasma gondii*: P30 peptides recognition pattern in human toxoplasmosis. Exp Parasitol. 2009 Oct;123(2):199-202
3. Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J Immunol. 1991;146:286-92.

4. Golkar M, Shokrgozar MA, Rafati S, Musset K, Assmar M, Sadaie R, *et al.* Evaluation of protective effect of recombinant dense granule antigens GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant against *Toxoplasma* chronic infection in mice. *Vaccine*. 2007;25:4301-11.
5. Henríquez FL, Woods S, Cong H, McLeod R, Roberts CW. Immunogenetics of *Toxoplasma gondii* informs vaccine design. *Trends Parasitol*. 2010, en prensa.
6. Jongert E, *et al.* Vaccines against *Toxoplasma gondii*: Challenges and opportunities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2009;104:252-66.
7. Kato M, *et al.* Reactivity of synthetic SAG1 (p30) peptide sequences with RH, S273 and Beverley strain-induced anti-*Toxoplasma gondii* antibodies. *Pathobiology*. 2007;74:50-6.
8. Patarroyo ME, Bermúdez A, Patarroyo MA. Structural and immunological principles leading to chemically synthesized, multiantigenic, multistage, minimal subunit-based vaccine development. *Chem Rev*. 2011;111:3459-07.
9. Rothbard JB. Synthetic peptides as vaccines. *Biotechnology*. 1992;20:451-65.
10. Siachoque H, *et al.* *Toxoplasma gondii*: Immunogenicity and protection by P30 peptides in a murine model. *Exp Parasitol*. 2006;114:62-5.
11. Tan TG, *et al.* Identification of *T. gondii* epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. *Vaccine*. 2010;28:3977-89.
12. Zhang YL, Dong C. MAP kinases in immune responses. *Cell Mol Immunol*. 2005;2:20-7.



Paradoja inmunológica en la toxoplasmosis congénita

María Dolores Correa, Claudia Rico-Torres, Irma Cañedo-Solares, Luz Belinda Ortiz-Alegría,
Heriberto Caballero-Ortega, Ricardo Figueroa-Damián*, C. López-Candiani

Instituto Nacional de Pediatría e *Instituto Nacional de Perinatología, Secretaría de Salud,
México, D.F., México

Toxoplasma gondii es un protozoario que puede ocasionar infección congénita. La probabilidad de transmisión y la enfermedad dependen de varios factores, entre ellos, la dosis infecciosa y la virulencia del parásito, así como la respuesta inmunitaria de la madre y del feto.

Se han encontrado 12 haplogrupos de *T. gondii* a nivel mundial (1-3). Aunque no hay una relación definitiva entre el linaje genético del parásito y la transmisión vertical o la enfermedad en seres humanos, existen algunas tendencias que se pueden sugerir a partir de estudios en Europa: no se han aislado cepas de tipo 1 (comúnmente virulentas en ratón) de recién nacidos asintomáticos; sin embargo, también se les ha encontrado en la placenta, sin infección fetal (4). En cuatro casos estudiados en México —debidos a parásitos de tipo 1— encontramos resultados similares.

Por otro lado, la mayoría de los niños con toxoplasmosis congénita están infectados por cepas de baja virulencia, y su transmisión y patogenia dependen del momento del embarazo en el que ocurre la infección en el embarazo, por lo que los genes de la madre y del hijo, probablemente, juegan un papel importante (5,6).

Se han reportado cuatro genes con polimorfismos relacionados con enfermedad en el recién nacido, de los cuales el antígeno MHC de clase II DQ y la molécula NALP1 están relacionados con procesos inflamatorios (6,7). Las células CD4+, CD8+ o NK uterinas (uNK) presentes en la placenta, pueden

producir niveles altos de IFN- γ y quimiocinas y citocinas relacionadas —en respuesta a la infección por los taquizoítos. Las NKu, además, inducen la formación de las arterias espirales que nutren de sangre materna la placenta, por medio del factor de crecimiento del endotelio vascular-A y la angiopoietina 2 (4,6). El equilibrio en los niveles de estos factores resulta crucial para la supervivencia del feto, pues una angiogénesis anormalmente baja o alta conduce al aborto o a complicaciones como la preeclampsia.

Por otro lado, las NK periféricas, el IFN- γ , el ICAM-1 y el MIF tienen un papel paradójico, pues si bien protegen a la madre del daño ocasionado por los taquizoítos, promueven la transmisión vertical, tanto en modelos de ratón, como en estudios *in vitro* con vellosidades coriónicas humanas (4,6,8). Se ha propuesto que el IFN- γ induce la expresión de MIF por los citotrofoblastos internos de la vellosidad, los que, a su vez, inducen la síntesis de ICAM-1 en la cara externa del sincitiotrofoblasto; esta molécula puede mediar la adhesión de monocitos infectados o del parásito directamente (mediante la proteína MIC2).

Por lo anterior, se sugiere que si la infección por *T. gondii* induce una respuesta Th1 demasiado fuerte, ésta conduce a alteraciones inflamatorias o de la estructura arteriolar y provoca aborto “estéril”, o bien aumenta la transmisión del parásito mediante el proceso de adhesión descrito.

Los anticuerpos son moléculas muy importantes

en el control de *T. gondii*, pero también en la patogenia de la enfermedad y la transmisión vertical (9). El cambio de clase hacia IgG1 y 3 humanas es inducido por IFN- γ , por lo que se asocian a una respuesta de tipo Th1, la cual es predominante en la toxoplasmosis adquirida; su síntesis es incrementada por la IL-10 y el TGF- β , moléculas que regulan una respuesta Th1 exacerbada y así evitan el daño.

