

11261

ley
6

"INMUNOLOGÍA DE LA HISTOPLASMOSIS: CAMBIOS INMUNOLÓGICOS Y SU RELACIÓN CON LOS MECANISMOS QUE INFLUYEN EN LA SUSCEPTIBILIDAD DEL HUÉSPED A LA INFECCIÓN CON *Histoplasma capsulatum*".

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

QUE PRESENTA:

MARIA DEL ROCIO REYES MONTES

FALLA DE ORIGEN

México, D.F.

1983.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.	1
INTRODUCCION.	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	9
OBJETIVO PRINCIPAL.	9
HIPOTESIS.	9
MATERIAL Y METODOS.	10
MICROORGANISMOS.	10
MEDIOS DE CULTIVO.	10
ANIMALES.	10
ANTIGENOS PARA PRUEBAS INMUNES.	11
DETERMINACIONES QUIMICAS.	11
OBTENCION DEL INOCULO DEL HONGO.	11
DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL 50 (DL50).	13
DETERMINACION DEL PORCIENTO DE LINFOCITOS.	13
PRUEBAS CELULARES.	14
CINETICA DE IRRADIACION EN RATONES BALB/c DE DIFERENTES EDADES.	15
EFICIENCIA DE TRANSFERENCIA DE CELULAS EN ANIMALES IRRADIADOS:	15
CINETICA DE DOSIS DE CELULAS Y TIEMPO DE TRANSFERENCIA.	
CINETICA DE INFECCION POST-TRANSFERENCIA DE CELULAS.	16
CAMBIOS EN LA RESISTENCIA A LA INFECCION HISTOPLASMOSEA CON LA TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CELULAS.	17
RESULTADOS.	20
DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL 50 (DL50).	20
DETERMINACION DEL PORCIENTO DE LINFOCITOS.	21
INTRADERMORREACCION.	21
DETERMINACION DEL PORCIENTO DE CELULAS VIVAS DE EXUDADO PERITONEAL.	22
CINETICA DE IRRADIACION.	23

<i>EFICIENCIA DE TRANSFERENCIA DE CÉLULAS EN ANIMALES IRRA- DIADOS. CINÉTICA DE DOSIS DE CÉLULAS Y TIEMPO DE TRANSFEREN- CIA.</i>	24
<i>CINÉTICA DE INFECCIÓN POST-TRANSFERENCIA DE CÉLULAS.</i>	24
<i>CAMBIOS EN LA RESISTENCIA A LA INFECCIÓN HISTOPLASMOSICA - CON LA TRANSFERENCIA ADAPTIVA DE CÉLULAS.</i>	25
DISCUSION.	29
SUMMARY.	36
BIBLIOGRAFIA.	37
INDICE DE FIGURAS.	42
INDICE DE TABLAS	44

RESUMEN

Se ha observado que individuos normales expuestos al hongo *Histoplasma capsulatum*, bajo idénticas condiciones tienen diferentes cursos clínicos en la enfermedad. Es posible que factores como edad y sexo entre otros actúen sobre la resistencia del individuo a la infección. Trabajando con 2 cepas distintas de *Histoplasma capsulatum* observamos que los ratones singénicos BALB/c de 4½ meses presentaron una marcada resistencia a la infección (DL₅₀ mayor y un alto porcentaje de supervivida) en comparación con los ratones de 1 mes y 1 año. En todos los casos, las hembras fueron más resistentes. Además, el estudio de la infección subletal en ratones hembras de diferentes edades (1 mes, 4½ meses y 1 año) nos permitió discriminar algunos parámetros inmunológicos en la infección histoplasmática en un período de 15, 30 y 45 días post-infección. Se detectó ausencia de linfocitosis, alteraciones en el porcentaje de supervivida en los macrófagos peritoneales y una mayor respuesta de hipersensibilidad en los ratones de 1 mes y 1 año, sugiriendo el posible papel de la respuesta inmune (hiperactivación) en el curso crítico de esta infección en estos dos grupos de edades. Estos resultados contrastan notoriamente con los ratones hembras adultos (4½ meses) quienes resuelven favorablemente la infección.

De todos los grupos de edad y sexo estudiados, los ratones machos muy jóvenes presentan un curso más drástico a la infección, que sugiere una predisposición mayor (posible estado supresivo previo a la infección).

La transferencia adoptiva de células de bazo de ratones machos donadores de 1 mes a ratones machos receptores de 4½ meses (con o sin irradiación), alteró la resistencia a la infección de los ratones receptores. Aparentemente el estado supresivo transferido por las células de bazo de ratones machos de 1 mes se debe a poblaciones de células adherentes y radio-resistentes presentes en el bazo de estos animales.

INTRODUCCION

La histoplasmosis es una micosis intracelular que afecta el sistema no mononuclear fagocítico. El agente causal de esta enfermedad, *Histoplasma capsulatum*, es un hongo dimórfico y su fase saprobita se desarrolla en el suelo. A temperatura ambiente y en medios de cultivo ordinario crece en forma micelial, produciendo gran cantidad de esporas que al ser inhaladas por el hombre o animales, los infectan, aunque también se ha reportado que se adquiere la enfermedad por vía digestiva y cutánea. La fase levaduriforme del hongo se observa en cultivos enriquecidos mantenidos a 37°C y en tejidos del huésped, llenando con frecuencia el citoplasma de células mononucleares y ocasionalmente de los polimerfonucleares (1). La enfermedad según González Ochoa (2) puede presentar tres fases: la fase primaria-asintomática que puede ser leve, moderada o grave; la residual de la fase primaria y la reinfección endógena que con frecuencia es fatal. Su distribución es cosmopolita aunque las ubicaciones más importantes están en el centro de Estados Unidos y en Centro y Sudamérica (1, 3, 4). Según estudios recientes las áreas endémicas más importantes en México son: el estado de Querétaro, Hidalgo, Guerrero y con focos menores en Chiapas, Yucatán y Puebla (5).

Dentro de las infecciones producidas por hongos, la histoplasmosis constituye uno de los más interesantes modelos para el estudio de la respuesta inmune celular, así como de los diferentes mecanismos involucrados en la expresión adecuada de esta respuesta inmune. La inducción de una respuesta inmune celular por parte del huésped frente al hongo parásito está mediada por la participación de diferentes subpoblaciones de linfocitos T. Esta respuesta está formada por una serie de eventos biológicos estimulados por los mediadores de la respuesta celular, las linfocinas, que tienen acción preferencial sobre los macrófagos. Sin embargo, la respuesta celular como elemento de defensa, no es un fenómeno aislado, sino más bien se encuentra relacionada con las demás funciones y componentes de la respuesta inmune, células T citotóxicas, T supresoras, T cooperadoras, células B, etc.; por lo que su efectividad depende de la óptima interacción de estos -

componentes.

La presencia del agente causal de esta enfermedad, el hongo *H. capsulatum* en un huésped susceptible, induce con frecuencia lesiones - granulomatosas en las que la reacción tisular, con la participación de la - respuesta inmune, se manifiesta en toda su plenitud (6).

Normalmente la infección cursa en una forma benigna lo que indica que el huésped es capaz de resolver la infección y eliminar el hongo en un modo eficiente (1, 2).

