

TRABAJO ORIGINAL

ESTUDIO DE LA INTERACCION ENTRE HIBRIDOS DE MACROFAGOS HUMANOS Y TRYPANOSOMA CRUZI.

Dra. Celeste Rodriguez - Instituto Boliviano de Biología de Altura

RESUMEN

Trypanosoma cruzi causa inmunosupresión durante la infección mediante mecanismos que no están totalmente esclarecidos. Dado que fagocitos mononucleares son las principales células en la Trypanosomiasis, nosotros investigamos la función monocítica durante la infección aguda por T. cruzi. Dos clones de hibridomas de macrófagos humanos, escogidos por su estabilidad en cultivo a largo plazo (Clon 53 y 63) fueron estudiados luego de la infección con T. cruzi. En el clon 53 el trypomastigote se transformó en su forma multiplicativa (amastigote). En el clon 63 esta transformación no tuvo lugar, sugiriendo que el clon 63 no permite el ciclo de vida de T. cruzi. Luego de la infección el clon 53 pierde la expresión de antígenos de Clase II (DR = 29.3% vs 2.2%, DP = 27.2% vs 6.3%), por el contrario la expresión de los marcadores LFA se ve aumentada (LFA - I = 28.7% vs 72.9%, LFA - 3 = 0.7% vs 10.8%).

Luego de la infección el clon 63 muestra un ligero aumento de la expresión de marcadores de Clase II (DR = 0.3% vs 1.3%, DP = 1.7% vs 5%) al igual que la expresión del marcador LFA - 1 (5.3% vs 8.1%). La producción de IL - 6 disminuyó en las células del clon 53 infectado, por el contrario, en el clon 63 dicha producción estuvo aumentada comparando con las células no infectadas. Ambos clones mostraron una capacidad disminuida para servir como células presentadoras de antígeno en la estimulación de células T específicas de tétanos. Estos resultados sugieren que 1) solamente subpoblaciones seleccionadas de macrófagos humanos pueden permitir el ciclo de vida de T. cruzi y 2) la alteración de la respuesta inmune en la enfermedad de Chagas podría deberse a una anomalía en la función de los macrófagos.

INTRODUCCION

Un parásito intracelular obligatorio de humanos y otros mamíferos es el protozoario Trypanosoma cruzi, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, la cuál representa un problema mayor de salud pública en Bolivia con considerables implicaciones socio-económicas. No existe un tratamiento eficaz o una inmunoprofilaxia para esta enfermedad y el desarrollo de medios eficaces para su erradicación requieren una mejor comprensión de los mecanismos de la infección celular, subsistencia intracelular del parásito y patogénesis.

Los macrófagos tienen un doble rol en la infección causada por Trypanosoma cruzi, ya que no solo pueden captar y destruir al parásito sino que también actúan como células huésped permitiendo su multiplicación.

La actividad microbicida de macrófagos peritoneales de ratón frente a T. cruzi ha sido bien documentada en los estudios de Nogueira y col., (1977); Nogueira y Cohn (1978); Nathan y col., (1979). Por el contrario nuestro conocimiento de la interacción entre macrófagos humanos y T. cruzi es muy fragmentada y dadas las diferencias entre el modelo experimental y la infección en humanos no sería acertado extrapolar resultados obtenidos del modelo murino.

En animales de laboratorio y humanos, la inmunosupresión se manifiesta en la fase aguda de la enfermedad frente a antígenos parasitarios o de otro origen. Tanto la respuesta humoral como la mediada por células están alteradas, esta inmunosupresión puede jugar un rol en el establecimiento de la fase crónica de la enfermedad. Conocimientos actuales sobre la inmunosupresión son limitados. El desarrollo de células T supresoras, la disminución de la expresión de CD-3, CD-4, CD-8 y el receptor de IL-2 (Kierszenbaum y col., 1989; Kierszenbaum y col., 1990), inhibición de la producción de IL-2 y la generación de macrófagos supresores han sido descritos durante la infección aguda por T. cruzi. Para investigar mecanismos potenciales de inmunosupresión que involucren alteraciones de la función monocítica en la enfermedad de Chagas, nuestro laboratorio ha utilizado líneas de híbridos de macrófagos humanos. Estos hibridomas representan la expansión clonal de subpoblaciones de monocitos humanos y macrófagos, los cuales poseen función monocítica normal.



