

## ACTIVACION DE CELULAS SUPRESORAS DE LA RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD TARDIA EN RATONES BALB/c INFECTADOS O VACUNADOS CON *LEISHMANIA MEXICANA PIFANOI*

HILDA A. PÉREZ, MILAGROS HENRIQUEZ & MERCEDES DE LA ROSA

*Los ratones BALB/c inmunizados SC con promastigotes no viables de Leishmania mexicana pifanoi, desarrollaron respuestas de hipersensibilidad tardía (RHT) contra el parásito. En contraposición, los ratones BALB/c infectados crónicamente con L.m. pifanoi y aquellos inmunizados IV con una dosis supraóptima de parásitos muertos, mostraron inhibición de la RHT. La supresión de la RHT en los animales infectados, estuvo precedida por un estado transitorio de inmunidad celular, manifestado durante la fase inicial del desarrollo de las lesiones (4-12 semanas). La inhibición de la RHT observada en los animales infectados o inmunizados con dosis supraóptimas, fue causada por un mecanismo activo, transferible a receptores singénicos a través de las células esplénicas de los donantes suprimidos. La población de células supresoras fue no adherente a "nylon", sensible al tratamiento con un suero anti-timocitos de ratón y C', y de acción específica sobre la RHT contra antígenos leishmánicos. Se propone que la ocurrencia de células T supresoras de la RHT en los animales infectados crónicamente o inmunizados con dosis supraóptimas, es causada por el exceso de carga antigénica. Esta última, en el caso de los animales infectados, secundaria a una falla primaria en el control inmunológico de la población parasitaria.*

Palabras-clave: células supresoras – hipersensibilidad tardía  
– ratones BALB/c – *Leishmania mexicana pifanoi*

En trabajos anteriores comunicamos la acentuada susceptibilidad genética de los ratones BALB/c a la infección con parásitos del complejo *Leishmania mexicana* (Pérez, Arredondo & González, 1978; Pérez, Labrador & Torrealba, 1979; Arredondo & Pérez, 1979). Luego de la inoculación con  $1 \times 10^2$  –  $1 \times 10^4$  amastigotes, estos animales muestran lesiones progresivas con metástasis frecuentes. La respuesta de hipersensibilidad tardía (RHT) contra el parásito es negativa en los animales infectados crónicamente, observándose además conspicuas modificaciones de la respuesta inmune, entre las que destaca la activación de células supresoras inespecíficas con características de macrófagos (Arredondo & Pérez, 1979; Bolívar, 1982; Pérez & Bolívar, 1985a, 1985b). En esta oportunidad comunicamos el hallazgo de células T supresoras (Ts) de la RHT contra antígenos leishmánicos, en ratones BALB/c infectados y en aquellos inmunizados con dosis supraóptimas de parásitos muertos.

### MATERIALES Y METODOS

**Parásito.** Utilizamos el aislado AMP obtenido de un caso de leishmaniasis cutánea difusa (LCD), (Deane et al., 1966). El aislado AMP presenta características biológicas e inmunológicas del complejo *L. mexicana* (Pérez, Arredondo & González, 1978; Petralanda et al., 1980), dado su origen lo referiremos como *L. mexicana pifanoi* (Medina & Romero, 1962; Lainson & Shaw, 1973). Detalles concernientes a la obtención de este aislado (Deane et al., 1966) y a su mantenimiento en nuestro laboratorio (Pérez, Arredondo & González, 1978) ya han sido descritos.

**Hospedadores e infección.** Se utilizaron ratones BALB/c, hembras, con edades comprendidas entre 10-12 semanas, suministrados por el bioterio del IVIC. Grupos de 20-30 animales fueron inoculados subcutáneamente (SC) con  $1 \times 10^5$  amastigotes del aislado AMP de *L.m. pifanoi* (Pérez, Arredondo & González, 1978), las lesiones se examinaron cada 15 días y su tamaño se determinó utilizando un calibrador de precisión, con 0,05 mm de apreciación (Schnelltäster, Kropflin, Alemania).

### Antígenos.

**Promastigotes no viables.** Se obtuvieron cultivos de promastigotes del aislado AMP de *L.m. pifanoi* en medio LIT, preparado según Castellani, Ribeiro & Fernandes (1967), suplementado

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Centro de Microbiología y Biología Celular. Laboratorio de Inmunoparasitología, Apartado 1827, Caracas 1010A, Venezuela.

Recibido para publicación en 21 de Marzo y acepto en 6 de Agosto de 1985.

tado con 10% de suero fetal de bovino (SFB, Grand Island Biological Co., N.Y., GIBCO) y esterilizado por filtración a través de una membrana "Millipore" de  $0,22\mu$  (Millipore Corp., Mass.). Los cultivos se cosecharon en su fase exponencial y los parásitos se lavaron 5X con solución salina estéril (NaCl 0,85%). La concentración de parásitos se determinó mediante recuento en cámaras y previo ajuste a la concentración deseada, la suspensión de parásitos se calentó a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. y se guardó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (Pérez & De La Rosa, 1985).

**Eritrocitos de carnero.** Obtenidos a partir de sangre fresca de carnero recogida en solución de Alsever, suministrada por el bioterio del IVIC. Los eritrocitos de carnero (EC) se lavaron 4X con solución salina estéril y se suspendieron al 10% (v/v) en dicha solución.

**Inmunización y ensayo de la reacción de hipersensibilidad tardía.** Con la finalidad de provocar RHT contra promastigotes no viables de *L.m. pifanoi* los ratones se inmunizaron según protocolo previamente establecido (Pérez & De La Rosa, 1985) que describimos de manera sucinta. Varias dosis de promastigotes muertos por calor se inyectaron SC en la base de la cola o IV en una de las venas caudales. Siete días después, la RHT se evocó en la almohadilla plantar (AP), inyectando SC  $1 \times 10^7$  parásitos muertos contenidos en un volumen no mayor de  $50\mu\text{l}$ . Para provocar RHT contra EC,  $50\mu\text{l}$  de la suspensión de EC se inyectaron SC en la base de la cola y a los 5 días, la RHT se evocó en la AP (Pérez, Bolívar & San Blas, 1984). En todos los casos la RHT se determinó a las 24h después del reto, midiendo el grosor de la AP con un calibrador de precisión (Crowle, 1959; 1975). Los resultados se expresan como el porcentaje de incremento de la AP (% IAP) que recibió el reto con respecto a la testigo o el porcentaje de supresión (% S), calculados según las fórmulas:

$$\% \text{ IAP} = \frac{\text{Grosor de la AP inyectada} - \text{Grosor de la AP no inyectada}}{\text{Grosor de la AP no inyectada}} \times 100$$

$$\% \text{ S} = \frac{\text{Respuesta del control positivo} - \text{Respuesta del grupo experimental}}{\text{Respuesta del control positivo}} \times 100$$

Los datos obtenidos fueron objeto de análisis estadístico mediante la prueba de la *t* de "Student". El nivel de significación establecida fue de  $p < 0,05$ .

