

Uso de sonda de DNA para detectar inmunidad celular contra un parasitismo intracelular*

Use of a DNA probe to detect cellular immunity against intracellular parasitism

ARTURO FERREIRA

Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Casilla 2, Correo 15, Santiago, Chile.

By using a specific, repetitive DNA probe, we have been able to detect picograms of *P. berghei* DNA. With this probe we have determined that: a) *P. berghei*, inoculated into Norway Brown rats, reaches its peak of proliferation in the liver 44 h after infection; b) gamma interferon inhibits in a dose-dependent fashion the development of liver exoerythrocytic forms (EEF) *in vivo* and *in vitro*, and; c) endogenous gamma interferon inhibits the development of EEF in hosts immunized with irradiated sporozoites.

Related with and derived from these findings, we have found that, in order to obtain an effective immunity against malaria in experimental animal models, effector mechanisms mediated by T cells are required. This is substantiated by the following facts: a) immune hosts inoculated with monoclonal antibodies against gamma interferon reversed their immunity against a sporozoite challenge; b) This immunity was also reversed when the animals were depleted from their CD8 positive cytotoxic T cells.

Therefore, sterile immunity against this parasite requires not only the presence of antibodies but also the inhibition of the EEF by gamma interferon with participation of CD8 positive T cells.

En Chile la malaria fue erradicada en 1945. Sin embargo, considerando que estamos rodeados de países en que esta enfermedad es un problema actual, existe la posibilidad que enfermos maláricos crucen la frontera, lo que, sumado a la reaparición del zancudo *Anopheles pseudopunctipennis* en el norte del país, hacen que este problema esté adquiriendo actualidad nuevamente.

La enfermedad tiene una enorme prevalencia mundial. Solamente en Africa tropical es responsable de la muerte de más de un millón de niños al año. Por otra parte, este parasitismo intracelular constituye un modelo de gran importancia académica para la comprensión de las estrategias de la interacción huésped-parásito.

El ciclo de la malaria en el huésped mamífero se caracteriza porque la infec-

ción natural procede a través de tres estados morfológica y antigénicamente distintos: el esporozoito durante la fase prehepática, la forma exoeritrocítica (FEE) durante la fase hepática y los merozoitos durante la fase sanguínea posthepática. Esta última es la única fase sintomática.

Cuando un zancudo hembra infectado del género *Anopheles* pica, los esporozoitos pasan a la circulación y son diseminados rápidamente en el organismo, siendo la mayoría de ellos atrapados en el bazo (1), donde son destruidos y procesados por el sistema inmune. Una proporción pequeña de los esporozoitos logra penetrar los hepatocitos, iniciando la segunda fase de la infección. Aquí, ubicada en una vacuola parasitófora, la FEE crece por división mitótica durante un período que varía según la especie. Completado el desarrollo de la FEE, la membrana del hepatocito se rompe y los merozoitos se liberan para infectar los glóbulos rojos circulantes. Los parásitos de cada fase presentan una cubier-

* Apoyado por Proyectos de la Agencia Internacional para el Desarrollo de los Institutos Nacionales de Salud (USA), de la Fundación MacArthur y del Programa Especial para Investigación y Entrenamiento en Medicina Tropical del UNDP/World Bank/WHO.

ta antigénica particular, por lo que una protección efectiva contra la enfermedad requerirá de inmunidad adquirida estado-específica.

De las tres etapas mencionadas, la menos estudiada, en cuanto a mecanismos posibles de inmunidad, es la hepática. Aparentemente, al estar los parásitos ubicados en una vacuola parasitófora intracitoplasmática, estarían protegidos de los mecanismos defensivos inmunológicos convencionales del huésped, en particular los humorales.

Los mecanismos de inmunidad contra la fase esporozoítica prehepática y merozoítica posthepática han sido ampliamente estudiados (2-13). En apariencia, estos mecanismos son fundamentalmente humorales.