MATERIALES Y METODOS

Parásitos: Trypomastogotes de la cepa Tulahuen de *T. cruzi* han sido utilizados para la infección de los híbridos. Los parásitos han sido aislados de cultivos de células VERO luego de una semana de infección.

Híbridos de Macrófagos humanos: Estas líneas celulares han sido una gentil donación del Dr. Kirk Sperber. Brevemente, éstas células han sido obtenidas por fusión de una línea celular de promonocitos deficientes en HGPRT (U937) con macrófagos obtenidos luego de una maduración de monocitos en bolsas de teflon.

Anticuerpos Monoclonales: Los anticuerpos utilizados para la determinación de marcadores de superficie (Moléculas de clase II, DR, DP y Moléculas LFA I, III) al igual que el conjugado fluorescente (IgG, F (ab')₂) fueron obtenidos del Tago, Burlingame (CA).

Kit de ELISA para IL-6: Este kit es disponible comercialmente y ha sido obtenido de Genzyme, Cambridge (MA).

Células T específicas de Tetanus Toxoide: Han sido donadas por el Dr. Kirk Sperber.

Determinación de Expresión de Antígenos de Superficie: Las células no infectadas e infectadas fueron incubadas con marcadores de superficie dirigidos contra las moléculas DR, DP, LFA I, LFA III y revelados con el conjugado fluorescente. Esta reacción fue observada en un microscopio de luz ultravioleta.

Estudio de la presentación de Antígeno: La capacidad de presentación del antígeno de Tétanos Toxoide (TT) fue determinada en los híbridos 53 y 63 infectados y no infectados con *T. cruzi*. Tanto el híbrido 53 como el 63 son DR-2 positivos y fueron incubados con células T específicas de Tétanos Toxoide DR-2 positivas durante 5 días. En las últimas 16 hrs. de incubación los cultivos recibieron 1 microcurie de 3H-thimidina. La incorporación de 3H-thimidina es leída en un contador de scintilleo.

RESULTADOS

Análisis de marcadores de Superficie: En la figura 1 se representan los valores de fluorescencia positiva de los marcadores de superficie de los híbridos 53 y 63. Comparando A y B observamos la pérdida de los marcadores de Clase II DR y DP en las células del clon 53

infectadas con *T. cruzi*. Por el contrario, la expresión de los marcadores LFA-I y LFA-3 se ve aumentada en las células infectadas. Los cuadros C y D correspondientes al clon 63 muestran un leve aumento en la expresión de los marcadores de superficie en las células infectadas (I) comparadas con las no infectadas (U).

Determinación de la producción de IL-6: La figura 2 muestra los niveles de producción de IL-6 de los híbridos 53 y 63. Podemos observar que las células del clon 53 tratadas con LPS y PMA, luego de la infección sintetizan menor cantidad de IL-6. Por otra parte, las células del clon 63 aumentan su capacidad de producción de ésta citokina luego de la infección con *T. cruzi*.

Presentación de Antígeno: El estudio de la capacidad de presentación del antígeno de TT por los híbridos 53 y 63 luego de la infección por *T. cruzi* está representado en la figura 3. Observamos que la infección de los híbridos por *T. cruzi* reduce la capacidad de presentación del antígeno por estas células traducida en una disminución de la proliferación de células T específicas de TT.

DISCUSION

Los monocitos juegan un rol crítico en la inmunoregulación, procesando macromoléculas en pequeños péptidos inmunogénicos los cuales se unen a moléculas del MHC e interaccionan con receptores de células T. Las interacciones entre células T y monocitos son complejas e involucran no solo la interacción de Ag/MHC/RcT sino también la interacción y la vía coestimuladora mediada por una serie de moléculas accesorias.