**Tratamiento con ciclofosfamida.** Se utilizó esta droga en su forma comercial, Endoxan-Asta adquirida de la casa Asta Werke A.G. (Alemania). La droga disuelta en solución salina estéril se administró por vía IP en dosis de 200 mg/kg de peso corporal, empleando siempre soluciones de preparación reciente.

**Transferencia de células.** Los donantes de células se sacrificaron por luxación cervical y sus bazos se separaron asépticamente. Las células esplénicas se dispersaron en solución salina balanceada (SSB), triturando suavemente los bazos en un homogeneizador de vidrio (Corning Glass Works, Corning, N.Y.). Seguidamente la suspensión celular se dejó sedimentar durante 10 min. en baño de hielo para separar los grumos celulares, se transfirió a un tubo cónico de 15 ml y se centrifugó a  $180 \times g$  durante 10 min. Después de descartar la fase líquida, el taco celular se dispersó en SSB y la suspensión celular se ajustó a la concentración requerida, previo recuento en cámara. La transferencia de las células a ensayar se hizo bien de manera sistémica mediante inyección IV o localmente en el sitio de inyección del antígeno. Cuando la transferencia fue sistémica, la RHT se evocó inmediatamente por reto SC en la AP. En los ensayos de transferencia local, la dosis inmunizante de antígeno y las células se inyectaron SC en la base de la cola y la RHT se evocó después de siete días.

**Tratamiento con suero anti- $\theta$ .** A tal efecto obtuvimos en conejos un suero anti-timocitos de ratón (ATR), siguiendo el procedimiento descrito por Joostes et al. (1968), dicho suero fue absorbido y probado conforme a procedimientos publicados (James et al., 1970; Jooste et al., 1968). Para realizar el ensayo de lisis, 300.000 células esplénicas se mezclaron (v.v.v) con diluciones de suero ATR (previamente inactivado) y de C' (suero fresco de conejos no inmunizados). Luego de 90 min. a  $37^{\circ}\text{C}$ , el grado de lisis se determinó según la proporción de células capaces de excluir el azul de tripano. Bajo las condiciones referidas, diluciones 1:100 del suero ATR seleccionado para este trabajo, resultaron líticas para 35% de los linfocitos esplénicos, provocando una reducción de 90% en la linfoblastogénesis estimulada por Concanavalina A y ningún efecto sobre la respuesta a lipopolisacárido de *E. coli*. Los ensayos de linfoblastogénesis se hicieron según proce-

dimientos descritos anteriormente (Pérez, Arredondo & González, 1978; Arredondo & Pérez, 1979; Pérez, 1980; Pérez & Bolívar, 1985a, b).

**Técnicas de separación de poblaciones celulares.** Las células esplénicas de animales infectados, inmunizados o controles, se separaron según su adherencia a la lana de "nylon" de acuerdo a las metodologías comunicadas por Julius, Simpson & Herzenberg (1973) y por Trizio & Cudkowicz (1974), que describimos sucintamente. Trescientos millones de células viables contenidos en alícuotas de 2 ml de SSB suplementada con 5% de SFB (SSB-SFB), se colocaron sobre el tope de una columna de lana de "nylon" (Leukopak, Fenwal Labs. Inc., Deerfield, Ill) empaquetada, hasta el nivel de 6 ml, en una jeringa plástica de 10 ml. Luego de 45 min. a 37°C, las células T no adherentes a "nylon" se recogieron en 20 ml de SSB-SFB. La columna se lavó con 100 ml de SSB-SFB y se procedió a separar las células adherentes a "nylon", presionando y comprimiendo con pinzas la lana de "nylon". Ambas poblaciones de células, adherentes y no adherentes a "nylon", fueron lavadas por centrifugación suave, contadas y ajustadas a la concentración requerida.

## RESULTADOS

**Respuestas de hipersensibilidad tardía en ratones BALB/c inmunizados con promastigotes no viables.** La RHT se examinó a los siete días de la inmunización SC en la base de la cola. Previamente determinados el intervalo óptimo entre la inmunización y el reto y la dosis óptima de reto para evocar la RHT. Al comparar las respuestas de los animales inmunizados con respecto a los controles que recibieron únicamente la dosis de reto, solo observamos RHT óptimas en los animales inmunizados con  $3 \times 10^8$  parásitos, dosis menores ( $3 \times 10^7 - 3 \times 10^6$ ) resultaron subóptimas, aunque la RHT fue significativa ( $p \leq 0,001$ ); dosis de  $3 \times 10^5$  parásitos dieron respuestas sin significado estadístico (Tabla I). Cuando los animales fueron inmunizados por la ruta IV, sólo las dosis comprendidas entre  $5 \times 10^6$  y  $5 \times 10^7$  parásitos estimularon óptimas RHT. Dosis menores ( $5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ ), resultaron subóptimas y dosis de  $5 \times 10^8 - 5 \times 10^9$ , provocaron inhibición de la RHT (Tabla I). Conforme a lo comunicado anteriormente (Pérez & De La Rosa, 1985), el estudio de la cinética de la RHT durante las 72 h siguientes al reto, reveló máximos valores a las 24 h aún elevados a las 48 h (Tabla II).

