

## Efectos de anticoagulantes sobre las sinapsis inmunológicas de rosetas macrófago-linfocitarias autólogas humanas.

*Effects of anticoagulants on the immunological synapses of human autologous rosettes between macrophage and lymphocyte*

Ivón T.C. Novak, Abel D. Orquera.

### Resumen

El área de contacto entre una célula T y una célula presentadora de antígenos es conocida como “sinapsis inmunológica” y las múltiples interacciones que ocurren conducen a una “señalización” para la activación de la célula T. Sin embargo, una sinapsis inmunológica puede ocurrir en diferentes circunstancias, para una variedad de funciones. El fenómeno de múltiples sinapsis inmunológicas de la roseta macrófago-linfocitaria (RML) (2, 3) se refiere a asociaciones celulares entre macrófagos derivados de monocitos y linfocitos autólogos humanos, a partir de cultivos de leucocitos totales extraídos de la sangre, que se unen selectivamente. El fenómeno RML es impedido por inhibidores del procesamiento y presentación antigénica y anticuerpos monoclonales anti-CMH Clase II. Objetivos: evaluar el uso de anticoagulantes alternativos para el estudio de sinapsis inmunes. Materiales y métodos: muestras de sangre humana sana, anticoagulada con EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (n=10); con citrato de Sodio (n=10) y con heparina (n=10). Cultivos autólogos en medio TC199 (SIGMA, St. Louis, MO). Muestras a 72 h y 96 h. Resultados: en los casos con heparina se observaron RMLs; con citrato de Sodio, no se observaron leucocitos viables en cultivos; y con EDTA, se observaron leucocitos, pero no hubo sinapsis inmunes. Discusión: Estos resultados podrían deberse tanto a las acciones quelantes de Ca<sup>2+</sup> del EDTA y del citrato de Sodio, como a la inhibición de la acumulación de F-actina por EDTA, que afectarían las sinapsis inmunes en el fenómeno RML. Conclusiones: La heparina es el anticoagulante de preferencia para el estudio de sinapsis inmunológicas. **palabras clave:** anticoagulantes - sinapsis inmune - interacción celular – linfocitos-macrófagos- rosetas

### Abstract

The contact area between a T cell and antigen-presenting cell is known as “immunological synapse” and the multiple interactions that occur leading to a “signal” for T cell activation. However, an immunological synapse can occur in different circumstances, for a variety of functions. The phenomenon of multiple immunological synapses on macrophage-lymphocyte rosette (MLR) (2, 3) refers to cellular association between human blood monocyte-derived macrophages and lymphocytes from autologous cultures total leukocytes extracted from the blood, which bind selectively forming rosettes with central macrophage and lymphocytes adhered. Inhibitors of antigen processing and presentation and monoclonal antibodies anti-Major Histocompatibility Complex Class II preclude the MLR phenomenon. Objective: As the MLR phenomenon was originally described using heparin, we studied the use of alternative anticoagulants. Materials and methods: human blood samples, anticoagulated with EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (n = 10) Sodium citrate (n = 10) and controls with heparin (n = 10) healthy samples. Autologous cultures in medium TC199 (Sigma, St. Louis, MO). Culture samples were analysed at 72 h and 96 h. Results: In all heparin cases were observed MLRs, in sodium citrate cases, there was no viable leukocytes in cultures, and in cases with EDTA, leukocytes were observed, but the MLR phenomenon did not occur, there was no immune synapse. Conclusions: These results could be due to the chelating action of Ca<sup>2+</sup> from the EDTA and sodium citrate as the inhibition of the

accumulation of F-actin by EDTA, which affect the immune synapse in MLR phenomenon.

key words: anticoagulants - immunological synapses - cell interaction – lymphocytes -macrophages-rosettes.

## **Introducción**

Durante las respuestas inmunes adaptativas los linfocitos T reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas del CMH sobre las células presentadoras de antígenos. El área de contacto entre una célula T y una célula presentadora de antígenos es conocida como “sinapsis inmunológica”<sup>(1)</sup> y las múltiples interacciones que ocurren conducen a una “señalización” para la activación de la célula T. El fenómeno de múltiples sinapsis inmunológicas de la Roseta Macrófago-Linfocitaria (RML)<sup>(2-5)</sup> se refiere a asociaciones celulares selectivas entre macrófagos derivados de monocitos y linfocitos autólogos humanos, a partir de cultivos de leucocitos totales extraídos de la sangre, que se unen selectivamente formando rosetas con un macrófago central y linfocitos adheridos (RMLs). Se define una RML cuando tres o más linfocitos se encuentran unidos a un macrófago central. Este fenómeno es tiempo de cultivo y densidad celular dependiente. Leucocitos obtenidos recientemente de sangre periférica son incapaces de formar RMLs mientras que las muestras cultivadas comienzan a formar RMLs después de 15 hs de cultivo coincidiendo con la transformación macrófágica y la ingestión del material autólogo a partir de la muerte de neutrófilos también presentes en el cultivo celular total. El fenómeno RML es impedido por inhibidores del procesamiento y presentación antigénica y por anticuerpos monoclonales anti-Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II<sup>(6,7)</sup>. Esta interacción célula-célula en RML corresponde a la interrelación de células T CD4+<sup>(3)</sup> con compromiso del TCR, con macrófagos a través de sus moléculas Clase II del CMH, en la presentación antigénica en múltiples sinapsis inmunes<sup>(3,4)</sup>. Las sinapsis inmunes descritas en el fenómeno de RML fueron observadas a partir