El disponer de una sonda de DNA específica para *P. berghei* nos ha permitido contestar si la fase hepática de la enfermedad es susceptible a la inmunidad celular y tratar de comprender el mecanismo mediante el cual esta inmunidad actuaría. En este sentido, hemos investigado si linfocitos, en particular el γ IFN, tienen un efecto antiparasitario a nivel hepático y si pueden, de alguna manera, mediar inmunidad protectora contra un desafío con esporozoitos infectantes. Los resultados presentados aquí demuestran que esta etapa es susceptible de ataque por mecanismos que involucran la inhibición de las FEE por γ IFN con participación de células T CD8 positivas.

MÉTODOS

Esporozoitos. Esporozoitos de *P. berghei* (cepa NK65), mantenidos por pasaje cíclico del parásito por *Anopheles stephensi* y hamsters, fueron recolectados de las glándulas salivales 14-18 días después de ser alimentados con sangre infectada (14). Los desafíos con estos parásitos se hicieron intravenosamente a ratas hembra Norway Brown.

Preparación de la sonda de DNA. Una sonda de 2,3 kilobases (p263-1) fue aislada de una genoteca de *P. berghei* preparada en el plasmidio vector pBR322. Esta sonda representa a una familia de secuencias repetitivas bien conservadas que comprenden aproximadamente el 3% del genoma del parásito.

Marcación de la sonda por corte y traducción (Nick Translation). Los reactivos fueron obtenidos por New England Nuclear (Boston, Mass, USA) y el ensayo realizado en condiciones estándar (15). En una reacción típica, 0,2 μ g de pBR322 con el segmento de DNA de *P. berghei* repetitivo insertado en el sitio BamHI fueron traducidos durante 2,5 h a 13°C, en presencia de DNA polimerasa, DNAasa I, desoxinucleósidos trifosfatos no radiactivos y (α -³²P) dCTP. Los nucleótidos libres fueron eliminados por filtración en columnas de Sephadex G-50 (Pharmacia, Piscataway, New Jersey). Rutinariamente se obtuvieron actividades específicas que excedieron a los 4×10^{-8} cpm $\times \mu$ g⁻¹ de DNA molde.

Purificación del DNA del hígado de rata. Los animales se sangraron por la vena y arteria axilares. Los hígados fueron perfundidos con buffer fosfato-salino, extraídos y congelados en nitrógeno líquido. El DNA fue purificado por procedimientos estándares con algunas modificaciones. Se homogeneizaron los hígados en presencia de 150 mM NaCl, 10 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1% p/v de dodecilsulfato sódico (SDS), agregando luego perclorato de sodio hasta una concentración de 0,5 M. Luego se realizaron dos extracciones con solventes orgánicos, la primera con una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico y la segunda con una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico-fenol- (CIAF). El DNA presente en la fase acuosa fue precipitado con etanol, enrollado en una bagueta de vidrio, disuelto en agua, tratado con RNAasa, α -amilasa, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, proteinasa K, reprecipitado con etanol redisolto en agua y su concentración fue medida a 260 nm. La pureza de la preparación fue estimada determinando las proporciones de absorbancia a 260 y 280 nm. Valores iguales o muy cercanos a 1,8 fueron obtenidos rutinariamente.

Purificación de DNA de P. berghei de la fase sanguínea para la realización de controles positivos estándares. Ratones hembras A/J fueron inoculados intravenosamente con 5.000 esporozoitos de *P. berghei*. 10 días después de la inoculación los animales fueron sangrados en presencia de heparina. La sangre fue centrifugada y el "buffy coat" fue eliminado. El pellet fue lavado, resuspendido y filtrado por una columna de lana de vidrio. No se detectó contaminación con células blancas en el efluente. Los glóbulos rojos fueron tratados con 0,015% p/v de saponina e incubados durante 15 min a 37°C. Los parásitos liberados fueron lavados con buffer salino-fosfato, homogeneizados en presencia de 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM de NaCl, 10 mM de EDTA y 0,5% SDS. Después de tratar con proteinasa K este material fue tratado dos veces con CIAF y precipitado con etanol. A esto siguió un segundo ciclo de tratamientos con proteinasa K-RNAasa, extracción con solventes orgánicos y precipitación con etanol. El pellet fue disuelto en agua y la

concentración de ADN fue medida. La recuperación fue del orden de los 10 μg de ADN a partir de 10⁸ células infectadas.