TABLA I

Respuestas de hipersensibilidad tardía (RHT) en ratones BALB/c inmunizados con promastigotes no viables de *Leishmania mexicana pifanoi*

Dosis inmunizante de promastigotes	Ruta	% IAP *(Media $\pm$ DEM, n = 5)
$3 \times 10^5$	SC	10,0 $\pm$ 4,2
$3 \times 10^6$	SC	48,2 $\pm$ 1,6
$3 \times 10^7$	SC	60,5 $\pm$ 3,4
$3 \times 10^8$	SC	96,5 $\pm$ 3,4
$5 \times 10^4$	IV	32,1 $\pm$ 5,0
$5 \times 10^5$	IV	37,8 $\pm$ 8,5
$5 \times 10^6$	IV	60,0 $\pm$ 9,6
$5 \times 10^7$	IV	54,0 $\pm$ 9,3
$5 \times 10^8$	IV	28,0 $\pm$ 4,0 †
$5 \times 10^9$	IV	30,0 $\pm$ 5,6 ††
Control de reto	--	17,2 $\pm$ 6,3

\* La RHT se expresa según el Porcentaje de incremento de la almohadilla plantar (% IAP), luego del reto con  $1 \times 10^7$  promastigotes muertos.

† y †† significativamente menores ( $p \leq 0,001$ ) que en los animales inmunizados IV con  $5 \times 10^6$  promastigotes.

**Respuestas de hipersensibilidad tardía en animales infectados.** En un estudio anterior (Pérez, Arredondo & González, 1978) notamos que a las 18-20 semanas de infección, los ratones BALB/c no mostraban RHT contra el parásito. Sin embargo, al evaluar la RHT a lo largo de la infección encontramos una RHT significativa a las 4-12 semanas de infección, cuando las lesiones eran apenas detectables o todavía pequeñas, pero posteriormente y coincidiendo con un incremento acelerado en el tamaño de las lesiones, la RHT resultó gradualmente inhibida. La RHT que encontramos a las 16 semanas fue de una magnitud significativamente menor ( $p \leq 0,001$ ) que la determinada a las 12 semanas, no obstante los valores todavía eran significativos ( $p \leq 0,001$ ) con

respecto a los controles de reto; pero a partir de las 18 semanas no fue posible evocar RHT específica en los animales infectados. Los datos presentados en el Tabla III permiten una comparación entre el curso de las lesiones y aquel de la RHT.

TABLA II

Cinética de la respuesta de hipersensibilidad tardía (RHT) post-reto en animales inmunizados\* con *Leishmania mexicana pifanoi*

Tiempo después del reto	Porcentaje de incremento de la almohadilla plantar (Media $\pm$ DEM, n = 5)**	
	Controles	Inmunizados
24 h	16,0 $\pm$ 4,3	105,3 $\pm$ 6,0
48 h	8,8 $\pm$ 5,0	97,1 $\pm$ 9,1
72 h	7,1 $\pm$ 3,0	34,3 $\pm$ 8,3

\* Inmunización practicada subcutáneamente en la base de la cola con  $1 \times 10^7$  promastigotes muertos.

\*\*La RHT se expresa según el porcentaje de incremento de la almohadilla plantar, luego del reto con  $1 \times 10^7$  promastigotes muertos.

TABLA III

Comparación entre el curso de las lesiones y de la respuesta específica de hipersensibilidad tardía (RHT) en ratones BALB/c infectados con *Leishmania mexicana pifanoi*\*

Tiempo de infección (semanas)	% IAP (Media $\pm$ DEM; n = 5)	% ITL (Media $\pm$ DEM; n = 5)
4	37,1 $\pm$ 2,2	15 $\pm$ 2,3
8	49,2 $\pm$ 5,2	101 $\pm$ 22,8
12	53,4 $\pm$ 3,2	358 $\pm$ 67,2
16	38,6 $\pm$ 2,5	530 $\pm$ 122,8
18	14,8 $\pm$ 6,6	698 $\pm$ 161,2
Control de reto	12,9 $\pm$ 3,1	

\*Animales inoculados con  $1 \times 10^5$  amastigotes y retados a los intervalos indicados con  $1 \times 10^7$  promastigotes muertos inyectados subcutáneamente en la almohadilla plantar de la pata sana. La RHT se expresa según el porcentaje de incremento de la almohadilla plantar (% IAP) después del reto; el curso de la infección de acuerdo al porcentaje de incremento en el tamaño de la lesión (% ITL).

**Células supresoras de la respuesta de hipersensibilidad tardía en animales infectados.** La expresión y posterior inhibición de la RHT contra el parásito, sugirió la participación de un mecanismo activo supresor de la RHT de los animales infectados. Por otra parte, la posibilidad de provocar RHT contra el parásito en ausencia de infección, ofreció un sistema útil para investigar dicho mecanismo. La Fig. 1, permite comparar la RHT de animales inmunizados SC con parásitos muertos (Grupo 1) y de aquellos que recibieron conjuntamente con los parásitos inmunizantes: la transferencia local de  $1 \times 10^7$  células esplénicas normales (Grupo 2) o un número similar de células esplénicas obtenidas a las 18 semanas de infección (Grupo 3). Los receptores de células de animales infectados mostraron una inhibición significativa ( $p \leq 0,001$ ) de la estimulación de la RHT contra el parásito, mientras que la RHT de los grupos 1 y 2 fue de magnitud similar. Cuando titulamos la actividad inhibitoria de la RHT ejercida por las células esplénicas de animales infectados, comprobamos que aún  $1 \times 10^5$  células esplénicas, Grupo 5, eran suficientes para suprimir significativamente ( $p \leq 0,001$ ) la estimulación de RHT contra el parásito (Fig. 1). La actividad supresora de la RHT presente en el bazo de los animales infectados pudo vincularse a la población de células no adherentes a "nylon", ya que la transferencia local de esa población celular produjo una supresión de la RHT (54,5% S) todavía mayor que la ejercida por las células esplénicas totales (35,5% S), mientras que la RHT de los animales que recibieron células adherentes a "nylon" fue similar a la de los receptores de células normales (Tabla IV). Por cuanto la población de células esplénicas no adherentes a "nylon", comprende fundamentalmente a los linfocitos del tipo T, presumimos la participación de estas células en la supresión de la RHT aquí referida. Dicha presunción fue apoyada por las experiencias que nos mostraron niveles comparables de RHT, entre los controles recep-

tores de células normales y aquellos receptores de células esplénicas infectadas, tratadas con suero ATR (Tabla IV).

