
TRABAJOS ORIGINALES DE INVESTIGACIÓN BÁSICA

EFFECTO DE GANGLIÓSIDOS *IN VITRO* SOBRE LINFOCITOS DE PACIENTES CHAGÁSICOS ESTIMULADOS CON MITÓGENOS O CON ANTÍGENOS DE CORAZÓN O CEREBRO.

Humberto R. A. Cabral, Ivón T. C. Novak

Cátedras I y II de Biología Celular, Histología y Embriología, Instituto de Biología Celular.
Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.
Ciudad Universitaria. 5000. Córdoba. Argentina.
E-mail: hcabral@fcm.unc.edu.ar

Resumen

Se estudió *in vitro* el efecto de gangliósidos sobre las respuestas de linfocitos de pacientes chagásicos estimulados con mitógenos o con antígenos de corazón y cerebro. La razón para efectuar este estudio fueron las evidencias que indican un rol de los linfocitos T en la producción de daños de la cardiopatía chagásica, y datos que indican que los gangliósidos pueden tener actividad sobre esas células. Además, en trabajos previos, hallamos que los linfocitos de chagásicos responden con transformación blástica (TB). Material y Métodos: se efectuaron cultivos de leucocitos de 14 pacientes chagásicos. A los cuales se adicionaron gangliósidos y en esas condiciones, se estimularon con mitógenos, o bien con antígenos de corazón humano o cerebro murino, respectivamente. Resultados: se observó inhibición parcial de la transformación blástica inducida por mitógenos, y también hubo inhibición parcial de la TB inducible por los antígenos de corazón o de cerebro en los linfocitos de chagásicos, siendo significativas las diferencias con respecto a los controles ($p < 0.001$). Conclusiones: se considera de interés ese efecto inhibitorio de gangliósidos sobre las actividades de los linfocitos de chagásicos estudiadas en estos experimentos, por ser directamente vinculables a factores de patogenia chagásica, que podrían ser inmunomodulados.

Palabras Clave: efecto de gangliósidos - cultivos de linfocitos - pacientes chagásicos - mitógenos de células T - antígenos de corazón o cerebro.

Abstract

In human Chagas' disease previous work has shown the occurrence of a T-lymphocyte CD4-positive population (a high producer of PAS-positive glycoproteins) with evidence suggesting a role in the formation of damages to the myocardium and neural structures in chagasic heart disease (ChHD) (5-7). Other workers have taken such facts into consideration and have employed gangliosides (biological substances with neurotrophic and immunomodulatory properties) in chagasics with chronic cardiomyopathy and disautonomic signs, obtaining an improvement in functional signs and a decrease in the number of PAS+ lymphocytes (10). In the present work we have studied the effect of mixed gangliosides (Cronassial[®]) on cell cultures of total leukocytes, or on mononuclear cells prepared through Ficoll-Hypaque. Blood was obtained from 14 patients with ChHD. Experiments were undertaken to assess the effect of polyclonal mitogens Phytohaemagglutinin (Phy) and Concanavalin A (Con A) on blastic transformation, estimated by cell size and cytologic study. In addition, the

production of PAS+ substances by the lymphocytes and blast were assessed. Gangliosides were added at final concentrations of 100 mg/ml or 200 mg/ml. Cell viability was assessed by means of the Trypan blue test. With respect to blastic transformation, results showed a significant decrease in the cultures that received gangliosides 24 hours before mitogen administration, as compared with controls ($p < 0.001$) (both for Phy and Con A). On the other hand, the production of lymphocytic PAS+ substances decreased in the cultures of chagasics in which gangliosides were added. Some of these results confirmed previous findings on the matter (3). The facts suggest that gangliosides can modulate some lymphocytic activities in chagasics.

Key words: gangliosides effect, lymphocyte cultures, chagasic patients, T cell mitogens, heart or brain antigens.

Introducción

Este trabajo fue realizado para estudiar "in vitro" el efecto de gangliósidos sobre linfocitos de pacientes chagásicos. Los gangliósidos son sustancias biológicas con actividades neurotróficas y de modulación de respuestas inmunes (1-4).

En la enfermedad de Chagas humana, trabajos previos nuestros mostraron que surge y se mantiene por muchos años, una población numerosa de linfocitos productores de sustancias glicosiladas, de reacción PAS+. Demostramos también, que son del tipo T-helper, y obtuvimos evidencias que indican un rol de dichos linfocitos en la infiltración y en la producción de daños de la Cardiopatía Chagásica (5-7).

Antes, en trabajos tempranos, obtuvimos evidencias sobre la intervención de mecanismos tipo autoinmunes en la patogenia de Chagas (9, 5).