Por otro lado, sin contemplar los casos definidos de inmunodeficiencia o inmunosupresión clínicamente establecida o artificialmente producida en el huésped, en muchos de los casos de resolución desfavorable de la enfermedad histoplasmósica, quizá los eventos que ocurran en el huésped estén muy relacionados con estados supresivos "ocasionales y/o naturales", especialmente en aquellos individuos que cursan con la infección violenta y no se les han detectado fallas en su sistema inmunario ni han estado bajo ningún tipo de terapia inmunosupresora. Además, es un hecho que la infección histoplasmósica, se encuentre asociada con estados de supresión "natural" - inducida por el hongo en el huésped (7). La existencia de un estado supresivo, producto de la infección histoplasmósica fue demostrado por los estudios realizados por Artz y Bullock (7, 8) utilizando el modelo murino; - ellos observaron una correlación entre la fase aguda de la infección histoplasmósica y la existencia de una marcada supresión de la inmunidad celular, de la actividad citotóxica de células de bezo así como de la respuesta primaria de anticuerpos. Esta supresión se detectó no solo con antígenos del hongo, sino también con eritrocitos de borrego, lo que indica su aparente - inespecificidad. Por otro lado, este estado supresivo se observó únicamente en los animales que fueron inoculados con hongo vivo. Estos resultados nos inducen a aceptar la existencia de una supresión promovida por el - hongo; además, se ha detectado estados supresivos *in vivo* en otros modelos infecciosos similares como lepra y tuberculosis (9, 10).

Sin negar la existencia de una supresión debida al proceso infeccioso,

el hecho de que el hongo encuentre un huésped susceptible en condiciones aparentemente normales, sugiere que factores como altas dosis infectantes, virulencia de la cepa o estados supresivos ocasionales del huésped podrían estar relacionados con la facilitación de la infección misma. La observación de que la susceptibilidad a la infección en algunos individuos se encuentra aumentada sin que éstos muestren ninguna supresión ya sea inducida o debida a inmunodeficiencia, sugiere la existencia de un estado supresivo quizá circunstancial, previo a la infección misma. Observaciones de tipo clínico -- muestran que grupos de individuos normales expuestos al hongo bajo idénticas condiciones, desarrollaron diferentes cursos clínicos de histoplasmosis, sin considerar la dosis y la virulencia de la cepa (11). Naturalmente, -- aquí habría que considerar factores genéticos, nutricionales, estados de -- stress, hormonales, relacionados con sexo o edad, todos, actuando de uno u -- otro modo en la expresión de la susceptibilidad de cada individuo. Uno de -- los factores que afectan de algún modo la respuesta inmune del individuo es sin lugar a dudas los cambios debidos a la edad que han sido observados a -- lo largo del desarrollo de cada individuo y en particular ha sido estudiado en algunas especies animales. Se sabe, por ejemplo, que la respuesta humo -- ral en ratones disminuye en intensidad conforme avanza la edad y en esta -- disminución parece ser fundamentalmente debida a alteraciones en -- células T cooperadoras y en las células B, además de que también se ha detecta -- do un aumento en la actividad supresora (12-15).

Por otro lado también se ha reportado en ratones viejos modificaciones en la inmunidad mediada por células como por ejemplo, una baja respuesta a fi -- tohemaglutinina, un abatimiento de la resistencia a tumores, un decaimiento de la actividad citotóxica, así como de la actividad de mezcla de linfocitos (16, 17). Estos hechos sugieren para algunos investigadores que el aba -- timiento de la inmunidad mediada por células con la edad del animal, es pro -- bablemente resultado de una disminución en la funcionalidad o también en la capacidad proliferativa de células T (16, 17).

Olsson y Claësson mostraron que el porcentaje de células T presentes -- en bazo de ratones de la cepa C3H varía según la edad, disminuye en un 90%

en ratones recién nacidos (6 semanas de edad) y en un 13% en ratones de un año. Estos hallazgos sugieren que este decremento en el número absoluto de células T funcionales puede contribuir a una disminución de la inmunidad mediada por células (18).

Hákinodan y Seque han demostrado la existencia de células T supresoras en bazo de ratones viejos, las cuales afectan la respuesta inmune humoral - de ratones jóvenes cuando se mezclan ambas células de bazo (19, 20). Por otro lado otros autores han encontrado que los bazos de ratones recién nacidos de 6 a 7 días de edad contienen en forma natural células supresoras, -- las cuales poseen la capacidad de inhibir la expresión de alérgicidad en los mismos bazos de los recién nacidos, así como también, de la respuesta - inmune T dependiente y T independiente de las células de bazo de ratones -- adultos (21). El estado de no respuesta de bazos de recién nacidos no es debido a la falta de células T funcionales o de macrófagos, esto se demostró perfectamente cuando fueron eliminadas las células supresoras de una población de células de bazo de los ratones recién nacidos. Como consecuencia de esta eliminación, las células T resultantes, desarrollaron una fuerte alérgicidad. Parece ser que la actividad supresora en los bazos de - estos ratones recién nacidos no es afectada por células dependientes de timo, ya que en ratones nu/nu esta población está presente (21).

Sin embargo, existe un gran número de información acumulada que apoyan que el mecanismo supresor en bazo de ratones neonatos es producido por células dependientes de timo (22-25).

Aunque hay evidencias que la proporción de células linfoides en algunas cepas de ratones, varían con la edad (16, 17), esta observación no ha sido generalizada para todas las especies de animales. Sin embargo, es posible extrapolar estos hechos a los cambios generados en la susceptibilidad del hombre según las modificaciones presentes en las diferentes etapas del desarrollo del individuo.

Con respecto al sexo y su relación con procesos infecciosos, la información científica está más relacionada a la facilitación del crecimiento -- del parásito por posibles efectos hormonales y pocos datos existen, respec-

to a cambios en la respuesta inmune. El sexo femenino en comparación con el sexo masculino ha mostrado una superioridad en cuanto a la formación de anticuerpos en la inmunización a varios antígenos, además de una capacidad aumentada de rechazo a los aloinjertos de piel así como de la respuesta a tumores. Esas diferencias pueden estar bajo control genético, pero las hormonas sexuales pueden tener también un efecto directo (25, 27).

Con relación al efecto del sexo en la defensa de procesos parasitarios, Kittas y Henry demostraron una mayor resistencia a la infección toxoplásmica en ratones gonadectomizados que en ratones normales de ambos sexos -- (28). La administración del hexoestrol indujo casi completa atrofia tímica y parcial involución en el tejido linfoide. Ratones infectados con *Toxoplasma gondii* y tratados posteriormente a la infección con hexoestrol mostraron un aumento en la mortalidad, probablemente como resultado de una depresión en la inmunidad mediada por células causada por el hexoestrol -- (28).

Se ha reportado que los andrógenos son inhibidores de la respuesta inmune humoral, en contraste, los estrógenos aumentan la fagocitosis y la actividad de linfocitos B. Por otro lado, los estrógenos pueden tener un efecto supresivo sobre la inmunidad mediada por células, más marcado en el sexo femenino, especialmente en menores de 12 años (29, 30).

Respecto a la relación sexo y enfermedades por hongos se ha visto principalmente que la frecuencia de infecciones por hongos está aumentada por ejemplo con el sexo, edad y raza. El estudio de la incidencia de *Cryptococcus* sp. en niños de raza caucásica y raza negroide, antes y después de la pubertad, demostró mayor frecuencia de levaduras en los caucásicos que en los negroides, así como en niños mayores o sexualmente maduros -- (31).