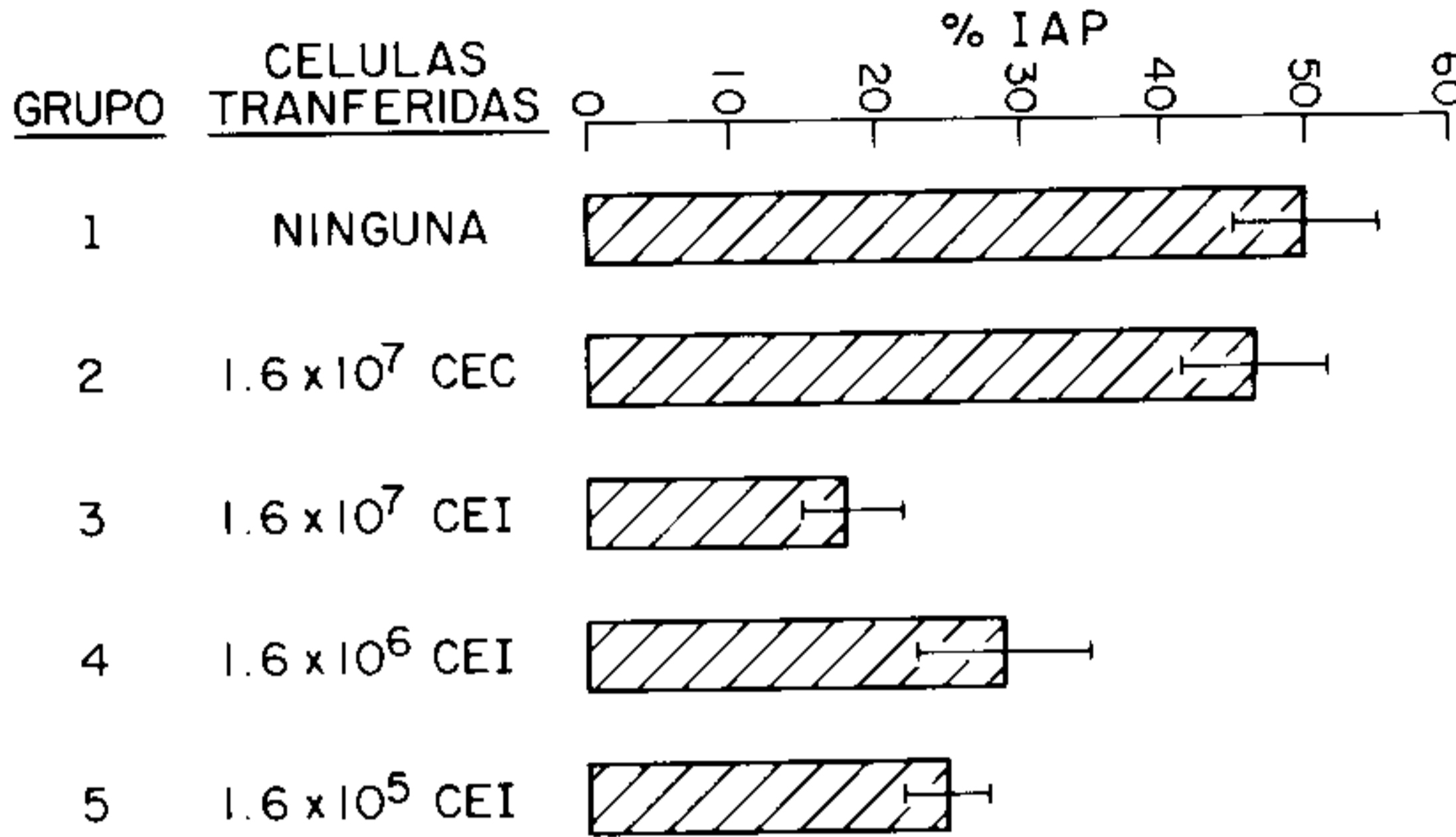


Fig. 1: efecto supresor de las células esplénicas de animales infectados crónicamente (18 semanas) sobre la estimulación de la respuesta de hipersensibilidad tardía (RHT), estimulada por la inmunización SC en la base de la cola con  $1 \times 10^7$  promastigotes muertos. La RHT se expresa según el % de incremento de la almohadilla plantar (% IAP) luego del reto con  $1 \times 10^7$  promastigotes; se presenta la respuesta de los animales inmunizados y retados (Grupo 1) y de aquellos que recibieron, además de la inmunización, la transferencia local de células esplénicas controles (CEC) (Grupo 2) o células esplénicas de animales infectados (CEI), (Grupos 3-5). Reto practicado a los siete días de inmunización. Media  $\pm$  DEM, n = 5.

TABLA IV

Respuestas de hipersensibilidad tardía (RHT) en animales receptores de diferentes subpoblaciones de células esplénicas provenientes de animales singénicos infectados crónicamente con *Leishmania mexicana pifanoi*

Donante	Población celular	% IAP (Media $\pm$ DEM, n = 6) *
Controles	Células totales	40,0 $\pm$ 2,4
Infectados **	Células totales	25,6 $\pm$ 2,6 (35,5) †
	Células no-adherentes a "nylon"	18,2 $\pm$ 3,5 (54,5)
	Células adherentes a "nylon"	35,6 $\pm$ 2,9 (11,0)
	Tratadas con suero ATR †† + C	42,5 $\pm$ 6,2

\* La RHT se expresa según el porcentaje de incremento de la almohadilla plantar (% IAP).

\*\* Células retiradas 19 semanas después de la infección y transferidas localmente con la dosis inmunizante de antígeno. Todos los animales recibieron  $2 \times 10^7$  células del grupo correspondiente.

† Los números entre paréntesis indican porcentaje de supresión con respecto a la respuesta de los animales que recibieron células totales de animales controles.

†† ATR = suero anti-timocitos de ratón obtenido en conejos.

