

Subpoblaciones de linfocitos T en individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* y diferente grado de afectación electrocardiográfica

HECTOR O. DAVILA*, OSCAR A. BOTTASSO*, JULIO C. MORINI*

División de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

* Miembro de la Carrera del Investigador, Universidad Nacional de Rosario

Trabajo recibido para su publicación: 12/88. Aceptado: 6/89

Dirección para separatas: División Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe 3100, (2000) Rosario, Provincia de Santa Fe, Argentina

Es sabido que la incubación de linfocitos T periféricos (células T) con teofilina permite separar dos subclases de células T: una que conserva la capacidad de formar rosetas E con glóbulos rojos de carnero y desarrolla actividad *helper* sobre células B (células T teofilina resistentes, tr) y otra que pierde esta característica y se desempeña como supresora sobre las mismas células (teofilina sensibles). En el presente trabajo se determinaron los niveles circulantes de células T totales y la subpoblación de células T tr, mediante la formación de rosetas E con y sin incubación previa con teofilina, en dos grupos de individuos infectados con *Trypanosoma cruzi*. Grupo 1: individuos sin alteraciones del electrocardiograma (ECG). Grupo 2. con alteraciones moderadas del ECG. También se incluyó un grupo de sujetos normales como control. En los individuos del Grupo 2 (compatibles con la miocardiopatía chagásica crónica) se constató un descenso en los niveles circulantes de células T y células T tr, en relación con los testigos. Sin embargo, la proporción de células T tr dentro del total de células T no se modificó. Se postula que la reducción de estas poblaciones de células inmunocompetentes reflejaría un mecanismo inmunorregulatorio, tendiente a evitar una excesiva respuesta inmunológica, finalmente perjudicial para los tejidos del huésped.

La enfermedad de Chagas es una tripanosomiasis producida por un parásito unicelular flagelado de vida intracelular, el *Trypanosoma cruzi* (Tc).

Una de las características más importantes de esta entidad es que el individuo infectado puede desarrollar —en un período más o menos prolongado— lesiones cardíacas, digestivas y/o neurológicas, que conforman el cuadro denominado clínicamente enfermedad de Chagas crónica.¹

La patogenia de la enfermedad de Chagas es discutida; algunos autores sostienen que la agresión directa del parásito, producida durante la primoinfección, sería el mecanismo responsable del daño tisular,^{2,3} mientras que otros postulan que existiría una reacción inmunitaria hacia los tejidos del huésped, sea por reacción cruzada o por adsorción de los antígenos (Ag) de Tc a la superficie celular de tejidos del huésped.⁴⁻⁸ A pesar de estas controversias, la mayoría de los autores coinciden en que la respuesta inmune jugaría un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad.

En trabajos previos hemos demostrado que los pacientes con miocardiopatía chagásica (MCC) presentaban una depresión en la inmu-

nidad mediada por células, tanto *in vivo* como *in vitro*.⁹

Es conocido que la incubación de linfocitos periféricos con teofilina permite diferenciar dos subpoblaciones de células T, en base a la capacidad de formar rosetas E con glóbulos rojos de carnero (GRC); una de estas subclases conserva dicha característica (linfocitos teofilina resistentes) y desarrolla actividad *helper* sobre la producción de inmunoglobulina (Ig) de los linfocitos B. El otro sector (linfocitos teofilina sensibles) pierde esta aptitud tras la incubación con teofilina y se desempeña como supresor en el mismo sistema.¹⁰

En virtud de lo expuesto, se propuso estudiar los niveles circulantes de estas subpoblaciones de células T en individuos infectados con Tc asintomáticos, o con alteraciones del ECG, compatibles con la MCC.

MATERIAL Y METODO

1. Sujetos

Se estudiaron: a) 14 individuos infectados con Tc sin alteraciones en el ECG (4 mujeres y 10 hombres), edad promedio $37 \pm 3,7$ años;

b) 18 individuos infectados con Tc y alteraciones moderadas en el ECG (dos o más signos patológicos) distribuidos de la siguiente manera: 16 con HBAI asociado a BCRD, uno con BCRD + bloqueo AV de primer grado y uno con BIRD + HBAI + EV, edad promedio 41 ± 2 años; c) 19 controles (8 hombres y 11 mujeres), edad promedio $40 \pm 2,3$ años.

