PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS QUE PUEDEN DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR *CHLAMYDIA PSITTACI* EN MODELO MURINO

Del Rio, L., A. Buendía, M.C. Gallego, M.R. Caro, F. Cuello, J. Salinas
Departamento de Patología Animal, (Microbiología e Inmunología), Fac. Veterinaria, Universidad de Murcia

INTRODUCCIÓN

El género *Chlamydia* engloba a bacterias con parasitismo intracelular obligado que afectan a una gran variedad de mamíferos y aves, causando algunas infecciones de gran importancia en la práctica veterinaria. Dentro de este género, y entre las que afectan a los pequeños rumiantes, está la especie *C. psittaci*. La acción patógena de esta bacteria, concretamente el serotipo 1 produce en pequeños rumiantes el aborto enzoótico, enfermedad cuya importancia radica en las pérdidas económicas que causa, y en que además es una zoonosis, con el peligro que eso conlleva para el personal en contacto con el ganado.

En el estudio de la respuesta inmune contra la infección clamidial, se ha demostrado la importancia de una respuesta de base celular (**1**). Así, diferentes autores sugieren que la presencia de anticuerpos neutralizantes proporciona una protección muy débil contra la colonización inicial, mientras que una respuesta Th1 mediada por células y basada en la acción del IFN-γ es necesaria para la erradicación de una infección establecida (**2**,**3**).

El modelo murino es el más utilizado en estudios inmunológicos. Algunos autores han descrito las diferencias que existen en cuanto a la susceptibilidad o resistencia a la infección clamidial en diferentes lineas consanguíneas de ratones tanto en la infección con *C. psittaci* (**4**), como en *C. trachomatis* (**3**,**5**).

El objetivo del presente trabajo ha sido el estudio de la infección por la cepa causante de abortos AB7, para determinar cuáles son los mecanismos inmunitarios que, relacionados con la resistencia a esta infección, son capaces de desarrollar dos lineas consanguíneas de ratones con diferente susceptibilidad a la infección clamidial.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se utilizaron ratones pertenecientes a dos líneas consanguíneas, CBA/JHa (H-2^k) y C57BL/6Ha (H-2^b), (Harlan, UK). Los animales fueron infectados con una dosis subletal : $2x10^5$ unidades formadoras de inclusiones, (UFI) de la cepa AB7 de *Chlamydia psittaci*. Posteriormente se sacrificaron a diferentes momentos post-infección (días 3, 5, 7, 10 y 14 pi.), utilizando, al menos, cinco ratones en cada grupo.

Para estudiar la resistencia natural de cada línea de ratones a la infección clamidial y la evolución de dicha infección en el tiempo, se valoró la carga bacteriana presente en el bazo. El aislamiento de clamidias se realizó sobre cultivos de la línea celular McCoy en placas de 96 pocillos, expresando los resultados en UFI, mediante un método modificado previamente descrito (**6**) Para visualizar y contar las inclusiones clamidiales que se forman en los cultivos de células se realizó una técnica de inmunofluorescencia indirecta, usando un AcMo anti-LPS clamidial (**7**). Con este método, el límite de detección fue $4x10^2$ UFI por bazo (2,6 $\log_{10}$ UFI/bazo).

La porción caudal del bazo se procesó para calcular los porcentajes de subpoblaciones leucocitarias (linfocitos T $CD4^+$ y T $CD8^+$, linfocitos B, neutrófilos, macrófagos y células NK) mediante una técnica de inmunofluorescencia directa para ser posteriormente analizados por citometría de flujo.

Para la determinación de citokinas y valorar las diferencias de producción entre las dos líneas de ratones durante la infección, se utilizaron test comerciales tipo ELISA (R&D System Inc, Minneapolis, MN), estudiando la presencia de citokinas, tanto de respuesta tipo Th-1 (IL-12, γ-IFN), como de tipo Th-2 (IL-4 y IL-10), además del TNF-α).

Para valorar la producción de anticuerpos en suero y analizar los isotipos predominantes se utilizó una técnica ELISA indirecta empleando como antígeno clamidias obtenidas a partir de la cepa AB7. Los resultados se expresaron mediante diluciones decimales de los sueros, considerando como positivos los valores con densidad óptica > 100

Los datos se expresaron en medias aritméticas por grupo ± desviación típica. Para establecer las diferencias entre grupos de ratones se aplicó un test *t* de Student sobre los datos obtenidos, los valores $P<0.05$ se consideran como diferencias significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los **signos clínicos** observados indicaron diferencias de susceptibilidad a la infección entre las dos líneas de ratones. Así, los ratones CBA/J manifestaron signos agudos de infección a los 3 días pi., con un cuadro febril, conjuntivitis bilateral, apatía, deshidratación y anorexia, con evidente pérdida de peso. Estos signos comenzaron a remitir el día 10 pi., resolviéndose la enfermedad hacia el día 14 pi. Sin embargo, los ratones C57 no presentaron signo alguno de enfermedad, con excepción de una ligera apatía durante los primeros días de la infección

En el **análisis bacteriológico** de bazo, se observaron diferencias significativas en los niveles de infección entre los dos tipos de ratones. La carga bacteriana fue siempre mayor en los ratones CBA que en C57, manteniéndose ésta diferencia a lo largo de toda la infección. Estos resultados sugieren que C57 tiene mayor capacidad para resolver la infección.