**Hallazgo de células supresoras en el bazo de los ratones BALB/c inmunizados por vía IV con altas dosis de parásitos muertos.** Varios autores han reseñado la activación de células Ts de la RHT en animales inmunizados con dosis supraóptimas de antígeno (Claman, Miller & Moorhead, 1980; Liew, 1977), fue de nuestro interés averiguar si la inhibición de la RHT observada en los animales inmunizados con altas dosis de parásitos muertos, tenía relación con células Ts. Teniendo

en cuenta la sensibilidad de estas células a la ciclofosfamida (Ci), (Schwartz, Askenase & Gershon, 1980; evaluamos el efecto de la administración IP de Ci, 200 mg/kg peso, 48 h antes de la inmunización IV con  $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  parásitos muertos. En ambos casos, la RHT de los animales pretratados con Ci resultó significativamente aumentada con respecto a los controles sin tratamiento ( $p \leq 0,001$ ) (Fig. 2). Nuevamente recurrimos al ensayo de transferencia local para investigar el posible efecto supresor de las células esplénicas de los animales inmunizados IV con dosis supraóptimas. La Tabla V, muestra la RHT de animales controles y de aquellos que habían recibido la dosis inmunizante de antígeno conjuntamente con células esplénicas de animales inmunizados con alta dosis ( $5 \times 10^8$  parásitos). En este último caso observamos una inhibición notoria ( $p \leq 0,001$ ) de la estimulación de la RHT contra el parásito, comparada con la RHT de los receptores de células normales. El efecto supresor en cuestión, disminuyó significativamente ( $p \leq 0,001$ ) cuando, previamente a la transferencia, las células esplénicas de los animales suprimidos fueron tratadas con suero ATR y C' (Tabla V). Por otra parte, la transferencia local de células esplénicas de animales inmunizados IV con altas dosis de parásitos, no interfirió la estimulación de RHT contra EC, no obstante su capacidad para suprimir la RHT contra antígenos parasitarios (Tabla VI).

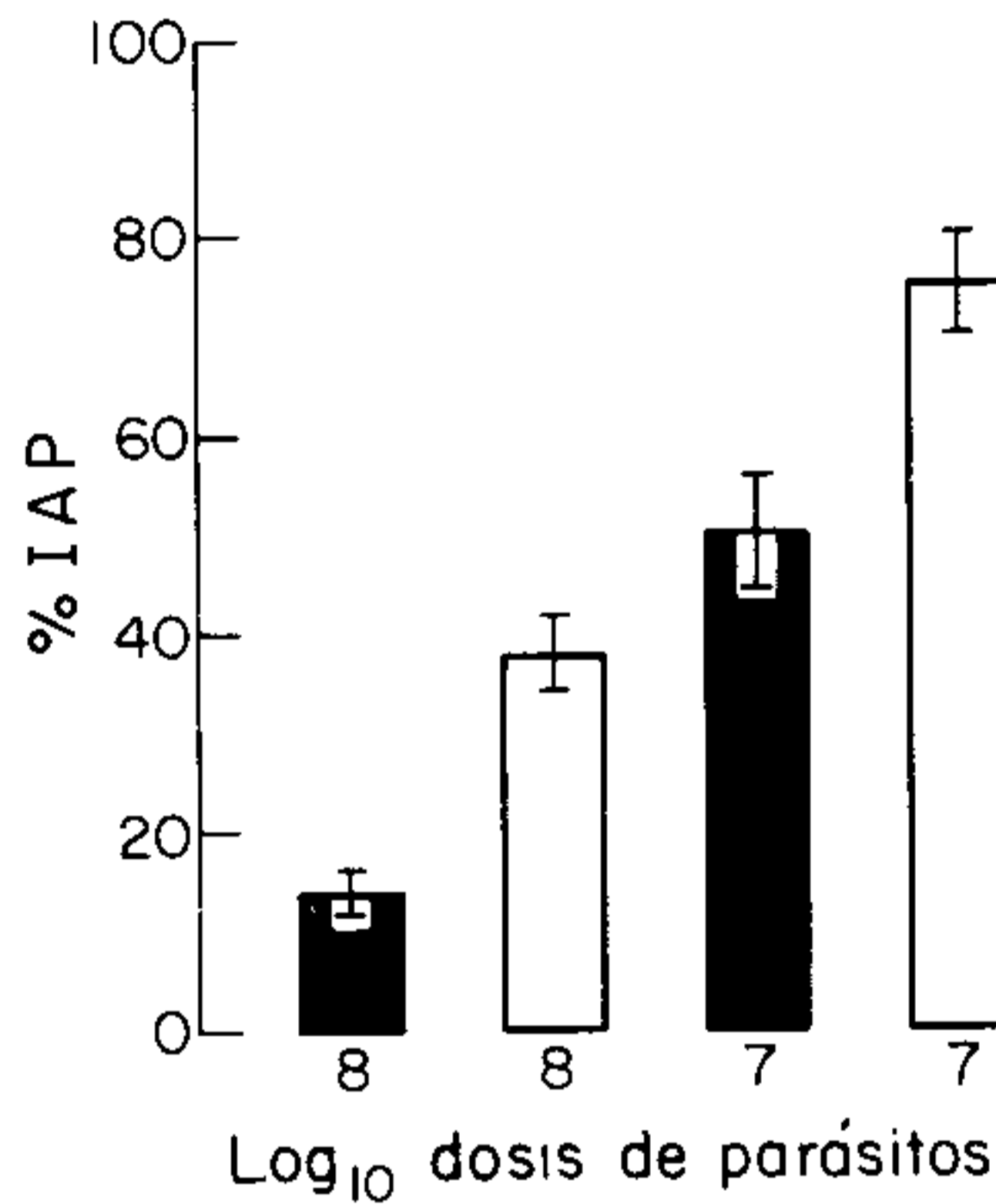


Fig. 2: efecto acrecentante del tratamiento con ciclofosfamida (Ci), sobre la respuesta de hipersensibilidad tardía (RHT) de animales inmunizados IV con dosis supraóptimas de parásitos no viables. La Ci (200 mg/kg de peso) se administró IP, 48 h antes de la inmunización. La RHT se expresa según el % de incremento de la almohadilla plantar (% IAP) luego del reto con  $1 \times 10^7$  promastigotes muertos, practicado a los siete días de inmunización. (□), sin tratamiento; (■) tratados con Ci. (Media  $\pm$  DEM, n = 6).