En la infección experimental por *Cryptococcus neoformans* en ratones -- hembras y machos adultos Swiss-Webster, se observó que la media de supervivida en días (MSD), varió en los dos sexos. Los ratones hembras tuvieron una MSD más larga que los ratones machos, lo que sugiere una mayor resistencia de las hembras a la infección experimental con *Cryptococcus* (32).

También se ha observado en hongos la existencia de una estimulación de hormonas sexuales humanas, como el 17 β -estradiol, la progesterona y la testosterona en el crecimiento de *Coccidioides immitis*. Posiblemente estas hormonas ayudan a aumentar la predisposición a la enfermedad, así como a la diseminación de la coccidioidomicosis (33). En mujeres embarazadas la diseminación del hongo es especialmente notable, además las mujeres que no presentan ese estado son menos susceptibles que los hombres a la diseminación extrapulmonar de esta infección (33).

En la histoplasmosis experimental, Basler y Schefer (34) han observado desde algunos años que ratonas hembras de la cepa Swiss (blanca) desarrollan mayor resistencia a la infección y que la edad del animal era un factor de cambio en la susceptibilidad al desafío con el hongo. Sin embargo, hay que señalar que estos hechos no son generalizados ya que se han detectado comportamientos diferentes en otras cepas de animales (35-37).

Los factores que modifican y desde luego influyen en la expresión de la defensa del individuo, tiene múltiples interrelaciones y causalidades. Es posible pensar que estos factores pudieran alterar la resistencia a la infección, a través de una vía común que conduciría a una probable baja en la defensa del individuo. Una de las maneras de causar este cambio en la resistencia sería mediante la alteración del equilibrio propio del sistema inmune a través de sus mecanismos de regulación, promoviendo de este modo, lo que podría coincidir con la infección, de ahí que, estos sujetos presentarían mayor susceptibilidad a infectarse y un curso más crítico de la enfermedad.

Por lo expuesto, las variaciones en la población linfocítica en los animales es un hecho bien conocido dentro de la inmunología (16-25). Se han detectado cambios en algunas características de la población linfocítica de diferentes animales, incluyendo al hombre, las que reflejan diferencias de sexo, edad, estímulo hormonal y que pudieran estar actuando indirectamente en la defensa. Por lo tanto, es de esperar que la población linfocítica en cuanto a número y tipos de células, sufre modificaciones inducidas por distintos me-

canismos de regulación interna a lo largo de la vida del animal, pudiendo ser que estos cambios condicionen posibles variaciones en la susceptibilidad y resistencia del animal a infecciones.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de la multicausalidad de las variaciones en la resistencia, es posible que en la respuesta inmune se trabaje en unos cuantos eventos, de tal modo que el efecto de diferentes parámetros como edad, desnutrición, stress pudieran converger a nivel de respuesta inmune en una acción similar. En la imposibilidad de trabajar con todos estos factores a la vez, escogimos dos de ellos representados por la edad y sexo, tratando de establecer la relación de estos factores con un modelo infeccioso (infección histoplasmósica).

OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo fundamental de este estudio se encuentra traducido en las tres etapas de desarrollo que se ha planteado para enfocar el problema:

1.- Identificar la variación en la susceptibilidad y el desarrollo de la resistencia en tres diferentes edades del animal frente a la infección por *Histoplasma* a través de la obtención de la ML_{50} del hongo para cada grupo de edad y sexo del animal (Fig. 1).

2.- Determinar si las variaciones, dependientes de la edad y sexo del animal, interfieren, bajo la influencia de la infección histoplasmósica, en la respuesta de defensa celular, en el número de linfocitos y en la actividad de macrófagos (Fig. 2).

3.- Demostrar que las células de animales en edades extremas, por ejemplo de 1 mes de edad, tienen la capacidad de modificar la defensa de un animal adulto resistente a la infección histoplasmósica (Fig. 3).

HIPOTESIS

Factores como sexo y edad promueven cambios circunstanciales en el huésped que modifica momentáneamente su susceptibilidad a la infección histoplasmósica.

MATERIAL Y METODO

MICROORGANISMOS.

Se trabajó con las cepas de *Histoplasma capsulatum* Nº 5026, 5037, y la cepa denominada "León Pérez", procedentes del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISLET) México y obtenidos por cortesía del Dr. Oscar Velasco Castrejón. Los hongos fueron aislados de casos humanos y conservados en el laboratorio por cultivos periódicos. La cepa denominada "León Pérez" presenta la característica de estar catalogada como una cepa muy virulenta y fué aislada de un caso humano de histoplasmosis aguda fulminante.

MEDIOS DE CULTIVO.

1.- Mycobiologic agar (Difco) para conservación del hongo. 2.- Medio sintético para obtener inóculos uniformes del hongo en fase levaduriforme - (33). 3.- BIB (agar infusión cerebro corazón) (Difco) suplementado con 1% de glucosa y 0.1% de L-cisteína hidrociorado (Merck) para la conservación de la fase levaduriforme de *Histoplasma* - (35). 4.- RPMI-1640 (Gibco) en amortiguador HEPES (N-2-Hydroxietil piperazina-N, N'-ácido Etano sulfónico) suplementado con piruvato (Gibco), 100 U de penicilina/ml, 100 µm de estreptomocina/ml y suero fetal de ternera al 10% (Difco). Solución de - - - Turck; solución de azul de metileno 0.3 ml y ácido acético al 3%. SBS (solución balanceada de sales)= Solución I: Dextrosa- 10 g; Fosfato de potasio monobásico anhidro- 0.66 g; Fosfato de sodio dibásico anhidro- 0.925 g; rojo de fenol al 0.5% en agua destilada- 2 ml. Aforar con agua destilada a 1000 ml. Solución II: Cloruro de calcio anhidro- 1.4 g; Cloruro de potasio- 4.0 g; Cloruro de sodio- 80 g; Cloruro de magnesio anhidro- 1.04 g; Sulfato de magnesio 7 H₂O- 2.0 g. Aforar con agua destilada a 1000 ml. Mezcla - - (SBS): 100 ml Solución I + 100 ml Solución II + agua destilada c.b.p. 1000 ml.

ANIMALES.

Durante el transcurso de esta investigación solo se utilizó la cepa -- singénica de ratones BALB/c. Se trabajó con animales de ambos sexos mante-

nidos por cruzamiento cerrado bajo control estricto de singenicidad y alimentados con purina (Purins de México, S.A. de C.V.) y agua a 100°C. La singenicidad de los animales fué comprobada por trasplantes de piel y cultivos mixtos de linfocitos (39).

Se trabajó con animales de diferentes grupos de edades, 1 mes (jóvenes), 4 y medio meses (adultos) y 12 meses (viejos).

ANTICUEROS PARA HISTOPLASMA INMUNEL.