T. cruzi provoca una variedad de defectos celulares y humorales durante la fase aguda, latente y crónica de la enfermedad. Es en la fase aguda que se observa una inmunosupresión con anomalías inmunológicas observadas en el sistema humano y marino.

A diferencia de los monocitos periféricos aislados de pacientes, los cuales representan una población heterogénea, los híbridomas representan líneas celulares de subpoblaciones de macrófagos humanos y sirven como modelo de estudio para la función del monocito luego de la infección por *T. cruzi*.

Ha sido gratamente sorprendente observar que los híbridos utilizados en este estudio presentan comportamientos totalmente opuestos

frente al parásito. El clon 53 es invadido por el trypomastigote el cual se transforma en amastigote, asegurando la multiplicación del parásito. Mientras que el clon 63 no permite la transformación del parásito en su forma multiplicativa (observación personal). estas diferencias podrían explicar la pérdida de la expresión de los marcadores de Clase II DR y DP del MHC en la infección del híbrido 53 por T. cruzi lo cual no sucede con el clon 63. Los estudios del efecto de la infección por T. cruzi sobre la capacidad de presentación del antígeno de TT a células T específicas no correlacionan la diferencia en expresión de marcadores de Clase II de los clones ya que ambas líneas celulares presentan el antígeno. Estudios posteriores permitirán evaluar la relevancia de estas observaciones. Igualmente la producción de IL-6 disminuye en el clon 53 luego de la infección, mientras que en el clon 63 aumenta.

IL-6 actúa a nivel de linfocitos B para estimular la producción de inmunoglobulinas e igualmente induce la expresión del receptor de IL-2 y funciona como segunda señal a nivel de linfocitos T para la producción de IL-2 (asegurando de este modo la proliferación de linfocitos T). Por lo tanto, la IL-6 juega un rol preponderante en el desarrollo de una respuesta inmune eficaz. El hecho que el clon 53 que permite la multiplicación de T. cruzi disminuya la producción de esta importante citokina luego de la infección y que el clon 63 presente un comportamiento diferente (impide la multiplicación del parásito y aumenta la

producción de IL-6) indica la presencia de subpoblaciones de macrófagos que regularían la infección por T. cruzi. El rol más o menos importante de éstas subpoblaciones determinaría el estado clínico de la enfermedad en diferentes pacientes.

La adquisición de defectos en monocitos con alteración en la presentación de antígeno y una alteración en la producción de citokinas por los macrófagos como resultado de la infección por T. cruzi podría contribuir al desarrollo de las anomalías inmunológicas observadas en la enfermedad de Chagas.