**Efecto de las células supresoras sobre la expresión de la respuesta de hipersensibilidad tardía contra el parásito.** Las experiencias referidas anteriormente (Tablas V y VI), indicaban que la inmunización IV con altas dosis de parásitos no viables, propiciaba la estimulación de células Ts de la inducción de la RHT contra antígenos leishmánicos. Los siguientes experimentos tuvieron la finalidad de averiguar si esa actividad supresora era extensiva a la expresión de la RHT. Dicha respuesta es transferible a receptores normales, mediante la inyección IV de células esplénicas, retiradas a los siete días de la inmunización SC con parásitos muertos. Como se observa en la Tabla VII, la RHT resultó significativamente diferente ( $p \leq 0,001$ ) entre los animales que recibieron células esplénicas de animales inmunizados SC (Grupo 2) y aquellos receptores de células de animales inmunizados IV con altas dosis de parásitos (Grupo 3), comportándose estos últimos como los controles (Grupo 1), receptores de células esplénicas de animales normales. Sin embargo, la expresión de la RHT observada en el Grupo 2, pudo ser impedida por la transferencia simultánea de células procedentes de donantes suprimidos (Grupo 4) (Tabla VII). Estas células, muy eficientes en suprimir la expresión de la RHT contra antígenos leishmánicos, no suprimieron la RHT transferida por las células esplénicas de donantes inmunizados SC con EC (Tabla VIII).

TABLA V

Efecto de la transferencia local\* de células esplénicas de donantes suprimidos, sobre la inducción de la respuesta de hipersensibilidad tardía (RHT) contra *Leishmania mexicana pifanoi*

Donantes de células	Tratamiento de las células	% IAP (Media ± DEM, n = 6)**	
—	—	100,2 ± 5,0	
Controles	—	98,4 ± 5,0	†
Inmunizados	—	46,5 ± 9,7	(52,7)
	Suero ATR †† más C'	81,8 ± 2,0	(16,0)

\* Células retiradas 7 días después de la inmunización IV con  $5 \times 10^8$  parásitos muertos, todos los animales recibieron  $1,6 \times 10^7$  células.

\*\* La RHT se expresa de acuerdo al porcentaje de incremento de la almohadilla plantar (% IAP), luego del reto con  $1 \times 10^7$  promastigotes muertos.

† Los números entre paréntesis indican el porcentaje de supresión calculado con respecto a la respuesta de los animales receptores de células controles.

†† ATR = suero anti-timocitos de ratón obtenido en conejos.

TABLA VI

Efecto de la transferencia local de células esplénicas de donantes suprimidos\*, sobre la respuesta de hipersensibilidad tardía (RHT) estimulada por la inmunización SC con promastigotes muertos (P) o eritrocitos de carnero (EC)

Donantes	Inmunización SC con:	Reto con:	% IAP (Media ± DEM, n = 6)**
Control	$1 \times 10^7$ P	P	86,0 ± 6,8
Control	$2 \times 10^8$ EC	EC	97,2 ± 11,0
Inmune	$1 \times 10^7$ P	P	39,1 ± 2,0
Inmune	$2 \times 10^8$ EC	EC	86,5 ± 10,0
—	—	P	8,3 ± 6,2
—	—	EC	6,2 ± 1,0

\* Células retiradas 7 días después de la inmunización IV con  $5 \times 10^8$  P.

\*\* La RHT se expresa de acuerdo al porcentaje de incremento de la almohadilla plantar (% IAP) de animales retados con  $1 \times 10^7$  P o  $1 \times 10^8$  EC.

DISCUSION

Aunque anteriormente referimos la ausencia de RHT en ratones BALB/c infectados con el aislado AMP (Pérez, Arredondo & González, 1978), carecíamos de evidencias experimentales que sustentaran una explicación para tal supresión. Los resultados que presentamos en este trabajo, muestran que la inhibición de la RHT observada en los animales infectados crónicamente, responde a un mecanismo supresor activo, transferible por sus células esplénicas y muy eficiente en suprimir la estimulación de RHT contra el parásito. Por cuanto la supresión observada reside en una población celular no adherente a "nylon", sensible al tratamiento con un suero ATR mas C' y con acción específica sobre la RHT contra antígenos leishmánicos, creemos que en los ratones BALB/c crónicamente infectados con *L.m. pifanoi*, ocurre la activación de células Ts de la RHT con especificidad antigénica. Al respecto Howard, Hale & Liew (1981) reportaron, que en el caso de ratones BALB/c crónicamente infectados con *Leishmania tropica*, la supresión de la RHT es mediada por una población de células Ts específicas.

TABLA VII

Efecto supresor de las células esplénicas de donantes suprimidos\* sobre la expresión de la respuesta de hipersensibilidad tardía (RHT) contra *Leishmania mexicana pifanoi*

Grupo	Células transferidas	% IAP (Media $\pm$ DEM, n = 6)**
1	5,0 x 10 <sup>7</sup> CC	27,0 $\pm$ 2,5
2	2,5 x 10 <sup>7</sup> CAICS	79,5 $\pm$ 6,3
3	2,5 x 10 <sup>7</sup> CAIIV	28,9 $\pm$ 6,1
4	2,5 x 10 <sup>7</sup> CAISC más 2,5 x 10 <sup>7</sup> CAIIV	32,7 $\pm$ 4,9 (58,8) †

\* Donantes inmunizados siete días antes con 5x10<sup>8</sup> promastigotes muertos.

\*\* La RHT se expresa de acuerdo al porcentaje de incremento de la almohadilla plantar (% IAP) luego del reto con 1x10<sup>7</sup> promastigotes muertos.

CC = Células de animales controles.

CAISC = Células de animales inmunizados SC con 1x10<sup>7</sup> promastigotes muertos.

CAIIV = Células de animales inmunizados IV con 5x10<sup>8</sup> promastigotes muertos.

Porcentaje de supresión.

TABLA VIII

Inhabilidad de las células supresoras de donantes suprimidos de interferir la expresión de la respuesta de hipersensibilidad tardía (RHT) contra eritrocitos de carnero

Grupo	Células transferidas	% IAP (Media $\pm$ DEM, n = 6)*
1	5,0 x 10 <sup>7</sup> CAC	15,6 $\pm$ 1,4
2	2,5 x 10 <sup>7</sup> CAIEC	48,3 $\pm$ 5,1
3	2,5 x 10 <sup>7</sup> CAIEC más 2,5 x 10 <sup>7</sup> CAIP	41,0 $\pm$ 4,0

\* La RHT se indica según al porcentaje de incremento de la almohadilla plantar (% IAP) de animales retados con 1x10<sup>8</sup> eritrocitos de carnero.

CAC = células de animales no inmunizados

CAIEC = células de animales inmunizados SC con 2x10<sup>8</sup> eritrocitos de carnero y retirados a los 5 días de inmunización.