Histoplasmina.- Fué obtenida por cultivo de la fase micelial del hongo *Histoplasma capsulatum* en medio de Smith con asparagina (40). Después de seis meses de incubación a temperatura ambiente, la fase líquida del medio se separó del micelio del hongo a través de filtraciones sucesivas hasta llegar a la esterilización. La primera etapa de separación del micelio se hizo con papel filtro Whatman N° 3, continuando con filtros Millipore de 1.2 μ m, 0.8 μ m hasta 0.22 μ m. Todo el manejo del hongo hasta la obtención del filtrado fué realizado bajo estricto control de esterilidad y en condiciones adecuadas para evitar una infección accidental del manipulador. De esta forma se obtuvo el filtrado estéril, libre de esporas del hongo, denominado histoplasmina cruda. Después de concentrar por evaporación se dializó la histoplasmina contra agua o contra soluciones amortiguadoras, dependiendo de la prueba en que fué utilizada. Se esterilizó y se distribuyó en alícuotas almacenando en congelación, previo los análisis químicos pertinentes.

DETERMINACIONES QUÍMICAS.

La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry (41) y micro-Kjeldahl (42) y la de carbohidratos por los métodos de antrona (43) y fenol sulfúrico (44).

OBTENCIÓN DEL INOCULO DEL HONGO.

I. Conversión a la fase levaduriforme.- La conversión de la fase micelial a fase levaduriforme del hongo se llevó a cabo por cultivos semana-

les del hongo en medio BHI agar (infusión cerebro corazón) adicionado de 1% de glucosa y 0.1% de L-cisteína hidrocloreata y subsecuente incubación a 37°C, hasta obtener la fase levaduriforme en desarrollo del hongo. Una vez obtenida esta fase, el hongo fue cosechado y disgregado en forma estéril en un mortero para obtener la masa celular. Después de este procedimiento se sembró en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio sintético (25). Posteriormente los matraces se incubaron en baño María con agitación a 150 rpm durante 48 horas a 37°C, a fin de individualizar mejor las levaduras. Al cabo de ese tiempo, el cultivo se cosechó y se lavó dos veces con solución salina estéril al 0.65 (85) en frío.

11. Estandarización de las cepas de *Candida guilliermondii* por el método de turbidimetría.— Al paquete celular de cada cepa obtenido del medio sintético se adicionaron 10 ml de solución salina y a partir de esta mezcla se hicieron ocho diluciones al doble. Cada dilución se cuantificó por turbidimetría en un fotocalorímetro Klett-Sumerson utilizando un filtro de 400 a 450 mμ, a la vez que se cuantificó por conteo directo en un hematocitómetro. Finalmente las diluciones fueron sembradas en medio de BHI para determinar la cuenta viable. Se graficó el número de células de cada dilución - cuantificada en el hematocitómetro contra el porcentaje de transparencia de esas mismas diluciones, obteniendo una curva estándar para cada cepa del hongo (Fig. 4).

La cuenta de las células en el hematocitómetro se llevó a cabo en la región W, de modo idéntico a la cuenta de células blancas. Las células fueron teñidas con azul de algodón y los agregados de 5 células se tomaron arbitrariamente como una sola célula (45).

$$\begin{array}{l}
 \text{número de células} \\
 \text{en } 0.4 \text{ mm}^3 \\
 \text{(secciones 4 W)} \\
 \times \\
 \text{factores de} \\
 \text{corrección} \\
 = \\
 \text{número de} \\
 \text{células en} \\
 \text{1 mm}^3 \\
 \\
 \text{volumen del factor} \\
 \text{de corrección} \\
 = \\
 \frac{\text{volumen deseado}}{\text{volumen usado}} \\
 = \\
 \frac{1 \text{ mm}^3}{0.4 \text{ mm}^3} \\
 = 2.5 \\
 \\
 \text{factor de} \\
 \text{corrección} \\
 = \\
 \text{dilución del} \\
 \text{factor de} \\
 \text{corrección} \\
 (20) \times \\
 \text{volumen} \\
 \text{del factor} \\
 \text{de corrección} \\
 (2.5) = 50 \\
 \\
 \text{Si: } 1 \text{ mm}^3 \times 1000 = 1 \text{ cm}^3 \\
 1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml} \\
 \\
 \text{número de} \\
 \text{células/ml} \\
 = \\
 \text{número de células} \\
 \text{por } 1 \text{ mm}^3 \\
 \times 1000
 \end{array}$$

DETERMINACION DE LA Dosis LETAL 50 (DL₅₀).

La Fig. 1 ilustra el procedimiento esquemático para la determinación de la DL₅₀. Se utilizó un total de 120 ratones BALB/c singélicos de ambos sexos para cada grupo de edad o sexo, 1 mes, 4 meses y 12 meses. Se determinó la DL₅₀ para la cepa de *E. histolytica* denominada "León Pérez" y la cepa N° 5037. El inóculo de sabas capas se cuantificó por turbidimetría extrapolando los datos a la curva estándar mencionada anteriormente (Fig. 4). A partir del inóculo se prepararon 5 dosis: 1×10^8 , 1×10^6 , 1×10^5 , 4×10^3 y 1×10^2 levaduras/ml en solución salina estéril. Cada dosis en un volumen de 1 ml fué inoculado por vía intraperitoneal en 10 ratones de cada sexo y cada grupo de edad. Como control, 10 ratones de cada sexo y edad fueron inoculados con 1 ml de solución salina estéril. Se tomó en cuenta la muerte de los ratones a partir del 10º día post-inoculación hasta cumplir 45 días. Durante todo el transcurso del experimento los animales estuvieron bajo observación diaria. Para el cálculo de la DL₅₀ se procedió de acuerdo al método de Reed y Muench (16). La resistencia a la infección se expresó también por la sobrevivida de los animales en el período de 45 días de observación, calculada en porcentaje, tomando en cuenta el número de sobrevivientes y el número de muertos.

DETERMINACION DEL N° DE LINFOCITOS.

La cuenta de linfocitos se procedió en ratones hembras, normales e infectadas con diferentes dosis del hongo y como control se administró solución salina. Se hizo la determinación a los 15, 30 y 45 días post-infección (Fig. 2). Para cada edad y sexo se utilizaron tres ratones en un total final de 10 experimentos.

La cuenta de linfocitos se llevó a cabo de acuerdo a la cuenta diferencial de células blancas en sangre periférica. Los ratones fueron sangrados de la cola y con la sangre obtenida se hicieron frotis, los cuales fueron coloreados por la técnica de Wright.

RESULTADOS EXPERIMENTALES:

Intradérmorreacción.- La prueba intradérmica se llevó a cabo usando la técnica de hinchazón del cojinete plantar del ratón (47). Se utilizaron hembras de tres edades distintas infectadas con diferentes dosis del hongo, así como hembras normales (Fig. 2). Se procedió a la realización de la prueba en los días 15, 30 y 45 días post-infección. El antígeno de desafío histoplasmina fué inculado en una dosis de 10 ug de proteína/0.05 ml en el cojinete plantar derecho, siendo el control de solución salina inculado en igual volumen en el cojinete plantar izquierdo. La medida del espesor del cojinete plantar se hizo con un microcalibrador antes y después de 24 horas del desafío con el antígeno (47). El aumento de la hinchazón del cojinete plantar está dado por la diferencia (X_D) entre la lectura, después de 24 horas del desafío con el antígeno ($X_{t_{24}}$) y la lectura antes del desafío (X_{t_0}).

Las lecturas del incremento fueron convertidas al porcentaje por la fórmula:

$$X_D = \frac{X_{t_{24}} - X_{t_0}}{X_{t_0}} \times 100 \quad \cdot \quad \bar{X}_D = \frac{\sum X}{n}$$

Donde \bar{X}_D es la media de cada grupo de dosis y de tiempo; n es el número de animales usados en cada ensayo. Siendo n=5 por cada dosis y por cada tiempo de 15, 30 y 45 días post-infección.