Para estudiar la respuesta inmune en detalle, y ver dónde radican las diferencias que determinan la menor susceptibilidad de C57, se analizaron las distintas **subpoblaciones linfocitarias** presentes en el bazo. El antígeno CD4 define funcionalmente al Linfocito Th, al que se atribuye un papel fundamental en la respuesta inmune contra *Chlamydia* (**2**). Esta subpoblación linfocitaria no presentó diferencias significativas entre los dos tipos de ratones estudiados, observándose para ambas cepas porcentajes superiores a otros tipos celulares.

Los linfocitos CD8, (linfocitos Tcitotóxicos) presentaron valores muy distintos. Así, en los controles no infectados, se obtuvieron casi el doble en los C57 que en los CBA, aunque su nivel disminuye gradualmente, a medida que avanza la infección, mientras que en la línea CBA se mantuvo el nivel de las células CD8, de forma que la diferencia entre ellos disminuyó con el tiempo

Los porcentajes de linfocitos B fueron superiores en la cepa CBA, lo que puede indicar que estas células no tienen un papel efectivo en la defensa contra *Chlamydia*, como se ha descrito en otros estudios (**8**).

La principal diferencia entre las dos líneas de ratones se presenta en el análisis de subpoblaciones celulares responsables de la respuesta inespecífica, como neutrófilos, macrófagos y células NK (**Figura 1**). Estas células han sido descritas como muy importantes en el control de infecciones por patógenos intracelulares (**9**). Así, en nuestro estudio, en la cepa C57 se observó una presencia mayoritaria de estas tres subpoblaciones celulares, sobre todo al inicio de la infección.

El análisis del suero para la **detección de citokinas**, reveló que la producción de IFN-γ fue similar en las dos líneas de ratones, y alcanzó valores máximos durante la primera semana de infección. Esta citokina ha sido definida como la más importante en la defensa contra clamidia (**9**). Los resultados obtenidos para TNF-α e IL-10

resultan interesantes, ya que en C57 apenas hubo producción de estas citokinas, mientras que para la cepa CBA sus valores se incrementaron notablemente el día 7. En este día pi. los signos clínicos fueron más agudos en estos últimos ratones, lo que sugiere que el TNF-α puede ser el factor determinante de esta sintomatología. La IL-12 sigue una evolución diferente en las dos cepas, aumentando en la primera semana en los CBA y a partir del día 7 pi. en los C57. No se observaron valores detectables para IL-4.

El **análisis de isotipos** en suero indica que existen diferencias inmunológicas entre estas dos líneas, ya que CBA presentó un título de IgG2a de 1/800 el día 7 pi., cantidad considerablemente mayor que de IgG1 (1/50 día 14 pi.), mientras que C57 no produjo cantidades detectables de ninguno de estos anticuerpos.

Los resultados obtenidos indican que tanto CBA como C57 desarrollaron una respuesta tipo Th1 ante la infección con *C. psittaci*, que se manifiesta por una elevada producción de IFN-γ, y bajos niveles de IL-4. La diferencia fundamental en la susceptibilidad que presentaron ambas líneas puede radicar en una respuesta inespecífica que es más eficaz en C57. Este hecho, junto con la mayor presencia inicial de linfocitos CD8, podría ser un mecanismo efectivo para la resolución de la infección.

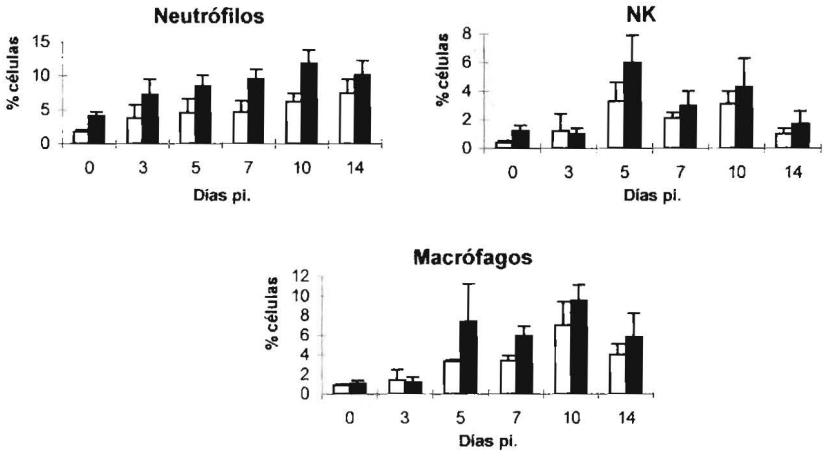


Figura 1: Porcentaje de células positivas en bazo en las dos líneas de ratones estudiadas: CBA (gris) y C57 (negro)

BIBLIOGRAFÍA

1. Rank y col., 1985, *Infect Immun*, **48**: 847-849
2. Su y Caldwell, 1995, *Infect Immun*, **63**: 3302-3308
3. Yang *et al*, *J Immunol*, 1996, **156**: 4338-4344.
4. Buzoni-Gatel *et al*, *Microb Pathogenesis*, 1994, **16**: 229-233.
5. Darville *et al*, *Infect Immun*, 1997, **65**: 3065-3073.
6. Kelly *et al*, *Infect Immun*, 1996, **64**: 4976-4979.
7. Salinas y col. 1995, *Vet Microbiol*, **43**: 219-226.
8. Su y col., 1997, *Infect Inmun*, **65**: 1993-1999.
9. Rank y col., 1992, *infect immun*, **60**: 2599-2605.