del cultivo de células extraídas de sangre anticoagulada con heparina sódica<sup>(2)</sup>. La heparina en su presentación puede incluir concentraciones de Sodio y Litio. Normalmente la heparina con Litio es utilizada para estudios bioquímicos y la sódica en recuento celular. El EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) es un anticoagulante utilizado principalmente en el estudio de recuento de células y el citrato de Sodio, generalmente se utiliza en estudios de coagulación y es de uso común en los bancos de sangre<sup>(8)</sup>.

Objetivo: Como el fenómeno RML se describió originalmente con el uso de heparina como anticoagulante en la extracción de sangre venosa, nos propusimos como objetivo en este trabajo evaluar el uso de anticoagulantes alternativos para el estudio de sinapsis inmunológicas de células extraídas de la sangre.

## **Materiales y Métodos**

Se utilizaron muestras de sangre humana, anticoagulada con EDTA (Vacuette K3E) (n=10); con citrato de Sodio (109 mM) (3,2%) (n=10) y controles con heparina sódica (25 U/ml sangre) (2500U Northia) (n=10), muestras sanas. Las muestras de sangre periférica por punción de sangre venosa, fueron obtenidas por donación en anonimato, con datos de serología, del Instituto de Hematología y Hemoterapia, Universidad Nacional de Córdoba. Las muestras de sangre son sometidas a las siguientes pruebas en el Instituto de Hematología y Hemoterapia de la UNC: Hudleson (Wiener), VDRL (Wiener), Chagas HAI (Wiener), Chagas EIE (Biomerieux), HBs EIE (Biomerieux), HBc (Biomerieux), HCV EIE (Murex), HIV Ac EIE (Biomerieux), HIV Ag EIE (Biomerieux), HTLV EIE (Murex). Cultivos celulares: se realizaron cultivos autólogos de leuco-

citos totales en medio TC199 (SIGMA, St. Louis, MO) Las células fueron cultivadas en suspensión, en frascos de vidrio cónicos estériles, a 37 °C. Control de viabilidad celular mediante el test clásico de exclusión con el colorante Azul Tripán al 0,5 %. Muestras a 72 hs y 96 hs. Técnica de preparación de RML<sup>(2,3)</sup>: todas las muestras son cosechadas con pipeta Pasteur, previa agitación del frasco de cultivo y con el agregado de solución fisiológica (lavado) son centrifugadas a 200 g, 10 minutos. Las células sedimentadas son resuspendidas en gotas de solución fisiológica, se efectúan citopreparaciones sobre portaobjetos, depositando gotas de dichos resuspendidos y 5 minutos después, cuando sedimentaron en cámara húmeda, se los centrifuga a pocas g en citodispersador mediante un dispositivo ad hoc<sup>(9)</sup>, para producir distribución celular y desecar la citopreparación. Fijación en alcohol, 95°. Coloraciones: hematoxilina y eosina (H/E), Azul de Toluidina.

**Resultados**

En todos los casos con uso de heparina como anticoagulante en la extracción de sangre se observaron RMLs a partir de los cultivos (figuras 1 y 2). En los casos con citrato de Sodio, no se observaron leucocitos viables en las horas de muestreo de los cultivos. En los casos con uso de EDTA como anticoagulante en la extracción sanguínea, se observaron leucocitos viables en los cultivos, pero no ocurrió el fenómeno RML, no se observaron sinapsis inmunes (figuras 3 y 4).