Determinación de % de células vivas del exudado peritoneal.- Se inocularon 3 ml de aceite mineral estéril por vía intraperitoneal dos días antes de la prueba en ratones hembras de las tres edades estudiadas, infectadas con cuatro dosis diferentes del hongo (Fig. 2), así como hembras normales. Se sacrificaron los animales y se procedió a extraer las células lavando la cavidad peritoneal con SBS conteniendo 10 U/ml de heparina en condiciones estériles. Se determinó el número de células peritoneales vivas y muertas por la técnica de exclusión de azul de tripano en un hematocitómetro. Esta prueba se realizó en los 15, 30 y 45 días post-infección (ver Fig. 2).

TOXICIDAD DE IRADIACIONES EN RATONES BALB/c DE DISTINTAS EDADES.

Se trabajó con grupos de ratones BALB/c de ambos sexos y las edades de 1 mes, 4 meses y 12 meses. Cada grupo estaba integrado por 24 ratones, -- siendo 12 hembras y 12 machos. A subgrupos de 2 animales de un solo sexo -- de cada edad se les administró una dosis de irradiación. Las dosis probadas fueron 500, 600, 700 y 800 rads, según las condiciones de irradiación -- descritas en la Tabla 1. Después de la irradiación los animales se mantuvieron a una temperatura superior a 16°C, con alimento y agua adicionada -- con hipoclorito y acidificada con ácido ascórbico. Los animales fueron observados diariamente por un período de dos meses.

RECONSTITUCIÓN DE TRANSFERENCIA DE CÉLULAS EN ANIMALES RECEPTORES: TÉCNICA DE BASES DE CÉLULAS Y TIEMPO DE INOCULACIÓN.

Se utilizaron como receptores de células a ratones machos singénicos -- de la cepa BALB/c de 4 meses de edad. Se irradiaron 65 animales por cada experimento con una dosis de 700 rads. De los animales de cada grupo, 60 -- ratones fueron reconstituidos con diferentes dosis de células de ratones -- BALB/c del mismo sexo y de diferentes grupos de edades (Tabla 2). Cinco ratones permanecieron como control del efecto de irradiación. Los animales -- fueron reconstituidos con las siguientes dosis de células de médula ósea -- 1×10^6 , 1×10^7 y 2×10^7 células/0.15ml y dos dosis de células de bazo -- 5×10^6 y 5×10^7 células/0.15 ml. Se formaron grupos de 5 animales por cada dosis. Las células de médula ósea fueron obtenidas de la siguiente manera: Se anestesiaron de 10 a 20 ratones con éter sulfúrico, se fijaron en -- tablas contenedoras en posición dorsal, de manera que la parte podálica -- quedara frente al operador. Se practicó antisepsia con alcohol en ambos -- miembros podálicos, incidiendo los diversos tejidos por planos hasta llegar al hueso. Se disecaron cuidadosamente los tejidos blandos y se limpió la -- parte ósea con pinzas de disección. Se retiró el fémur de su tibia, desarticulando el miembro sin romper la región ósea y posteriormente se seccionaron los extremos de los dos huesos. En condiciones estériles se introdujo -- una jeringa con SBS a la epífisis del fémur y posteriormente de la tibia. -- Una vez introducido el bisel de la aguja, se procedió a lavar varias veces...

y de esta manera por la presión ejercida por el líquido se extraen fragmentos de médula ósea en pequeños trozos amarillentos en forma de hilo. Este producto es colectado en tubos esteriles conteniendo SBS adicionado de 20 μ l de heparina/ml y antimióticos y mantenido en el hielo hasta el cultivo de las células con azul de tripano.

Las células de bazo fueron obtenidas por disociación mecánica del órgano en SBS. Después de filtrar estérilmente a través de gasa al papete celular obtenido se lavó con SBS y se le agregó cloruro de amonio al 0.25% para eliminar los glóbulos rojos. Las células se ajustaron en un hemacitómetro a las concentraciones de 4×10^7 y 5×10^7 células/0.10 ml de SBS.

La inoculación se llevó a cabo por vía retrocular de acuerdo a la siguiente técnica: Se tomó al ratón de la cola con los dedos índice y pulgar de la mano derecha e inmediatamente con la mano izquierda se inmovilizó la cabeza del animal tomándola a nivel del cuello por la región dorsal con los dedos índice y pulgar, retirando la piel de la cara del ratón, hasta que se protruyan los globos oculares. En seguida se introdujo el bisel de la aguja de una jeringa de tetraculina que contiene la dosis final de 0.3 ml a inocular en la parte inferior media del ojo del animal.

Fungieron como donadores en diferentes experimentos, células de médula ósea de ratones singénicos BALB/c machos de 4 meses y de 1 mes de edad. Los tiempos de transferencia fueron de 3 horas y de 24 horas post-irradiación (Tabla 2).

CINETICA DE INFECCION POST-TRANSFERENCIA EN CÉLULAS.

Para este experimento fueron requeridos 55 ratones machos de la cepa singénica BALB/c de 4 meses de edad. Estos animales fueron irradiados con una dosis de 700 rads, de los cuales cinco ratones permanecieron como control de irradiación y el resto de los ratones fueron reconstituidos con células de médula ósea y de bazo procedentes de ratones singénicos donadores machos de 1 mes de edad con una dosis de 1×10^7 células de médula y 5×10^7 células de bazo en 0.3 ml de SBS. Cinco de los ratones irradiados y recons

tituidos funcionaron como control de transferencia. Los demás animales fueron infectados a diferentes tiempos con dosis variables de células levaduriformes de *H. capsulatus* (Fig. 5). Después de haber sido reconstituidos con células de médula ósea, los ratones fueron infectados a los 24 horas, 3 días y 7 días con 1×10^7 , 2×10^8 y 4×10^9 levaduras de *H. capsulatus* N° 5037 en 1 ml de salina estéril. Los animales permanecieron en observación diaria durante 2 meses.

CAMBIO EN LA RESISTENCIA A LA ENFERMEDAD HEMATOBLASTICA DESDE LA TRANSFERENCIA INDUCIDA DE CÉLULAS.

Transferencia de células totales de bazo y de médula ósea.— La Fig. 6 muestra el esquema general de estos experimentos. Un total de cien ratones machos singénicos 5AL1/c de 41 meses de edad fueron utilizados para el experimento de transferencia de células (24 horas post-irradiación Tabla 2). De cincuenta ratones que fueron irradiados con 700 rads en las condiciones antes mencionadas (Tabla 1), diez funcionaron como control de irradiación (grupo VII), veinte fueron reconstituidos a los 24 hs. de irradiados con 1×10^7 células de médula ósea y 5×10^7 células de bazo provenientes de ratones singénicos de 1 mes (grupo I); los ratones irradiados restantes fueron reconstituidos con idénticas cantidades de médula ósea y de bazo procedentes de ratones de 41 meses de edad (grupo III). Por otro lado, a cuarenta ratones normales no irradiados se les transfirió células singénicas de bazo, de los cuales 20 recibieron células de donadores de 1 mes (grupo II) y los 20 restantes recibieron células de ratones de 41 meses de edad (grupo IV).