No se registraron diferencias estadísticamente significativas en las edades de los grupos estudiados.

2. Determinaciones *in vitro*

I. *Serología para Chagas*: Inmunofluorescencia indirecta y fijación de complemento.

II. *Linfocitos en sangre periférica*: Se cuantificaron de sangre venosa periférica los siguientes parámetros: a) número absoluto de linfocitos/ mm^3 ; b) número absoluto y relativo de linfocitos formadores de rosetas E, 1 hora a 4°C (células T); c) número absoluto y relativo de linfocitos formadores de rosetas E teofilina resistentes (células T, tr). El procedimiento técnico se resume a continuación: se usó un gradiente de Ficoll-Hypaque para separar las células mononucleares contenidas en 3 ml de sangre venosa. Posteriormente, éstas fueron recolectadas, lavadas y resuspendidas en 0,5 ml de solución salina balanceada PBS, pH 7,4; una alícuota de esta suspensión celular más un volumen igual de glóbulos rojos de carnero (GRC) al 0,5% se incubó 15 minutos a 37°C , luego se centrifugó 5 minutos a 1.000 rpm y se colocó a 4°C , durante una hora (células T);¹¹ como control de la suspensión celular, una fracción fue incubada a 37°C , y posteriormente se determinaron las rosetas E a 4°C . Este procedimiento no afectó el número de linfocitos formadores de rosetas. Otra alícuota fue incubada con igual volumen de una solución de

teofilina en PBS (5 mM) a 37°C durante una hora, y posteriormente fue centrifugada y resuspendida en PBS; se le agregó igual volumen de GRC al 0,5%, se centrifugó 5 minutos a 1.000 rpm y se incubó a 4°C durante una hora. El tratamiento con teofilina permitió separar dos subpoblaciones: una que perdió la capacidad de formar rosetas E (teofilina sensibles) y otra que no se vio modificada (teofilina resistentes). En todos los casos se contaron 300 células con rosetas que tenían adheridos a su superficie por lo menos 3 GRC. La relación entre los porcentajes de células T tr y las células totales (RE 4°C) fue expresada como índice relativo (IR) calculado de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{IR} = \frac{\text{células T tr}}{\text{células T}} \times 100$$

3. Análisis estadístico

Se practicó la prueba "t" de Student. Si bien los valores porcentuales se expresan en mediana y error estándar (es), el análisis estadístico requirió su transformación al arco seno.¹²

RESULTADOS

El promedio de linfocitos totales circulantes en cada grupo experimental sin alteraciones del ECG ($\bar{X}=2.292$; es=140), con alteraciones moderadas del ECG ($\bar{X}=1.935 \pm 146$) y controles ($\bar{X}=2.253$; es=202), no mostró diferencias significativas y fue similar en hombres y mujeres.

Los datos obtenidos de linfocitos T totales (rosetas E, 4°C) y la subpoblación de linfocitos con actividad *helper* (rosetas E, tr) se presentan en las Tablas 1 y 2. Los linfocitos T totales del Grupo 2 mostraron una disminución significativa con respecto a los controles ($p < 0,01$), tanto en los valores absolutos como relativos (Tabla 1).

Tabla 1

Linfocitos T totales de sangre periférica en individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* y controles

Grupos	Valores absolutos		Valores relativos		
	$\bar{X} \pm es$		m	r	p
1. Sin alteraciones ECG	1.259 ± 132		55,00	(33-76)	NS
2. Alteraciones moderadas ECG	772 ± 64	$< 0,01$	39,50	(24-60)	$< 0,01$
3. Controles	1.196 ± 125		54,30	(9-77)	

$\bar{X} \pm es$: media aritmética y error estándar; m: mediana; r: rango; p: comparación con los controles; NS: no significativa.

Tabla 2

Linfocitos T teofilina resistentes de sangre periférica en individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* y controles

Grupos	Valores absolutos		Valores relativos		
	$\bar{X} \pm es$		m	r	p
1. Sin alteraciones ECG	759 ± 78	NS	32	(15-57)	NS
2. Alteraciones moderadas ECG	514 ± 41	$< 0,05$	26	(6-56)	NS
3. Controles	738 ± 106		32	(6-60)	

$\bar{X} \pm es$: media aritmética y error estándar; m: mediana; r: rango; p: comparación con los controles; NS: no significativa.