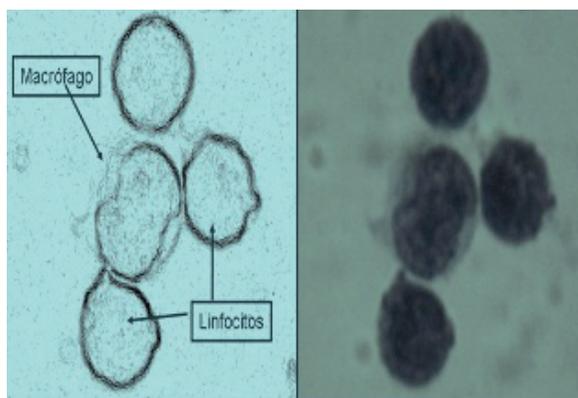


Figura 1: (RML) Roseta formada por un macrófago derivado de monocito y tres linfocitos, 72 hs de cultivo total leucocitario autólogo, a partir de sangre de persona sana anticoagulada con heparina. Azul de Toluidina, 1000x.

**Discusión**

La interacción selectiva de múltiples sinapsis inmunes en RMLs es tiempo de cultivo y densidad celular dependiente. Se ha focalizado mucha atención en la organización de las proteínas en el área de contacto entre una célula T y una CPA, en su sinapsis inmune. En experimentos in vitro se ha descrito a las proteínas en dos regiones, una central denominada c-SMAC (central supramolecular activation complex): conteniendo el receptor de célula T (TCR) y moléculas de señalización asociadas y una periférica denominada p-SMAC (peripheral supramolecular activation complex), conteniendo LFA-1 y talina<sup>(10)</sup>. Un contacto inicial puede establecerse entre moléculas de adhesión del linfocito T y la CPA, pero es el compromiso del receptor de la célula T (TCR) con el antígeno presentado por el CMH el que establece la estabilización de la unión en la interacción célula-célula<sup>(11)</sup>. Durante el contacto célula-célula, el TCR y otros co-receptores causan la polarización de la célula T, remodelando el citoesqueleto de actina y reposicionando el aparato de Golgi y el centro organizador de microtúbulos entre el núcleo y el área de contacto<sup>(12, 13)</sup>. En cortos tiempos, las señales Ca(2+) ayudan a estabilizar los contactos entre la célula T y la CPA, a través de cambios en la motilidad y la organización del citoesqueleto<sup>(14)</sup>. En este trabajo los grupos en los que se utilizaron los anticoagulantes EDTA y citrato de Sodio en la extracción sanguínea no permitieron la ocurrencia en los cultivos del fenómeno RML de múltiples sinapsis

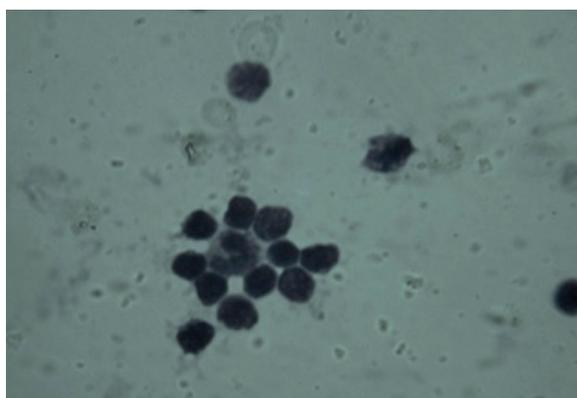


Figura 2: (RML) Roseta formada por un macrófago derivado de monocito y numerosos linfocitos asociados, 96 hs de cultivo total leucocitario autólogo de persona sana, a partir de sangre anticoagulada con heparina. Azul de Toluidina, 400x.

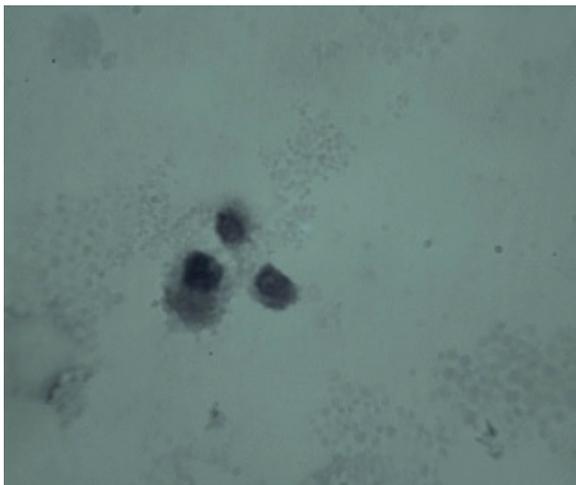


Figura 3: Muestra de 72 hs de cultivo autólogo de leucocitos totales de sangre humana periférica sana anticoagulada con EDTA. No se observa el fenómeno RML. 1000x (H/E).