CAIP = células de animales inmunizados IV con 5x10<sup>8</sup> promastigotes muertos y retiradas a los 7 días de inmunización.

Obviamente, los datos presentados en este trabajo, no permiten profundizar el análisis del mecanismo supresor observado. La RHT es mediada por, al menos, dos subpoblaciones de células T efectoras (Van Loveren & Askenase, 1984; Van Loveren et al., 1984) y la supresión de la RHT descrita para algunos antígenos parece depender de la acción concertada y secuencial de varias subpoblaciones de células Ts: Ts1, Ts2 y Ts3, cada una de ellas productora de mediadores solubles con diferencias en su especificidad, cinética y mecanismo de acción (Sunday, Benacerraf & Dorf, 1981; Okuda et al., 1984; Usui et al., 1984).

Una comparación entre el curso de las lesiones y aquél de la RHT, pone de manifiesto que la inhibición de la RHT en los animales infectados es siguiente a un estado transitorio de inmunidad celular. Este último, propio de la fase inicial de la infección a tiempo que las lesiones son aún pequeñas, mientras que la inhibición de la RHT coincide con la fase de desarrollo acelerado de las lesiones, cuando presumimos un aumento considerable de la carga antigénica. Es posible que el incremento de los antígenos parasitarios, siguiente a la multiplicación incontrolada de los parásitos, semeje la condición de exceso de carga antigénica que conduce a la inducción de células Ts de la RHT (Claman et al., 1980). Este argumento recibe mayor apoyo si consideramos que la inmuniza-



ción IV con un número elevado de parásitos muertos, también provocó la activación de células Ts similares, en su efecto, a las encontradas en los animales infectados crónicamente. Cabe recordar además que en hospedadores relativamente resistentes a *L. tropica* (Preston, Behbehani & Dumonde, 1978) o *L. mexicana* (Pérez, 1980), la inoculación con un número elevado de parásitos, produjo lesiones de desarrollo acelerado con tendencia a la cronicidad y supresión de la respuesta celular contra el parásito.

La RHT observada en los ratones BALB/c infectados (fase temprana) y en los inmunizados con parásitos muertos, también amerita nuestra consideración por su significado en la relación parásito-hospedador. En primer lugar, corroboramos que la acentuada susceptibilidad genética de los ratones BALB/c a la inoculación con parásitos del complejo *L. mexicana*, no depende de una incapacidad de estos animales para responder inmunológicamente a los antígenos parasitarios (Arredondo & Pérez, 1979). En segundo lugar, confirmamos que parásitos eventualmente asociados a la LCD, poseen el potencial antigénico para estimular una respuesta inmune del tipo hipersensibilidad tardía (Pérez, Arredondo & González, 1978).

De mayor trascendencia es establecer la función de la RHT en la inmunidad protectora contra el parásito y en la patogenia de la enfermedad. En nuestros animales infectados observamos que aunque la RHT estaba presente, no fue suficiente para detener la multiplicación de los parásitos, siendo evidente además que en ausencia de infección el exceso de carga antigénica fue causal de activación de células Ts con especificidad similar a las halladas en los animales infectados. Luego, en estos últimos la supresión de la RHT podría ser un evento secundario a una falla primaria en el mecanismo inmune que controla la población parasitaria.

Se ha hecho casi un dogma el relacionar la RHT y la curación de las lesiones causadas por los parásitos *Leishmania*, quizá porque muchos estudios concuerdan la RHT con la remisión de las lesiones y no son escasos los que señalan correspondencia entre lesiones persistentes y RHT negativas o débiles, revisado por Pérez, 1982. Sin embargo, ningún trabajo ha podido demostrar la verdadera relación que existe entre ambos fenómenos. Recientemente, Liew, Howard & Hale (1984), refieren una disociación entre la RHT y la inmunidad protectora conferida por la inmunización con promastigotes irradiados de *L. tropica*. Otros autores (Titus et al., 1984), comunicaron que una población de células T con especificidad antigénica para *L. tropica*, careció de efecto protector contra la infección, no obstante su capacidad para transferir RHT contra el parásito. Es difícil, pues, precisar la función de la RHT en la inmunidad anti-*Leishmania*, problema prioritario para esclarecer en investigaciones futuras.

La información que presentamos aquí, conjuntamente con trabajos anteriores (Arredondo & Pérez, 1979; Bolívar, 1982; Pérez & Bolívar, 1985a, b), nos llevan a concluir que en los ratones BALB/c, la infección con parásitos del complejo *L. mexicana* conduce a un estado de supresión inmunológica, que cuenta con la participación de al menos dos poblaciones de células supresoras: células Ts con especificidad antigénica y macrófagos supresores de acción inespecífica. La contribución de estas células a la patogenia de la enfermedad es por ahora un enigma.

## SUMMARY

A T suppressor cell population that specifically shut down delayed hypersensitivity responses (DHR) to the parasite was found in both BALB/c mice chronically infected with *Leishmania mexicana pifanoi* and in naive mice which had received a single IV supraoptimal dose of killed parasites.

At the early phase of infection mice exhibited a transitory state of cell-mediated immunity against the parasite that was abrogated when lesions reached their accelerated phase of growth. Results suggest that in both infected and high-dose immunized mice, the activation of T suppressor cells of DHR is related to antigen overload.

## REFERENCIAS

- ARREDONDO, B. & PÉREZ, H., 1979. Alterations of the immune response associated to chronic experimental leishmaniasis. *Infect. Immun.*, 25 :16-22.
- BOLIVAR, J., 1982. Alteraciones de la respuesta inmunológica en la leishmaniasis crónica experimental. Tesis de grado Lic. Biol., Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
- CASTELLANI, O.; RIBEIRO, L.V. & FERNANDES, J.F., 1967. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Protozool.*, 14 :447-451.
- CLAMAN, H.N.; MILLER, S.; SY, M.S. & MOORHEAD, J.W., 1980. Suppressive mechanisms involving sensitization and tolerance in contact allergy. *Immunological Rev.*, 50 :105-132.