Los grupos de ratones transferidos en sus diferentes modalidades (grupo I, grupo II, grupo III y grupo IV) fueron infectados con una cepa atenuada de *H. capsulatus* y la mitad de cada grupo fungió como control de transferencia, sin recibir infección. Además, diez ratones normales de 41 meses (grupo V) y diez ratones normales de 1 mes de edad (grupo VI) fueron infectados con el hongo, funcionando de esta manera como controles de infección.

La infección se llevó a cabo después de una semana post-irradiación. —

Los ratones fueron infectados con *Blaschkeform* con enzimas copa 5037 utilizando la dosis letal para ratones de un mes, o sea de 4×10^8 levaduras/ml. -- Los animales fueron observados diariamente y a los ratones infectados se les siguió el curso de la infección mediante la detección de signos y síntomas de la enfermedad.

De los animales infectados y muertos se llevó a cabo el aislamiento del hongo. El aislamiento se obtuvo del bazo, pulmón e hígado de los ratones. Los órganos fueron macerados y sembrados en pequeñas porciones a tubos de medio de micobiotia con posterior incubación a temperatura ambiente.

Transferencia de células adherentes y no adherentes de bazo. -- La separación de las células adherentes se realizó según la técnica de Mosier (48). Las células no adherentes fueron cosechadas a parte. Ambas poblaciones celulares fueron ajustadas en 0.3 ml de SES conteniendo 1×10^7 . Todos los ratones utilizados como receptores de células fueron machos singéncicos BALB/c de 4½ meses de edad. Cada grupo experimental estuvo constituido por 10 animales.

Al primer grupo de ratones se les transfirieron células de bazo (5×10^7 cél/0.3 ml), procedentes de ratones machos de 1 mes de edad, los cuales fueron previamente irradiados con 800 rads (ver Tabla 1) horas antes de la transferencia. Un segundo y tercer grupo de ratones recibió una población de células adherentes, separadas por la técnica de Mosier (1×10^7 cél/0.3 ml) y células no adherentes (1×10^7 cél/0.3 ml) respectivamente, procedentes de ratones de 1 mes. Un cuarto y quinto grupo recibieron también células adherentes y no adherentes de bazo, pero éstas provenían de ratones de 4½ meses de edad. El sexto grupo de ratones fué transferido con células de bazo totales (5×10^7 cél/0.3 ml), obtenidas de ratones de 4½ meses.

Además se agregaron dos grupos controles para la infección, a los cuales no se les efectuó transferencia de células y que correspondieron a ratones de 4½ meses y ratones de 1 mes de edad. A la siguiente semana, de acuerdo a la cinética de infección post-transferencia (ver material y método), se infectaron la mitad de animales, con la dosis letal para ratones de 1 mes.

La otra mitad se conservó como control de no infección de cada grupo. Un último grupo de ratones se utilizó como control de irradiación (5 ratones de 1 mes, irradiados a 800 rads).

Los animales permanecieron bajo observación diaria teniendo en cuenta los siguientes parámetros: Tiempo de supervivencia; presencia de signos de la enfermedad; resquebrajamiento del hongo en los animales muertos.

RESULTADOS

DETERMINACION DE LA DOSE LETAL 50 (DL₅₀).

Se utilizó esta determinación como una medida de resistencia a la infección histoplasmosa en los grupos de animales estudiados. En la figura 7 podemos observar los resultados de la DL₅₀ obtenidas para las dos cepas de *Histoplasma capsulatum* probadas.

Las dosis letales 50 de la cepa "León Pórez" de *Histoplasma* para ratones hembras BALB/c fueron: 3.5×10^6 cels/ml para ratones de 1 año; 1.7×10^6 cels/ml para ratones de 41 meses y 8.6×10^7 cels/ml para ratones de 1 mes. En los ratones machos se obtuvieron las siguientes dosis: 6.8×10^6 cels/ml para ratones de 1 año; 8.6×10^7 cels/ml para ratones de 41 meses y 1.4×10^5 cels/ml para ratones de 1 mes.

Con respecto a la cepa N° 5037 de *Histoplasma*, solo fueron calculadas las DL₅₀ para los ratones machos de 1 mes (3.16×10^6 cels/ml) y de 1 año (5.2×10^7 cels/ml). En cuanto a los resultados para ratones de 41 meses - de ambos sexos y para las hembras de las diferentes edades, las DL₅₀ no fueron alcanzadas a pesar de que se utilizaron dosis muy altas del hongo (Fig. 7).

Los animales controles, inculados con solución salina estéril, en estas series de experimentos para obtención de la DL₅₀, presentaron un comportamiento normal y sobrevivieron durante todo el período de observación.

Además, la resistencia también puede ser expresada por el porcentaje de sobrevivida de los animales a la infección. Trabajando con la cepa atenuada N° 5037 de *H. capsulatum* se pudo identificar muy claramente una mayor susceptibilidad de los ratones machos y de edades extremas, a la infección. La figura 8 corresponde al porcentaje de sobrevivida de ratones machos en tres edades diferentes a la infección por *Histoplasma*. Se puede apreciar que los ratones de edades extremas se mueren notablemente en un tiempo más corto y en función directa del aumento de la dosis, en cambio, en ratones de 41 meses de edad se observó una mayor sobrevivida de estos animales, lo que

indica una mayor resistencia, aún con las dosis más altas del hongo.

La figura 9 muestra que la sobrevivencia en los diferentes grupos de ratones hembras estudiados se mantuvo en los valores cercanos al 100%. Nuevamente se repite la observación de que, el grupo más resistente corresponde a la edad de 4 meses que presentó un 100% de sobrevivencia con las diferentes dosis del hongo. Los ratones de 1 año y 1 mes de edad mostraron una ligera disminución en el porcentaje de sobrevivencia, que fluctúa entre un 80 y 90%.

Con fines de correlacionar la variación de células linfoides, actividad de macrófagos y la defensa inmune celular, con la edad, se utilizaron solamente ratones hembras, las cuales fueron más resistentes a la infección, -- permitiéndonos así una diferenciación clara de estos parámetros en los tres grupos de edades estudiados.

DETERMINACION DEL PORCIENTO DE LINFOCITOS.

Esta prueba se hizo con el fin de detectar una posible variación, en los linfocitos, con la edad de los animales y frente al desafío con el hongo. La figura 10 muestra la variación en porcentaje, de los linfocitos, en las tres edades de ratones hembras estudiadas, y frente al desafío de diferentes dosis de *B. abortus*. Los ratones de 1 año y de 1 mes de edad a los 30 días de infección presentan un número más constante de linfocitos en las diferentes dosis de infección, cuyos valores son comparables a los valores obtenidos con el control de solución salina. Este resultado se mantuvo invariable a los 45 días post-infección. Por otro lado, los ratones de 4 meses desarrollaron una variación linfocítica marcada en los dos períodos post-infección estudiados cuando comparados con los valores controles y los observados con las dosis más bajas del hongo.

INTRADERMOREACCION.