Por otra parte, efectuamos "in vitro" un estudio comparativo de la respuesta de linfocitos de pacientes chagásicos y

de personas sanas, a antígenos de corazón humano, o murino, o bien de cerebro murino, o bien de *Trypanosoma cruzi*, respectivamente (11, 12). Los experimentos mostraron una significativa respuesta de transformación blástica a antígenos de corazón, de cerebro, y de *T. cruzi*, en ese orden, por comparación tanto con sus respectivos controles no desafiados con antígenos, como con respecto a cultivos de linfocitos de personas sanas.

Otros investigadores tomaron en consideración esos hallazgos, y en una experiencia clínica en la que utilizaron gangliósidos en pacientes con cardiopatía chagásica, se determinó, en ensayos a doble ciego, el nivel de linfocitos PAS+, antes y durante dicha terapia. Se halló disminución en los niveles de los linfocitos T PAS+ arriba mencionados y se obtuvo mejorías de signos electrocardiográficos de lesión en dichos pacientes (10).

Considerando todos los hechos arriba descriptos, el propósito del presente trabajo fue investigar, en condiciones experimentales *in vitro*, el efecto de gangliósidos sobre los linfocitos de los chagásicos, postulando que podrían modificar las respuestas de dichas células.

Material y Métodos

Los experimentos se efectuaron, obteniendo las células de sangre circulante de 14 pacientes chagásicos con cardiopatía crónica, y de 10 controles sanos.

De cada caso, se efectuaron determinaciones, sobre extendidos de sangre, del nivel de linfocitos PAS-positivos, al obtener la muestra de sangre por punción venosa. Luego se prepararon cultivos celulares a) de leucocitos totales, b) de células mononucleares obtenidas a través de gradiente de Ficoll-Hypaque (Isopaque). En estos experimentos, los gangliósidos (Cronassial) fueron añadidos en concentraciones finales de 100 mg/ml y

de 200 mg/ml, en diferentes experimentos, respectivamente.

Las células así tratadas mantuvieron su viabilidad, de acuerdo a controles realizados mediante test de exclusión de Azul Tripán. Los gangliósidos fueron añadidos 24 horas antes de la estimulación respectiva con los mitógenos o con los antígenos, en algunos experimentos, y, en otros, simultáneamente. Se investigaron en esas condiciones, las respuestas a Fitoheماغlutinina, y Concanavalina A. Además, a antígenos de corazón humano y de corazón y cerebro murinos, respectivamente, los cuales fueron preparados como se describió en trabajo previo (12).

Se obtuvieron muestras diarias, desde el día 1 al 8 y se efectuaron citopreparaciones, que se colorearon con May Grunwald Giemsa, o bien se sometieron a la reacción de PAS, con Hematoxilina como contraste nuclear.

A efectos del estudio de la Transformación Blástica (TB) los linfoblastos fueron identificados y clasificados por su tamaño (> 2 veces el diámetro de los linfocitos pequeños control) y por otros detalles que especificamos en un trabajo anterior (12) considerando blastos las células con tamaño mayor de 15 mm; a las células

de tamaño mayor de 12 mm hasta 15 mm, con nucléolos, se las consideró elementos de transición. Este criterio de clasificación se basó en ciertos hechos bien conocidos, tales como: a) del total de linfocitos que circulan en sangre, el mayor contingente corresponde a linfocitos pequeños, cuyo diámetro total oscila entre 6 y 8 mm; b) un número escaso (estimado en 10 %) corresponde a células sin nucléolos visibles y cuyo tamaño va desde 12 a 15 mm.

Resultados

En Cultivos de leucocitos totales

Con respecto a Transformación Blástica: (TB) se produjo una disminución significativa de la TB con respecto a sus controles ($p < 0.001$) en cultivos a los que se añadió gangliósidos 24 hs antes de dar el estímulo respectivo en los cultivos estimulados con Fitoheماغlutinina y con Concanavalina A (Tabla I).

También se produjo por efecto de gangliósidos una disminución significativa de TB en los cultivos a los que se añadió y antígenos de corazón humano y corazón y cerebro murinos (Tabla II).

Tabla I. Efecto in vitro de gangliósidos sobre linfocitos de pacientes chagásicos en cultivos con y sin estimulantes mitogénicos. Estudio comparativo de transformación blástica*.

Sin estímulo	Fitoheماغlutinina	Fitoheماغlutinina + Gangliósidos	Concanavalina A	Concanavalina A + Gangliósidos
3.1 ± 1.1	60.1 ± 21.4	28.3 ± 15	55 ± 19.2	20 ± 14.6

*Expresado como porcentaje de blastos, a las 96 hs; n = 14.