Tabla 3
Indice relativo de linfocitos teofilina resistentes de sangre periférica en individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* y controles

Grupos	m	r	p
1. Sin alteraciones ECG	64,5	(30-100)	NS
2. Alteraciones moderadas ECG	63,5	(18-100)	NS
3. Controles	60,0	(28-98)	

m: mediana; r: rango; p: comparación con los controles; NS: no significativa.

De igual forma, se verificó entre los mismos grupos una diferencia significativa ($p < 0,05$) en los valores absolutos en las células T tr (Tabla 2).

Los valores del IR de linfocitos T tr no fueron estadísticamente diferentes entre los grupos experimentales y controles (Tabla 3).

DISCUSION

Si bien no es un criterio uniformemente aceptado, se postula que la miocardiopatía chagásica sería el resultado de una respuesta inmunológica hacia el tejido miocárdico, puesta en marcha por el *Trypanosoma cruzi*, sea por reacción cruzada con tejido del huésped^{4, 13, 14} o por la adsorción de los antígenos parasitarios a las células de aquél.^{7, 8} Al respecto, existe un cúmulo de evidencias experimentales y clínicas que avalan la participación de la inmunidad celular en la lesión de la fibra miocárdica; esto indicaría quizás un desbalance en los mecanismos inmunorregulatorios.^{4, 15-18}

En el presente trabajo se reconocieron y cuantificaron las subpoblaciones de linfocitos T, en base a la capacidad de una de ellas de formar rosetas E luego de la incubación con teofilina y a la posibilidad de desarrollar actividad cooperadora sobre linfocitos B.

De los resultados presentados surge claramente que los individuos infectados con Tc y con alteraciones moderadas del ECG (atribuibles a una MCC) presentan un descenso en los niveles circulantes de linfocitos T totales y teofilina-resistentes. Varias son las hipótesis para explicar estos hallazgos. Sería posible que estos enfermos tuviesen un trastorno en el tránsito de células inmunocompetentes (atrapamiento), hecho poco probable dado que el total de linfocitos no se encontró modificado con respecto a los controles. Otra posibilidad sería que el receptor para GRC (molécula CD2 o T11)¹⁹ estuviese ocupado por otro ligando que operase como un "fac-

tor bloqueante". En último término, podría ocurrir que los pacientes con una MCC tuviesen una depresión del sector de células T, o un bajo estado de activación, que se traduciría en un reducido número de moléculas CD2 en la membrana linfocitaria.

Además, en el presente trabajo no se constataron desbalances en la proporción de células T con actividad *helper* respecto del total de linfocitos T (Tabla 3). Otros autores,²⁰ en cambio, han observado una diferente relación entre células cooperadoras y supresoras en pacientes chagásicos, con diferencias entre sexos (las mujeres con altos índices CD4/CD8 y los varones con bajos índices CD4/CD8) y un total de células T (CD3) conservado. Sin embargo, se debe señalar que estas determinaciones se efectuaron con anticuerpos monoclonales que marcan distintas estructuras y no se consignó el grado de cardiopatía de los pacientes.

Sea cual fuere el mecanismo fisiopatológico de la lesión miocárdica, es muy difícil descartar la participación inmunológica. La molécula CD2 representa un componente fundamental en la vía de activación alternativa en la célula T, que puede interactuar con el complejo CD3-Ti.²¹ Se podría postular que la reducción de estas poblaciones celulares inmunocompetentes sería un mecanismo inmunorregulatorio tendiente a evitar una excesiva respuesta inmunológica, finalmente perjudicial para los tejidos del huésped.

SUMMARY

It is already known that theophylline incubation of peripheral T lymphocytes (T cells) allows their separation into two subsets: one that retains the ability to form E rosettes with sheep red blood cells and exerts helper activity on B cells (theophylline resistant T cells -ThR T cells-); the other one that loses this characteristic and develops suppressor activity on the same system (theophylline sensitive cells). Circulating levels of total T cells and ThR T cells -by means of rosette formation with and without theophylline incubation respectively-, were assessed in the present work, in two groups of Trypanosoma cruzi (Tc) infected individuals. Group 1: patients without electrocardiographic (ECG) alterations. Group 2: patients with moderated ECG alterations. A group of normal individuals was also included as control. A decrease in circulating levels of total T cells and ThR T cells in Tc-infected individuals with moderate ECG alterations (compatible with chronic chagasic myocardopathy) was seen in relation to controls.