El desarrollo de la defensa de tipo celular fué detectado por la reacción intradérmica a través de la prueba de hinchazón del cojinete plantar de ratones. Las figuras 11, 12 y 13 muestran la respuesta celular desarro-

llada en ratones hembras BALB/c de tres edades diferentes. Una marcada actividad cutánea (hipersensibilidad tardía) fué detectada por el incremento del grosor del cojín de la planta derecha en animales de 1 mes. Esta respuesta fué más notoria tanto a los 15, 30 y 45 días post-infección en animales de 1 mes y también en animales de 1 año cuando comparada con la respuesta desarrollada en ratones de 4 meses de edad. La respuesta de hipersensibilidad de los ratones de 1 mes persiste muy elevada en los tres períodos post-infección estudiados, mientras que en los animales de 1 año, la actividad cutánea disminuye a los 30 y 45 días post-infección.

Los controles de animales infectados y desafiados con solución salina, así como animales no infectados (S.S.), dieron muy baja respuesta, lo que demuestra claramente que la actividad inmune celular desarrollada a las diferentes dosis del hongo, en los animales infectados, se debió indudablemente a la respuesta inducida por el proceso infeccioso.

Los ratones de 1 mes y 1 año presentaron una mejor respuesta a las dosis de 2×10^3 y 2×10^5 céls/ml aunque respondieron a dosis más pequeñas. En cambio, los ratones de 4 meses sólo respondieron a las dosis más altas.

DETERMINACION DEL PORCIENTO DE CELULAS VIVAS DE REUNDAS PERITONEAL.

La actividad de los macrófagos peritoneales en la resistencia a la infección por el hongo fué valorada por la ausencia de muerte celular (del macrófago) en los distintos grupos de animales y frente al desafío de diferentes dosis del hongo. La figura 14 muestra el porcentaje de células vivas de exudado peritoneal, proveniente de ratones infectados con diferentes dosis de *H. equisetum* en los 3 períodos de tiempo post-infección. Los tres grupos de edades presentaron un porcentaje mayor de células vivas en las dosis más bajas de 2×10^3 , 2×10^5 céls/ml tanto a los 15, 30, como a los 45 días post-infección. En cambio, con las dosis más altas, los animales de 1 mes y 1 año disminuyeron el porcentaje de células vivas, indicando así mayor daño en los macrófagos. Sin embargo, en los animales de 4 meses, el porcentaje de células vivas se mantuvo constante en todas las dosis utilizadas y a lo largo de los diferentes días post-infección.

ESTABILIDAD DE LA Población.

A fin de cubrir en el futuro, los experimentos de transferencia de células linfoides a los diferentes grupos de ratones y con el objeto de obtener la dosis adecuada de irradiación necesaria para obtener una población de linfocitos, procedimos a realizar una dinámica de irradiación. En las figuras 15, 16 y 17 se observan los resultados obtenidos para los grupos de edad y sexo de los ratones estudiados.

Los diferentes grupos de ratones recibieron cuatro dosis de irradiación según las condiciones descritas en la Tabla I (ver material y método) y fueron observados durante un período de dos meses.

La figura 15 muestra los resultados para ratones BALB/c de ambos sexos singénicos de 1 mes de edad. A la dosis de 500 rads, los ratones hembras permanecieron vivos durante todo el lapso de tiempo del experimento, los ratones machos murieron en los tiempos variables de 6-32 días. Con las dosis de 600, 700 y 800 rads las hembras y machos murieron en su totalidad en un período variable. Aquellos que recibieron 600 rads murieron en un rango de 5 a 7 días, los que fueron irradiados con 700 rads, el período de muerte fluctuó entre los 10 y 20 días para los machos y hembras y finalmente, los ratones que recibieron 800 rads murieron fundamentalmente entre los 11 y 15 días.

La figura 16 muestra los resultados para ratones de 4½ meses de edad - tanto machos como hembras. A la dosis de 500 y 600 rads los ratones aparentemente no sufrieron cambios drástico en su población celular, ya que durante el período de observación permanecieron vivos. De los ratones irradiados a 700 rads, los machos murieron en un período de tiempo de 10 a 15 días, siendo que las hembras presentaron una mayor resistencia a esta dosis, ya que sobrevivieron hasta 40 días. Todos los animales que recibieron la dosis de 800 rads murieron en un período de 5 a 18 días.

Finalmente la figura 17 ilustra los resultados para ratones de 1 año - de ambos sexos. A las dosis de irradiaciones probadas todos los ratones machos y hembras murieron entre los 6 y 26 días.

De los resultados obtenidos, los dosis de irradiación seleccionadas para trabajar con ratones singénicos BALB/c en las diferentes edades y sexos, con fines a los experimentos de reconstitución con células, fueron: para ratones de 1 mes hembras o machos, preferencialmente la dosis de 600 rads, para los ratones de 4 meses machos, preferencialmente la dosis de 700 rads y para ratones de 1 año hembras o machos una dosis menor o igual a 500 rads.

EFICIENCIA DE TRANSFERENCIA DE CÉLULAS DE ANIMALES IRRADIADOS. CINÉTICA DE LAS DOSIS DE CÉLULAS Y RESULTADOS DE TRANSFERENCIA.

En la Tabla 2 se observan los grupos de ratones utilizados. De estos grupos, doce fueron irradiados y reconstituídos con diferentes dosis de células de médula ósea y de bazo. Estas transferencias se hicieron con células procedentes tanto de ratones de 4 meses como de 1 mes de edad.

Los resultados (Tabla 2) usando las diferentes dosis de células en todos los grupos de ratones estudiados, fueron satisfactorios, ya que todos los animales sobrevivieron a la reconstitución celular sin presentar ningún efecto colateral a la transferencia de las células. El grupo 13, correspondiente al control de irradiación y que no fue reconstituído con células, funcionó correctamente, observándose muerte total de los animales en un período corto de tiempo.

CINÉTICA DE INFECCIÓN POST-TRANSFERENCIA DE CÉLULAS.

Este experimento permitió ubicar el mejor día para realizar la infección con el hongo, en particular, para los animales que recibieron radiación y transferencia de células singénicas. La figura 18 muestra el comportamiento de los ratones irradiados y reconstituídos con células de médula ósea y bazo e infectados con *H. opoulatum* a diferentes intervalos de tiempo.

Los ratones que se infectaron 24 horas después de la reconstitución de células, presentaron muerte en un período de tiempo corto (6-24 días), siendo que tanto la dosis más alta como la dosis intermedia y la dosis más baja de infección, producen la muerte en tiempos similares. Esto sugiere que el tiempo de 24 horas post-transferencia para infectar con *Histoplasma* es inadecuado.

cuado, ya que los animales están altamente susceptibles por el tratamiento de irradiación y transferencia de células siendo incapaces de discriminar la diferencia de dosis infectante. En los ratones que se infectaron a los 3 -- días de haber sido reconstituídos con células, ya se pudo apreciar mejor un efecto de dosis del hueso. A la dosis infectante más alta, la muerte de -- los ratones se llevó a cabo en el intervalo de tiempo más corto (8-24 días) que con la dosis intermedia y la dosis más baja. Finalmente, en los ratones que se infectaron a los 7 días post-transferencia, se pudo observar que la - muerte de estos animales se retardó más y parece que se manifiesta después - de un período de resolución propio de la infección. Con la dosis más alta - los ratones murieron entre los 13-35 días; con la dosis intermedia la muerte fué entre los 24-35 días; con la dosis más baja murieron entre los 26-30 - - días, habiendo sobrevivido 2 ratones.