- CROWLE, A.J., 1959. Delayed hypersensitivity in several strains of mice studied with six different tests. *J. Allergy*, *30* :452-459.
- CROWLE, A.J., 1975. Delayed hypersensitivity in the mouse. *Avanc. Immunol.*, *20* :197-264.
- DEANE, M.; CHAVES, J.; TORREALBA, J.W. & TORREALBA, J.F., 1966. Aislamiento de leishmanias de la médula ósea y de la sangre de una paciente con leishmaniasis tegumentaria difusa. *Gac. Med. Car.*, *74* :367-371.
- HOWARD, J.G.; HALE, C. & LIEW, F.Y., 1980. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. III. Nature and significance of suppression of cell-mediated immunity in mice highly susceptible to *Leishmania tropica*. *J. Experimental. Med.*, *152* :594-607.
- JAMES, K.; PULLAR, D.M.; JAMES, V.S.; WOOD, A.; EPPS, H.B.G. & RAHR, L., 1970. The development and distribution of anti-lymphocytic and other antibodies in horses immunized with human lymphoid antigens. *Transplantation*, *10* :208-226.
- JOOSTE, S.V.; LANCE, E.M.; LEVEY, R.H.; MEDAWAR, P.B.; RUSZKIEWICZ, M.; SHARMAN, R. & TAUB, R.N., 1968. Notes on the preparation and assay of anti-lymphocytic serum for use in mouse. *Immunology*, *15* :697-705.
- JULIUS, M.H.; SIMPSON, E. & HERZENBERG, L.A., 1973. A rapid method for the isolation of thymus derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, *3* :645-649.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J., 1973. Leishmanias and leishmaniasis of the New World, with particular reference to Brazil. *Bull. WHO.*, *7* :1-9.
- LIEW, F.Y., 1977. Regulation of delayed-type hypersensitivity. I. T suppressor cells for delayed hypersensitivity to sheep erythrocytes in mice. *Eur. J. Immunol.*, *7* :714-718.
- LIEW, J.; HOWARD, J.G. & HALE, C., 1984. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. III. Protection against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes involves Lyt 1 + 2-T cells that do not mediate cutaneous DTH. *J. Immunol.*, *132* :456-461.
- MEDINA, R. & ROMERO, J., 1962. *Leishmania pifanoi* n.sp. El agente causal de la leishmaniasis difusa. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasit. Med.*, *4* :349-353.
- OKUDA, K.; MINAMI, M.; FURUSAWA, S. & DORF, M., 1981. Analysis of T cell hybridomas. II. Comparisons among three distinct types of monoclonal suppressor factors. *J. Exp. Med.*, *154* :1838-1851.
- PÉREZ, H., 1980. La infección experimental del ratón con *Leishmania mexicana*: Efecto del número de parásitos inoculados sobre el curso de la infección. *Acta. Cient. Venez.*, *31* :174-179.
- PÉREZ, H., 1982. Inmunología de la leishmaniasis cutánea experimental. *Adel. Microbiol. Enf. Infec.*, *1* :104-130.
- PÉREZ, H.; ARREDONDO, B. & GONZÁLEZ, M., 1978. Comparative study of American cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous in two strains of inbred mice. *Infect. Immun.*, *22* :301-307.
- PÉREZ, H. & BOLIVAR, J., 1985a. Lymph node cell responsiveness in BALB/c mice infected with *Leishmania mexicana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, *80* (2) :135-140.
- PÉREZ, H. & BOLIVAR, J., 1985b. Depressed mixed lymphocyte responses in chronic experimental cutaneous leishmaniasis. *Acta. Cient. Venez.*, *36* :243-246.
- PÉREZ, H.; BOLIVAR, J. & SAN BLAS, G., 1984. The immunomodulatory effect of yeast glucan on delayed hypersensitivity. *J. Immunopharmacology*, *6* :301-325.
- PÉREZ, H. & DE LA ROSA, M., 1985. Respuestas de hipersensibilidad tardía en ratones inmunizados con promastigotes no viables de *Leishmania mexicana*. *Rev. Lat. Am. Microbiol.*, *27* :en prensa.
- PÉREZ, H.; LABRADOR, F. & TORREALBA, J.W., 1979. Variations in the response of five strains of mice to *Leishmania mexicana*. *Internat. J. Parasitol.*, *9* :27-32.
- PRESTON, P.M.; BEHBEHANI, K. & DUMONDE, D.C., 1978. Experimental cutaneous leishmaniasis. VI. Anergy and allergy in the cellular immune response during non-healing infection in different strains of mice. *J. Clin. Lab. Immunol.*, *1* :207-219.
- PETRALANDA, I.; ARANGO, M.; LUGO, E. & YARZABAL, L., 1980. Estudios inmunoquímicos de Leishmanias Americanas. *Inmunol. Clin.*, *3* :7-26.
- SCHWARTZ, A.; ASKENASE, P.W. & GERSHON, R.K., 1978. Regulation of delayed-type-hypersensitivity reactions by cyclophosphamide-sensitive T cells. *J. Immunol.*, *121* :1573-1577.
- SUNDAY, M.E.; BENACERRAF, B. & DORF, M.E., 1981. Hapten specific T cell responses to 4-hydroxy-3-nitrophenyl-acetyl, VIII. Suppressor cell pathway in cutaneous sensitivity. *J. Exp. Med.*, *153* :811-822.
- TITUS, R.G.; LIMA, G.C.; ENGERS, H.D. & LOUIS, A.J., 1984. Exacerbation of murine cutaneous leishmaniasis by adoptive transfer of parasite-specific helper T cell population capable of mediating *Leishmania major*-specific delayed type hypersensitivity. *J. Immunol.*, *33* :1594-1600.
- TRIZIO, D. & CUDKOWICZ, G., 1974. Separation of T and B lymphocytes by nylon wool columns: evaluation of efficacy by function assays in vivo. *J. Immunol.*, *113* :1093-1097.
- USUI, M.; AOKI, I.; SUNSHINE, G.H. & DORF, M., 1984. Requirements for suppressor T cell activation. *J. Immunol.*, *133* :1137-1141.
- VAN LOVEREN, H.S. & ASKENASE, P.W., 1984. Delayed type hypersensitivity is mediated by a sequence of two different T cell activities. *J. Immunol.*, *133* :2397-2401.
- VAN LOVEREN, H.S.; KATO, K.; MEADE, R.; GREEN, D.; HOROWITZ, M.; PTAK, W. & ASKENASE, P., 1984. Characterization of two different Ly - 1<sup>+</sup>. T cell populations that mediate delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.*, *133* :2402-2410.