La IgG1 es la inmunoglobulina más temprana y común en la toxoplasmosis en adultos, incluyendo mujeres gestantes, y protege por medio de la fijación de complemento y la opsonización de fagocitos y células NK (10,11). Más aun, es la subclase con mayor afinidad al receptor neonatal para Fc γ (FcRn), que media la transcitosis de las IgG de la madre al feto, en sincitiotrofoblasto y las células endoteliales de las vellosidades coriónicas, así como en el intestino del lactante a su circulación, por lo que se le ha atribuido un papel protector para el hijo *in utero* y durante los primeros meses de vida extrauterina (6). La IgG2 y la IgG4 son inducidas por citocinas del perfil Th2: IL-6 e IL-4, respectivamente, y no tienen funciones protectoras como la fijación de complemento o la opsonización.

En un estudio de 47 binomios madre/hijo encontramos hallazgos contradictorios con las propiedades descritas para algunas de las subclases. Analizamos la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* de los cuatro subtipos de IgG en el suero de las madres positivas a *T. gondii* y de sus hijos, 26 de los cuales tenían infección congénita, 10 de ellos con problemas clínicos (11).

Los resultados más sobresalientes se resumen a continuación:

- a) hubo una correlación alta entre madres e hijos de los binomios sin infección congénita, debida a transferencia materno/fetal;
- b) cada subclase fue encontrada de manera única en las madres o los hijos;
- c) hubo recién nacidos infectados, positivos a IgG2, IgG3 o IgG4, cuyas madres fueron negativas a esas subclases;
- d) los anticuerpos IgG3 e IgG4 estuvieron presentes en un tercio de los niños con problemas clínicos; y ausentes en los casos subclínicos, lo cual es congruente con su papel regulador y con su baja capacidad protectora, respectivamente;
- e) la frecuencia de anticuerpos IgG1 fue similar en los grupos de infección materna solamente y el de infección materna y fetal, lo cual es contradictorio con el papel protector atribuido

a esta subclase en la toxoplasmosis adquirida y contra otras infecciones en el embarazo;

- f) se encontró mayor frecuencia de IgG1, IgG2 y IgG4 en las madres de hijos con toxoplasmosis congénita sintomática, que en aquellas que tuvieron hijos sin problemas clínicos; en los casos de la IgG2 y la IgG4 esto es congruente con su deficiente función efectora, pero el resultado de la IgG1 fue inesperado, aunque puede deberse a su asociación con un perfil Th1 (IFN- γ) exacerbado, que puede tener las consecuencias pro-inflamatorias o pro-transmisión discutidas anteriormente.

También, existe la posibilidad de que la "opsonización" de los taquizoítos facilite el paso a través de la placenta o la interiorización y mantenimiento del parásito en compartimentos no lisosómicos de los monocitos periféricos, por medio del FcRn. Cabe resaltar que la placenta presenta un perfil de expresión del FcRn paralelo al de la frecuencia de transmisión de *T. gondii* a lo largo del embarazo (5,6).

En resumen, algunas células y moléculas cruciales para la protección contra el daño ocasionado por el taquizoíto en adultos inmunocompetentes, parecen tener efectos similares en el feto infectado, pero paradójicos en relación con la transmisión vertical, al favorecerla. Los polimorfismos en los genes de estas moléculas pueden explicar las diferencias entre binomios y entre madres e hijos expuestos a *T. gondii*.

Referencias

1. Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajioka JW, et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:14872-7.
2. Mercier A, Devillard S, Ngoubangoye B, Bonnabau H, Bañuls AL, Durand P, et al. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: Population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e876.
3. Khan A, Dubey JP, Su C, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. Int J Parasitol. 2011;41:645-55.
4. Correa D, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Becerra-Torres E, et al. Immunobiology of congenital toxoplasmosis. En: Terrazas LI, editor. Advances in the immunobiology of parasitic diseases. Kerala, India: Research Signpost; 2007. p. 199-224.
5. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counseling. Lancet. 1999;353:1829-33.

6. Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Cañedo-Solares I, Rico-Torres CP, Sahagún-Ruiz A, Medina-Escutia ME, *et al.* Congenital toxoplasmosis: Candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. *Genes Immun.* 2010;11:363-73.
7. Witola WH, Mui E, Hargrave A, Liu S, Hypolite M, Montpetit A, *et al.* NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. *Infect Immun.* 2011;79:756-66.
8. Pfaff AW, Abou-Bacar A, Letscher-Bru V, Villard O, Senegas A, Mousli M, *et al.* Cellular and molecular pathophysiology of congenital toxoplasmosis: The dual role of IFN-gamma. *Parasitology.* 2007;134:1895-902.
9. Correa D, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP. Congenital and acquired toxoplasmosis: Diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol.* 2007;29:651-60.
10. Huskinson J, Stepick-Biek PN, Araujo FG, Thulliez P, Suzuki Y, Remington JS. Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. *J Clin Microbiol.* 1989;27:2031-8.
11. Cañedo-Solares I, Galván-Ramírez ML, Luna-Pastén H, Rodríguez-Pérez R, Ortiz-Alegría LB, Rico-Torres CP, *et al.* Human congenital toxoplasmosis: Specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27:469-74.