Gangliósidos administrados 24 hs antes de dar el estímulo mitogénico

Tabla II. Efecto de antígenos (Ag) de corazón o cerebro sobre linfocitos de pacientes chagásicos en cultivo, con y sin añadido de gangliósidos, transformación blástica*.

Sin estímulo	Ag Corazón	Ag Corazón + Gangliósidos	Ag Cerebro	Ag Cerebro + Gangliósidos
0.9 ± 0.8	23 ± 6.4	11 ± 4.2	16.1 ± 3.2	9.4 ± 5.2

Se expresa el % de blastos a las 96 horas de añadir el antígeno respectivo; n = 14.

En los cultivos en que el estímulo de mitógeno policlonal o antigénico fue administrado simultáneamente con los gangliósidos, la TB fue también menor a la de los controles sin gangliósidos.

Con gangliósidos, las células estimuladas con Fitoheماغlutinina se reunieron y crecieron en "islotas", tal como efectúan con el sólo estímulo de dicho mitógeno (7).

Resultados con respecto a PAS-positividad en linfocitos recién obtenidos de sangre

Las determinaciones de linfocitos productores de sustancias PAS+ se efectuaron en las muestras de sangre de chagásicos preparadas al obtenerla, y se compararon con las obtenidas en las muestras de los respectivos cultivos, mostró por efecto de gangliósidos un descenso de la PAS-positividad de los mismos. El promedio porcentual (%) al obtener la sangre fresca, fue de 38 ± 9 linfocitos PAS+.

Resultados con respecto a reacción positiva para sustancia PAS+, en los cultivos de leucocitos totales

En cultivos control se observó una disminución de la reactividad PAS+, en

relación con el momento de la siembra, a partir del primer día. En los estimulados con gangliósidos, esa disminución fue más pronunciada. (Tabla III).

En los cultivos testigos la PAS-positividad linfocitaria fue de 7 %, al 3° día. En los cultivos con gangliósidos no se observó PAS-positividad al 3° día.

Cuando las células fueron cultivadas solamente con añadido de gangliósidos, la disminución de sustancias PAS+ fue más notoria. Cuando avanza el tiempo de cultivo, algunos blastos, en los estimulados solamente con el mitógeno, reiniciaron la producción de sustancias PAS+. Pero en los blastos de estimulados con mitógeno y adicionados con gangliósidos este aspecto fue menos notorio.

Es decir, habría una menor producción de sustancias PAS+ linfocitarias bajo acción de gangliósidos.

Efectos de gangliósidos sobre cultivos de células mononucleares purificadas, separadas mediante gradiente de Ficoll-Hypaque

Con respecto a *Transformación Blástica (TB)*: Se produjo también

Tabla III. Efecto de gangliósidos sobre la PAS positividad de linfocitos de pacientes chagásicos cultivados 96 hs con estimulantes mitogénicos o con antígenos (Ag) de corazón o cerebro*.

	Sin estímulo (control)	Fitoheماغlutinina	Concanavalina A	Ag Corazón	Ag Cerebro
Sin gangliósidos	(++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)
Con gangliósidos	(±)	(+)	(+)	(+)	(+)

*La PAS positividad de linfocitos, preparados en frotis sanguíneos de los pacientes (n=8) inmediatamente antes de la siembra de los cultivos fue de: 38 ± 9 . Los gangliósidos, mitógenos o antígenos respectivos fueron añadidos a la hora cero (siembra).

* Los valores porcentuales que se muestran corresponden a las células que mostraron PAS positividad ya fueran linfocitos o blastos

disminución de la TB en los cultivos a los que se añadieron gangliósidos. Cuando los mismos se añadieron 48 hs antes de administrarse estímulos de mitógenos policlonales u antígenos la diferencia fue ($p < 0.05$), con respecto a sus respectivos controles.

Con respecto a *positividad para PAS*: En cultivos de células mononucleares separadas mediante Ficoll-Hypaque, también se registró una disminución espontánea de sustancia PAS+ en los linfocitos. Sin embargo, los gangliósidos profundizaron esa disminución.

Discusión y Conclusiones

Los experimentos efectuados hasta el presente, sobre cultivos celulares de 14 casos de pacientes chagásicos, muestran que gangliósidos totales (Cronassial), y también mitógenos y antígenos específicos, ejercen efectos *in vitro* sobre la activación de células mononucleares humanas (obtenidas de sangre periférica de los pacientes).

Las evidencias obtenidas en estos experimentos indican que los gangliósidos inhibieron parcialmente las respuestas de Transformación Blástica estimuladas por los mitógenos Fitohemaglutinina y Concanavalina A, y por antígenos de corazón humano y de corazón o de cerebro murino, respectivamente.