However, the proportion of ThR T cells within total T cells was not modified. It is postulated that such decrease of immunocompetent cell populations might reflect an immunoregulatory mechanism, intended to avoid excessive immunological response, eventually harmful to host tissues.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Cátedra de Enfermedades Transmisibles de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR (Prof. L. Moloensnik) por la provisión de infectados y enfermos chagásicos incluidos en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Brener Z: Recent developments in the field of Chagas' disease. Bull Wld Hlth Org 60: 463, 1982.
2. Koberle F: Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. Sociedad Argentina de Parasitología. Buenos Aires, 1972, pp 77-84.
3. Oliveira JSM, Monteirodos Santos JC, Muceillo G, Ferreira AL: Increased capacity of the coronary arteries in chronic Chagas' heart disease. Further support for the neurogenic pathogenesis concept. Am Heart J 109: 304, 1985.
4. Acosta AM, Santos Buch CA: Autoimmune myocarditis induced by Trypanosoma cruzi. Circulation 71: 1255, 1985.
5. Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Arana RM: Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gammaglobulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. Circulation 49: 13, 1974.
6. Cossio PM, Laguens RP, Diez C, Szarfman A, Segal A, Arana RM: Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. Circulation 50: 1252, 1974.
7. Ribero Dos Santos R, Hudson L: Trypanosoma cruzi: binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. Parasite Immunol 2: 1, 1980.
8. Ribero Dos Santos R, Hudson L: Trypanosoma cruzi: immunological consequences of parasite modification of host cells. Clin Exp Immunol 40: 36, 1980.
9. Bottasso OA, Mangiaterra L, Bravo Luna M, Amerio N, Morini JC: Perfil inmunológico en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Medicina 42: 136, 1982.
10. Shore A, Dosch HM, Gelfand EW: Induction and separation of antigen dependent T helper and T suppressor cells in man. Nature 274: 586, 1978.
11. Jondal M, Holm G, Wigzell H: Surface markers on human T and B lymphocytes. J Exp Med 136: 207, 1972.
12. Snedecor GW: Métodos estadísticos aplicados a la investigación agrícola y biológica. Cía Editora Continental, México, 1956, Cap 4, pp 113-132.
13. Acosta AM, Sadigursky M, Santos Buch CA: Anti-striated muscle antibody activity produced by Trypanosoma cruzi. Proc Soc Exp Biol Med 172: 364, 1983.
14. Wood JN, Hudson L, Jessell TM, Yamamoto M: A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurons and Trypanosoma cruzi parasites. Nature 296: 34, 1982.
15. Cossio PM, Damilano G, De La Vega MT, Laguens RP, Cabeza Meckert P, Diez C, Arana RM: In vitro interaction between lymphocytes of chagasic individuals and heart disease. Medicina 36: 287, 1976.
16. Cossio PM, Laguens RP, Kreutzer E, Diez C, Segal A, Arana RM: Chagasic cardiopathy. Immunopathologic and morphologic studies in myocardial biopsies. Am J Pathol 86: 533, 1977.
17. De Titto E, Braun M, Lazzari J, Segura EL: Proliferación in vitro de linfocitos de pacientes con miocardiopatía chagásica ante extractos antigénicos de Trypanosoma cruzi y de distintos tejidos humanos. Acta Physiol Pharmacol Latinoam 34: 102, 1984.
18. Santos Buch CA, Teixeira ARL: The immunology of experimental Chagas' disease. III: Rejection of allogeneic heart cells in vitro. J Exp Med 140: 38, 1974.
19. Verbi W, Greaves MF, Scheider C, Koubek K, Janossy G, Stein H, Kung P, Goldstein G: Monoclonal antibodies OKT11 and OKT11A have pan-T reactivity and block sheep erythrocyte receptor. Eur J Immunol 12: 81, 1982.
20. Gattas CR, Albanesi FO, Barcinski MA: Lymphocyte subpopulations in chronic Chagas' disease. Immunol Lett 8: 289, 1984.
21. Meuer SC, Hussey RE, Fabbi M, Fox D, Acuto O, Fitzgerald KA, Hodgdon JC, Potentis JP, Schlossman SF, Reihertz EL: An alter native pathway of T-cell activation: A functional role for the 50Kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. Cell 36: 897, 1984.