Inmovilización del DNA en filtros de nitrocelulosa. Las muestras de DNA fueron denaturadas a temperatura ambiente en presencia de NaOH 100 mM. Después de neutralizar con NaH₂PO₄ y ajustar la concentración a 6 x SCC (1 SCC: 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio), se procedió a inmovilizar 200 μg de DNA total por cada filtro de nitrocelulosa de 2,5 cm de diámetro y 0,45 μm de tamaño de poro. Los filtros fueron secados bajo una lámpara infrarroja, horneados bajo vacío a 80°C durante 2 horas, incubados durante 4 h a 42°C en una mezcla de 5 x SCC, 1 x de solución de Denhardt (17), 0,1 mg ml⁻¹ de DNA denaturado de testes de salmón, 0,2 mg ml⁻¹ de RNA, 20 mM de HEPES y 50% v/v de formamida.

Ensayo de hibridación. Se realizó con la sonda p263-1 marcada con ³²P (3 x 10⁶ cpm por filtro) a 42°C durante 15 h. Los filtros se lavaron durante 15 min a temperatura ambiente con 2 x SCC, 0,5% SDS; 15 min con 2 x SCC, 0,1% SDS; seguido por cuatro lavados a 54°C, de 30 min cada uno, con 0,4 x SCC, 0,1% SDS. Después de secar, la radiactividad asociada a los filtros fue medida en un contador de centelleo.

IFN τ recombinante. El τ IFN recombinante y los anticuerpos neutralizantes de la actividad de esta citoquina fueron generosamente donados por los doctores Peter van der Meide y Huub Schellekens del Centro de Primates TNO de Rijswijk, Holanda (18).

RESULTADOS Y DISCUSION

Estandarización del ensayo. La sonda fue probada en ensayos de hibridación contra diferentes cantidades de DNA purificado a partir de parásitos sanguíneos. El límite inferior de sensibilidad fue de 100 pg de DNA parasitario, cantidad que equivale aproximadamente a 1.000 núcleos haploides, asumiendo que cada núcleo haploide contiene 0,1 pg de DNA (19). Se obtuvo una relación lineal entre la radiactividad detectada y la cantidad de DNA parasitario inmovilizado por filtro. Esta curva estándar fue usada para calcular la cantidad de DNA de parásitos presentes en el hígado de animales experimentales. Dado que se pueden inmovilizar 200 μg de DNA total por filtro y como un hígado de rata juvenil contiene aproximadamente 12-14 mg de DNA, el número mínimo de parásitos detectables

por hígado es de 62.500. Esto representa la progenie de sólo 6-7 esporozoitos en el momento máximo de su proliferación, ya que cada uno puede generar alrededor de 10.000 núcleos haploides después de 13 divisiones nucleares (20). Por lo tanto, este ensayo está idealmente adecuado para medir no sólo el efecto de agentes antiesporozoíticos y vacunas, sino también el efecto de agentes que inhiban el desarrollo de las FEE.