Con respecto a la producción de sustancias PAS+ linfocitarias, el seguimiento citoquímico de dicho aspecto, muestra que bajo efecto de gangliósidos se produce una disminución de PAS-positividad en las células, desde el primer día de cultivo, más profunda que en los controles. Cuando se inicia la Transformación Blástica, las células estimuladas presentaron menor PAS-positividad, por comparación con los blastos provenientes de cultivos que no recibieron gangliósidos.

Consideramos que los presentes resultados refuerzan, por una parte, nuestros hallazgos experimentales previos que evidenciaron una precoz reacción de transformación blástica de

linfocitos T PAS+ de los chagásicos cuando son enfrentados, *in vitro*, con antígenos de corazón y cerebro hechos que fueron descriptos anteriormente (11,12)

Consideramos de mucho interés el efecto inhibitorio aquí hallado de los gangliósidos sobre la Transformación Blástica inducible por mitógenos y por antígenos de corazón y sistema nervioso, sobre los linfocitos de los chagásicos, que hemos hallado en estos experimentos, por ser aspectos directamente vinculados a factores de patogenia chagásica en estudio actual, particularmente a los linfocitos CD4 PAS+, cuya presencia manifiesta hallamos y describimos en muestras de corazones chagásicos, infiltrados en torno a miocélulas cardíacas y a estructuras neurales intracardiacas, en cardiopatías chagásicas de diferentes grados de intensidad, siendo esos linfocitos más numerosos e infiltrantes de mayor número de áreas cardíacas, en las cardiopatías de evolución hacia la muerte cardíaca (8).

Por lo tanto, los hechos observados pueden ser considerados como posibilidades de modulación de factores patogénicos de la cardiopatía chagásica.

Agradecemos subsidios de SECYT-UNC y del CONICOR N° 4024/97

Referencias

1. Whisler RL, Yates AJ. Regulation of lymphocytes responses by human gangliosides. I. Characteristics of inhibitory effects and the induction of impaired activation. *J. Immunology*; 1980, 125: 2106-2111.
2. Hoffner H, Yheme T, Vandebark AA. Gangliosides induce selective modulation of CD4 from helper T lymphocytes. *J. Immunology*; 1987, 139 3295-3305.
3. Cabral HRA, Novak ITC. Effects of exogenous gangliosides "in vitro" on cytologic immunologic activities of lymphocytes from patients with Chagas' disease. (Abstract) *Mem Inst*

Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol 91, Suppl November; 1996, p 251.

4. Cabral HRA, Novak ITC. Effect of gangliosides in vitro on mitogen stimulated lymphocytes from patients with chagasic cardiopathy and on their association in rosettes with macrophages. (Abstract). Mem Inst Oswaldo Cruz, Suppl, Vol 93; 1998, IM-44.

5. Cabral HRA. PAS-positive substance in lymphocytes from patients with Chagas' disease. Lancet, 1; 1971, 1356-1357.

6. Cabral HR, Braxs J. Producción de una glicoproteína por linfocitos T en la cardiopatía chagásica. Medicina (BsAs); 1982, 42:415-421.

7. Cabral HRA. Los Linfocitos en la Enfermedad de Chagas. Libro editado por Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 1 vol; 1984, 204 págs.

8. Cabral HRA, Novak ITC, Robert, GB. Factores inmumocelulares de la cardiomioneuropatía chagásica: Linfocitos T PAS+, incremento de mastocitos. Vénulas de Endotelio Alto. Prensa Médica Argentina; 1998, 85: 525-532.

9. Cabral HRA, Segura-Seco EL, Paolasso EW, Castoldi F, Veloso M, Cichero J. Enfermedad de Chagas aguda y Autoinmunidad (Hipótesis sobre la patogenia de la injuria tisular e intento de verificación experimental. Rev Fac Cienc Méd Córdoba; 1967, 24: 419-431.

10. Iosa D, Casadei M, Dorsey FC. Chagas' cardioneurophaty: effect of ganglioside treatment in chronic dysautonomic patients. A randomized, double blind, paralel, placebo-controlled study. Am Heart J; 1991, 122: 775-785.

11. Sanz LM, Cabral HRA. Transformación blástica de linfocitos de chagásicos cultivados in vitro y desafiados con antígenos de corazón humano. Rev Argentina Cardiol 55 Supl S166; 1986, 419.

12. Cabral HRA, Braxs J, Méndez MT. Transformación blástica de linfocitos de chagásicos frente a antígenos de corazón y de cerebro. Rev Méd Córdoba; 1990, 78: 16-18.

13. Cabral HRA, Novak ITC, Rabino ZM, Robert GB. A simple method to restore exhausted Schiff reagent. J Histotechnol; 1997, 20: 79-80.