REFERENCIAS

NOGUEIRA N., GORDON S. AND COHN Z.A. J. Exp. Med. 146: 157, 1977

NOGUEIRA N. AND COHN Z.A. J. Exp. Med. 148: 288, 1978

NATHAN C., NOGUEIRA N., JUANGBHANICH C., ELLIS J. AND COHN Z. J. Exp. Med. 149: 1056, 1979

KIERSZENBAUM F., CUNA W.R., BELTZ L.A. AND SZTEIN M.B. J. Immunol. 143: 275, 1989

KIERSZENBAUM F., CUNA W.R., BELTZ L.A. AND SZTEIN M.B. J. Immunol. 144: 4000, 1990

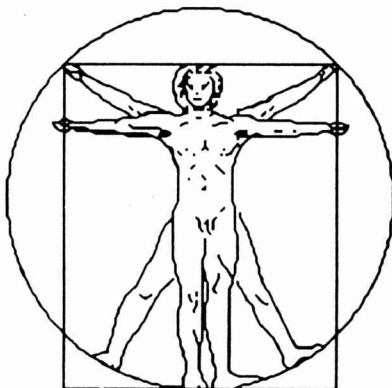


Fig. 1 ANALISIS DE MARCADORES DE SUPERFICIE

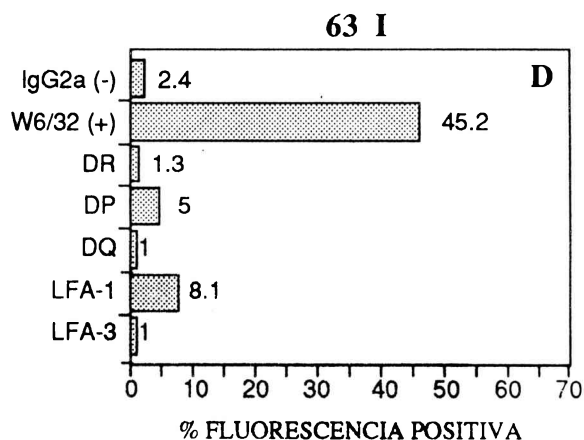
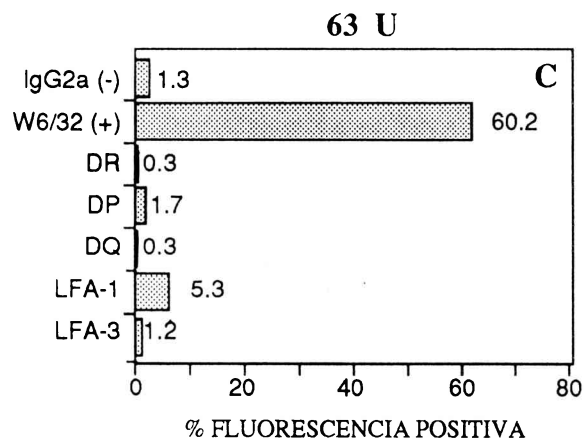
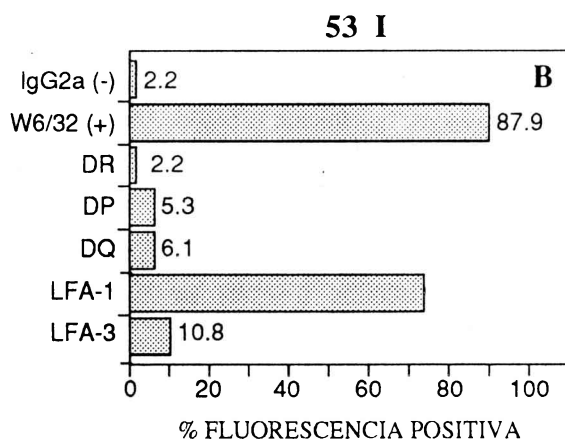
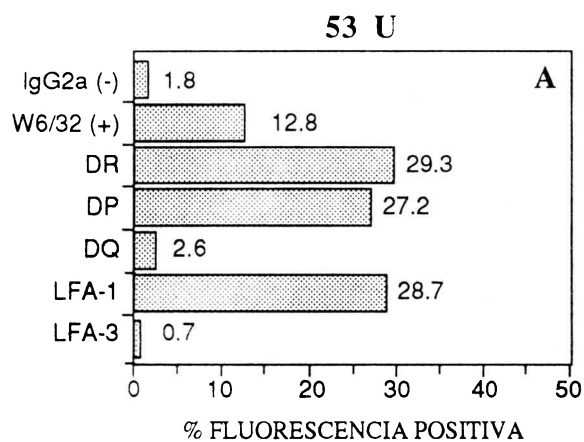