Proliferación en el tiempo del DNA parasitario. Dada su gran sensibilidad a los estados hepáticos de *P. berghei* (21), la rata Norway Brown fue elegida como modelo animal. Cinco grupos de 3 ratas cada uno fueron inoculados intravenosamente con 3,4 x 10⁵ esporozoitos por animal. Los hígados fueron extraídos a las 25, 35, 44 y 54 h postinfección. Las cantidades de DNA parasitario detectadas fueron respectivamente 94, 850, 2.500, 9.000 y 7.000 ng, respectivamente. El máximo de proliferación de DNA parasitario en el hígado ocurrió a las 44 h (9 μg de DNA, equivalentes aproximadamente a 9 x 10⁷ núcleos parasitarios). Ya a las 70 h postinfección no se encuentra DNA parasitario en el hígado. En este momento los parásitos se encuentran en el proceso de invasión de los glóbulos rojos.

Inhibición del desarrollo in vivo de las FEE de P. berghei por el τ IFN recombinante. Grupos de 4-5 ratas Norway Brown, de 2-4 meses de edad, fueron inoculados intravenosamente con diferentes dosis de τ IFN recombinante, en distintos momentos antes o después de la inoculación intravenosa de 10⁵ esporozoitos infectantes de *P. berghei*.

El DNA hepático fue purificado a las 44 h postinfección y el DNA parasitario fue detectado con la sonda radiomarcada.

El tratamiento con τ IFN inhibió fuertemente el desarrollo de las FEE, particularmente cuando se administró 5 horas antes del desafío parasitario. Al inocular los animales con 5 x 10⁵ U de τ IFN 18 y 5 h antes y 24 h después del desafío se logró una supresión del 100% de la señal hepática detectada con la sonda. Una sola inoculación de 6,2 x 10⁴ U inoculadas 5 h antes

del desafío produjo un 92% de supresión de la señal hepática. En dos experimentos separados, 150 U antivirales de τ IFN inhibieron un 30% del desarrollo de las FEE, medidos a las 44 horas postdesafío. Esta notable actividad del τ IFN contra un parásito intracelular *in vivo* tiene un solo precedente: la inoculación de 100 U de τ IFN en ratones activa el metabolismo oxidativo de macrófagos residentes y su habilidad para inhibir el crecimiento *in vivo* de *Toxoplasma gondii* y de *Leishmania donovani in vitro* (21).

Cerca del 90% de inhibición se logró con 6×10^4 U de τ IFN. El efecto fue completamente revertido al mezclar la linfoquina con dos dosis neutralizantes de un antisero policlonal de conejo contra el τ IFN de rata.

La inhibición fue menos marcada al inocular el interferón 18 h antes o después del desafío esporozoítico. Por ejemplo, el porcentaje de inhibición logrado con 5×10^5 U de τ IFN administradas 5 h postdesafío fue de 72%, lo que no fue significativamente diferente (prueba de *t* de dos colas) del obtenido con $1,5 \times 10^4$ U, administradas 5 horas antes del desafío (73%).

Inhibición in vitro por τ IFN recombinante humano del desarrollo de P. berghei en la línea celular de hepatoma humano HEP G2.A16 (22). Estas células fueron tratadas durante 24 h con τ IFN recombinante humano. Concentraciones mayores que 1 U/ml inhibieron la multiplicación del parásito en un 97%. En células expuestas a 1 U/ml, la multiplicación de las FEE fue reducida en un 83%. Incluso con 0,01 U/ml se logró una inhibición significativa (prueba de *t* de dos colas).

Se desconoce el mecanismo por el cual el τ IFN inhibe el desarrollo de las FEE. Es posible que el blanco de la citoquina sea el hepatocito mismo. Los experimentos descritos muestran que a dosis iguales o más bajas que aquellas requeridas para su actividad antiviral, el τ IFN impidió el crecimiento de las FEE ubicadas *dentro* de una línea celular de hepatoma humano *in vitro*.

En el caso del *Toxoplasma gondii*, el τ IFN bloquea el desarrollo del parásito al inducir la degradación de triptófano en

los fibroblastos infectados *in vitro* (23). Se desconoce si el τ IFN también induce degradación de triptófano o la acumulación en el hepatocito de metabolitos tóxicos derivados de este aminoácido, inhibiendo así el desarrollo de las FEE.