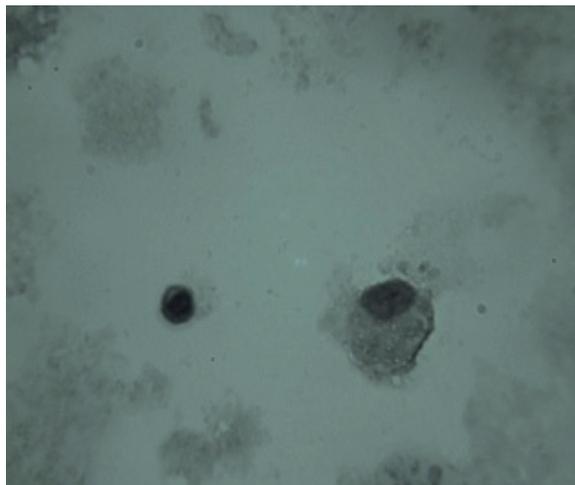


Figura 4: Un linfocito y un macrófago en muestra de 96 hs de cultivo autólogo a partir de leucocitos totales de sangre humana sana periférica anticoagulada con EDTA. No se observa el fenómeno RML. 400x (H/E).

inmunes ni tampoco se observaron asociaciones individuales. Estos resultados podrían deberse tanto a las acciones quelantes de  $Ca^{2+}$  del EDTA y del citrato de Sodio, como a la inhibición de la acumulación de F-actina por EDTA <sup>(14)</sup>, que afectarían las sinapsis inmunes en el fenómeno RML. Por otra parte, en las muestras del grupo en que se usó heparina como anticoagulante, se observaron sinapsis inmunológicas en RMLs en los cultivos celulares autólogos, en coincidencia con trabajos previos, en los que se utilizó ese anticoagulante para la extracción de sangre venosa <sup>(2-7)</sup>.

### Conclusiones

A partir de los resultados de este trabajo, acerca de los efectos de los diferentes anticoagulantes sobre las sinapsis inmunológicas de rosetas macrófago-linfocitarias autólogas humanas, se puede inferir que la heparina es el anticoagulante de preferencia en la obtención de muestras sanguíneas para el estudio de sinapsis inmunológicas.

### Bibliografía

1. Grakoui, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin MI: *The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation.* *Science*; 1999, 285: 221-227.
2. Cabral HRA, Novak ITC: *Spontaneous formation of rosettes by autologous human monocyte-macrophages and lymphocytes in cell cultures.*

*Rev Fac Cienc Med Córdoba*; 1992, 50: 25-26.

3. Cabral HRA, Novak ITC: *Autologous rosette formation by human blood monocyte-derived macrophages and lymphocytes.* *Am J Hematol*; 1999, 60: 285-288.

4. Novak ITC, Cabral HRA: *Rosettes formation by macrophages with adhered T lymphocytes is precluded by inhibitors of antigen processing-presentation* *Biocell*, 2008, 32(2): 169-174.

5. Novak ITC, Cabral HRA: *Immunological Synapses Formation: Rosettes between Human Autologous Cultured Monocyte-Macrophages and Lymphocytes* *Proceedings of ECI, 2009, Medimond International Proceedings*; 2009, L913C0012, p.117-121.

6. Novak ITC, Cabral HRA: *Brefeldin A and chloroquine inhibited the formation of immunologic synapses and autologous rosettes between cultured monocytes-macrophages and lymphocytes.* *Mol Biol Cell*; 2004, 15:S (suppl), abstract p 94a 352.

7. Novak ITC, Cabral HRA: *Formation of Rosettes between Autologous Cultured Monocyte-Macrophages and Lymphocytes: Analysis by a Regression Model.* *Mol Biol Cell*; 2005, 16:S (suppl), abstract p108a-109a.

8. Prieto Mencheros S, Amich Oliveras S, Sacue Martinez ML: *Laboratorio clínico. Principios Generales.* Editorial Interamericana. Mcgraw-Hill. 1993, p 245-260.

9. Cabral HRA: *Los linfocitos en la Enfermedad*

de Chagas. *Estudio sobre algunos aspectos de la función linfocitaria*. Editado por Universidad Nacional de Córdoba, Rep. Argentina. 1984, p 201.

10. Lin JL, Miller MJ, Shaw AS: *The cSMAC: sorting it all out (or in)*. *J Cell Biol*; 2005, 170: 177-182.

11. Underhill DM, Bassetti M, Rudensky A, Adrem AJ: *Dinamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation*. *J Exp Med*; 1999, 190: 1909-1914.

12. Kupfer A, Dennert G, Singer SJ: *Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets*. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1983; 80: 7224-7228.

13. Kupfer A, Dennert G: *Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells*. *J. Immunol*; 1984, 133: 2762-2766.

14. Lewis RS: *Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes*. *Annu Rev Immunol*; 2001, 19:497-521.

**Agradecimiento:**

**Al Instituto de Hematología y Hemoterapia, Universidad Nacional de Córdoba por las muestras donadas.**