Fig. 2 DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE IL-6

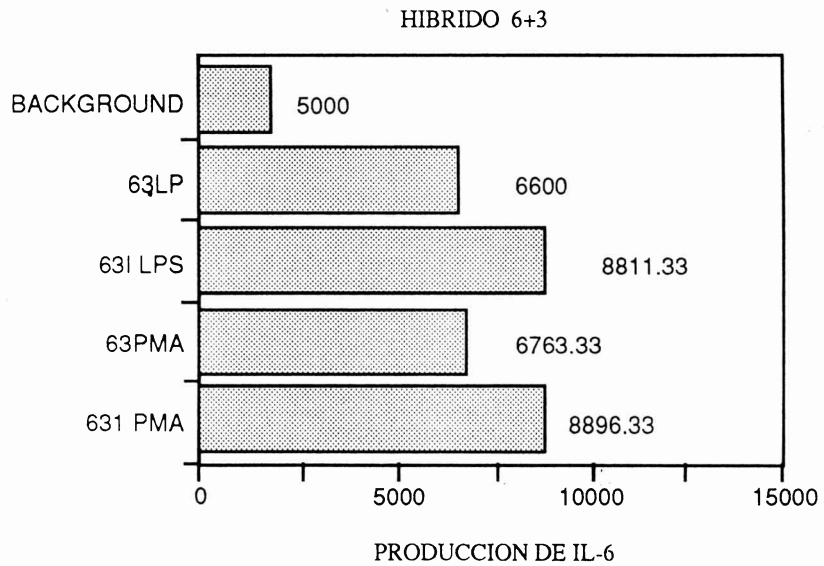
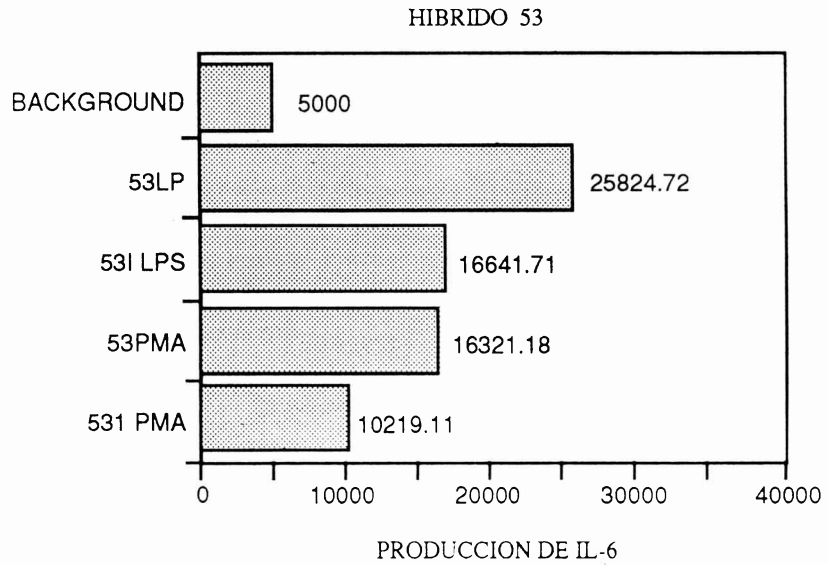
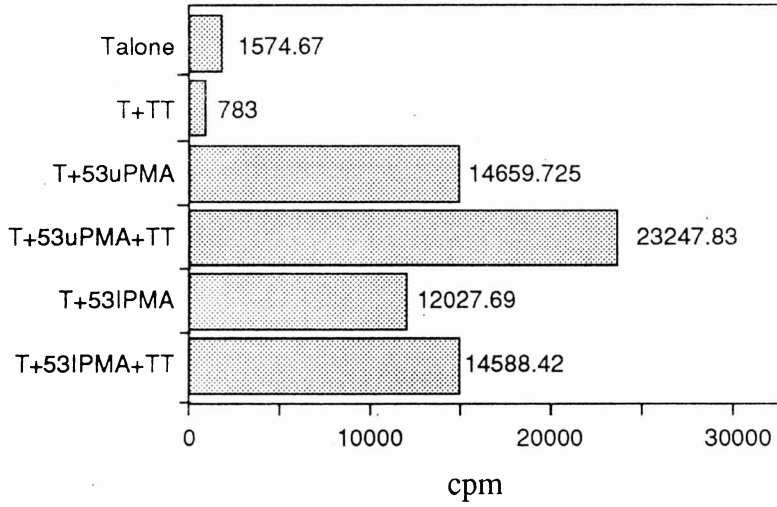


Fig. 3 PRESENTACION DEL ANTIGENO

HIBRIDO 53/PMA x CELULAS T ESPECIFICAS DE TETANOS TOXOIDE



HIBRIDO 63/PMA x CELULAS T ESPECIFICAS DE TETANOS TOXOIDE