Estos hallazgos sugieren que los interferones podrían participar en la inmunidad contra la malaria conferida por vacunación con esporozoitos irradiados o por exposición repetida a la picada de zancudos infectados en áreas endémicas. En este sentido, los resultados presentados más abajo prueban la hipótesis de que el τ IFN, liberado por células T sensibilizadas durante el desafío esporozoítico, inhibe el desarrollo de las FEE y es requerido para lograr una inmunidad estéril.

El τ IFN endógeno inhibe el desarrollo de FEE en huéspedes inmunes. Ratas Norway Brown, inmunizadas cada dos semanas con cuatro dosis totales de 10^5 esporozoitos de *P. berghei* irradiados, fueron desafiadas después de tres semanas con $2,5 \times 10^4$ esporozoitos infectantes. Inmediatamente o 2,5 h más tarde los animales recibieron una inoculación intravenosa de 1 mg de un anticuerpo monoclonal que neutraliza la actividad antiviral del τ IFN o 1 mg de un anticuerpo monoclonal control. Los animales no inmunizados que recibieron el anticuerpo monoclonal neutralizante o el anticuerpo control no mostraron niveles detectables de DNA de FEE. Por otra parte, los animales inmunizados que recibieron el anticuerpo neutralizante mostraron niveles sustanciales de desarrollo de FEE (43,5% de los niveles de los controles). Una proporción similar de FEE fue rescatada de la destrucción mediada por el τ IFN endógeno de huéspedes inmunes cuando el anticuerpo neutralizante fue administrado 2,5 h *después* del desafío. Como los esporozoitos pueden invadir los hepatocitos dentro de los 2 min postinoculación (24), se puede concluir que las células blanco del τ IFN endógeno son los hepatocitos.

Efecto de la eliminación de las células T CD8 positivas en la inmunidad al desafío esporozoítico. En estos experimentos quisimos determinar si la eliminación *in vivo* de

células T inmunes revertiría la esterilidad inmune y permitiría el desarrollo de la etapa sanguínea de la enfermedad. Ratones A/Sn fueron inmunizados cada dos semanas con cuatro dosis totales de 10^5 esporozoitos irradiados cada una. Estos ratones permanecieron protegidos al ser desafiados con 5.000 esporozoitos infectantes, inmediatamente seguido de 1 mg de un anticuerpo monoclonal irrelevante usado como control. Sin embargo, se desarrolló la fase sanguínea en los ratones inmunizados que recibieron anticuerpos monoclonales líticos contra células T CD8 positivas, no siendo así en animales que recibieron anticuerpos contra células T CD4 positivas. En otras palabras, la eliminación de células T CD8 positivas en animales completamente inmunes los hizo susceptibles al desafío con 5.000 esporozoitos infectantes. Por el contrario, la destrucción de las células T CD4 positivas no revirtió la inmunidad del huésped.

Las células T CD8 positivas ejercerían su efecto en dos formas. Podrían responder a la presentación de antígenos parasitarios en el contexto de antígenos de clase I, codificados por el complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de la especie afectada, con la producción de τ IFN, el que actuaría luego en forma hormonal contra las FEE localizadas en los hepatocitos. Como se discute más arriba, la unión de la citoquina a receptores de superficies de hepatocitos infectados destruye *in vitro* a las FEE sin la participación de células inmunes efectoras. En apoyo de esta interpretación hemos demostrado, en experimentos no discutidos aquí (25), que la protección proporcionada por la transferencia adoptiva de células T fue revertida por el anticuerpo monoclonal anti- τ IFN. Por otra parte, no podemos descartar que las células T CD8 positivas pueden ser directamente citotóxicas para hepatocitos infectados que presenten antígenos procesados de origen parasitario.

Finalmente, nuestros resultados sugieren que una vacuna efectiva contra la malaria requerirá la incorporación de péptidos sintéticos o de proteínas recombinantes que estimulen a células B, T ayudantes y T citotóxicas. Se posibilitaría así la induc-

ción de niveles altos de anticuerpos neutralizantes y la producción de τ IFN en respuesta a antígenos parasitarios presentados durante el desafío esporozoítico natural.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Rodrigo Ramos y Juan Carlos Aguillón por la lectura crítica de este manuscrito.

REFERENCIAS

1. FERREIRA, A.; ENEA, V.; MORIMOTO, T.; NUSSENZWEIG, V. (1982) *Mol. Biochem. Parasitol.* 19: 103-109.
2. NUSSENZWEIG, R.S.; NUSSENZWEIG, V. (1982) *Phil. Trans. R. Soc. (Lond.)* 289: 117-128.
3. NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R.S. (1985) *Cell* 42: 401-403.
4. POTOCJNAK, P.; YOSHIDA, N.; NUSSENZWEIG, R.S.; NUSSENZWEIG, V. (1980) *J. Exp. Med.* 151: 1504-1513.
5. SPITALNY, G.; NUSSENZWEIG, R.S. (1973) *Exp. Parasitol.* 33: 168-178.
6. CHEN, D.; TIGELAAR, R.; WEINBAUM, F. (1977) *J. Immunol.* 118: 1322-1327.
7. VERHAVE, J.; STRICKLAND, G.; JAFFE, H.; AHMED, A. (1978) *J. Immunol.* 121: 1031-1033.
8. EGAN, J.; WEBER, J.; BALLOU, W.; HOLLINGDALE, M.; MAJARIAN, W.; GORDON, D.; MALLORY, W.; HOFFMAN, S.; WIRTZ, R.; SCHNEIDER, I.; WOOLLETT, G.; YOUNG, J.; HOCKMEYER, W. (1987) *Science* 236: 435-456.
9. GARNHAM, P.C.; BRAY, R.S. (1956) *Rev. Bras. Malar.* 8: 151-160.
10. SHORTT, H.E.; GARNHAM, P.C. (1948) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 41: 785-795.
11. YOELI, M.; MOST, H. (1965) *Nature* 205: 715.
12. JAP, P.; MEIS, J.; VERHAVE, J.; MEUWISSEN, J.T. (1982) *Parasitology* 85: 263-269.
13. JAHIEL, R.; NUSSENZWEIG, R.; VILCEK, J.; VANDERBERG, J. (1969) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18: 823-835.
14. VANDERBERG, J.; NUSSENZWEIG, R.S.; MOST, H.J. (1968) *Parasitol.* 54: 1009-1016.
15. KELLY, R.G.; COZZARELLI, N.; DEUTCHER, M.P.; LEHMAN, I.R.; KORNBERG, A. (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 39-46.
16. MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratories. Cold Spring Harbor, N.Y.
17. DENHART, D.T. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23: 641-646.
18. VAN DER MEIDE, P.; DUBBEL, M.; VIJVERBERG, K.; KOS, T.; SCHELLEKENS, H.J. (1986) *Gen. Virology.* 67: 1059-1071.
19. DAME, J.B.; McCUTCHAM, T.F. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 6984-6990.
20. KILLICK-KENDRICK, R. (1974) *Parasitology* 69: 225-237.
21. MURRAY, H.W.J. (1985) *Immunol.* 134: 1619-1622.
22. HOLLINGDALE, M.R. (1983) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 685-689.

23. PFEFFERKORN, E.R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 908.
24. SHIN, S.; VANDERBERG, J.; TERZAKIS, J. (1982) *J. Protozool.* 29: 448-454.
25. SCHOFIELD, L.; VILLAQUIRAN, J.; FERREIRA, A.; SCHELLEKENS, H.; NUSSENZWEIG, R.S.; NUSSENZWEIG, V. (1987) *Nature* 330: 664-666.