De estos resultados (Fig. 18), podemos deducir que el tiempo más adecua do para infectar a los ratones después de haber sido irradiados y transferi dos con células de médula ósea y bazo, es al 7^o día, ya que la muerte se ob servó en un período de tiempo comparable con los ratones testigo de infec ción, usados a lo largo de este estudio.

CAMBIOS EN LA RESISTENCIA A LA INFECCIÓN HISTOPLASMOSICA CON LA TRANSFEREN CIA ADUCTIVA DE CÉLULAS.

Transferencia de células totales de bazo y médula ósea.— Se planteó el experimento de transferencia de células, con la pretensión de identificar si las células de animales en edades extremas producían cambios en la resistencia de animales adultos, los cuales son capaces de resolver favorablemente - la infección. Como donadores de células, se seleccionaron los animales ma chos de 1 mes por ser los más susceptibles a la infección. El esquema de la figura 6 muestra de una manera general como se planteó el experimento. Se -- utilizaron como animales receptores de células, ratones machos de 4^o meses - de edad, ya que según la determinación de la PL₅₀ los de esta edad eran más resistentes a la infección entre los machos.

Durante el período de observación, los siguientes parámetros fueron me-

didos: a) sobrevida y muerte de los animales; b) presencia de signos de la enfermedad; c) resquebrajamiento del hongo de los órganos, procedentes de los animales muertos por la infección.

En la Tabla 3 se puede observar la variación en el número de muertes de los ratones infectados, dependiendo de la transferencia de células a que fueron sometidos. Los animales adultos irradiados y receptores de células de médula ósea y bazo de ratones de 1 mes de edad, que corresponden al grupo I, al ser infectados con *B. anthracis*, murieron en su mayoría, probablemente por disminución drástica de sus defensas. De un total de 9, por cada lote, el número de muertes fue de 5, 7 y 7 por cada experimento, siendo que los ratones controles de este grupo, los cuales no fueron infectados, permanecieron vivos. Respecto a los ratones de 4½ meses de edad no irradiados, pero que sin embargo, recibieron células de bazo de ratones de 1 mes (grupo II), también desarrollaron, aunque menos drásticamente, un abatimiento en la defensa de los animales receptores, producido probablemente por las células transferidas. De un total de 9, 10 y 10 ratones del grupo II, murieron, 3, 4 y 4 animales por cada experimento respectivamente, siendo que el grupo control (no infectados) presentó un número muy bajo de animales muertos, o sea, murieron un total de cuatro ratones en los 3 experimentos realizados. En los grupos III y IV, en donde las células transferidas pertenecían a la misma edad del animal receptor, no se modificó la buena capacidad de defensa a la infección por las células transferidas.

Los grupos V, VI y VII restantes funcionaron como controles. El grupo V formado por ratones de 4½ meses infectados con la dosis letal para ratones de 1 mes, funcionó como control de infección ligera, ya que a esa dosis infectante, estos ratones adultos no irradiados desarrollaron la enfermedad pero la resolvieron favorablemente en su mayoría. De un total de 27 del grupo V, se observó muerte de 2 en el segundo experimento, lo que demostró la alta resistencia de los animales adultos a la dosis de infección. El grupo VI -- constituido por ratones de 1 mes de edad e infectados con la DL_{50} para ratones de 1 mes, funcionó como el control de infección para esta edad. Se observó en el grupo VI una alta tasa de letalidad en los 3 experimentos, siendo que 23 animales murieron de un total de 27.

Finalmente, el grupo VII constituido por animales adultos irradiados, - funcionó como control de irradiación. Como era de esperarse los animales murieron en un 100%.

La manifestación de los signos de enfermedad puede ser observada en la Tabla 4. Los grupos II y VI presentaron los tres signos principales de la enfermedad (pérdida de peso, inmovilidad y pelos erizados), manifiestos en mayor intensidad a los 30 y 60 días post-infección. El grupo I, mostró éstos signos en mayor intensidad solo a los 30 días post-infección. Sin embargo, fué el grupo que presentó el mayor número de muertes. Los grupos III, - IV y V presentaron signos muy ligeros de la enfermedad.

Por último, la Tabla 5 muestra el número de cultivos positivos obtenidos de los animales infectados y muertos con *S. caryophagus*. Los resultados de la Tabla 5 indican casi el 100% de cultivos positivos para el hongo en los animales muertos.

Transferencia de células adherentes y no adherentes de bazo.- La Tabla 6 muestra que los ratones de 4½ meses de edad, que recibieron una población de células adherentes de bazo, así como el grupo que recibió células totales de bazo provenientes de ratones de 1 mes, presentaron los signos de la enfermedad con mayor intensidad y sucumbieron en un plazo más corto a la infección con *Heterophyium*.

Los animales que recibieron una población de células no adherentes de bazo así como aquellos que recibieron una población de células previamente irradiadas a 800 rads. procedentes de donadores de 1 mes, presentaron también signos marcados de la enfermedad, pero en forma menos intensa que los anteriores y tuvieron una muerte más tardada que los grupos anteriores. Con respecto a los animales que recibieron células adherentes y células totales de bazo de donadores adultos (4½ meses), la resolución de la infección cuando fueron desafiados con el hongo siguió un curso normal.

Los controles de infección para animales de 1 mes y de 4½ meses funcionaron adecuadamente, o sea, los ratones de 1 mes murieron en su totalidad y los ratones de 4½ meses resolvieron la infección (dosis letal para ratones de 1 mes).

Los últimos grupos de controles, aquellos que solo recibieron transferencia de células y los cuales no fueron infectados, sobrevivieron todo el tiempo del experimento, indicando que estos controles de transferencia funcionaron adecuadamente (Tabla 6). Para los animales donadores de células irradiadas se hizo un control del efecto letal de irradiación y se pudo observar que estos animales murieron como era de esperarse en un período de 3 días.

El reaclamamiento del hongo obtenido de los órganos (bazo, hígado y pulmón), en los casos de muerte de los ratones infectados resultó positivo.

Finalmente se repitió el experimento anterior siguiendo el mismo planteamiento general pero con dos modificaciones críticas: una en cuanto a la separación de las poblaciones de células adherentes de las no adherentes -- por incubación prolongada de las células de bazo durante 24 hrs, para que de esta manera se obtuviera una mejor separación de ambas poblaciones celulares. La segunda modificación fue con respecto a la dosis infectante del hongo, seleccionándose una dosis subletal para ratones de 1 mes, para poder discriminar con mayor claridad el posible efecto de abatimiento de las células sobre la defensa del animal.

En la Tabla 7 podemos apreciar que los ratones receptores de células adherentes de 1 mes, así como los receptores de células irradiadas con 800 rads sufrieron un abatimiento notorio en su defensa hacia la infección en relación a los demás grupos y a los controles, ya que fueron los únicos que presentaron muerte.

DISCUSION

La susceptibilidad a la infección histoplasmática parece estar condicionada por factores como la edad y sexo. Nuestro trabajo demostró que los ratones adultos de 41 meses de edad y las hembras son notoriamente más resistentes a la histoplasmosis experimental, y que la edad del animal, determina cambios en la capacidad de defensa a la infección (Fig. 7).

Parece ser que existen condiciones biológicas que predisponen un pronóstico malo para los ratones machos, así como para los animales de edades extremas, en comparación con la capacidad de defensa de los ratones hembras y adultos. La mayor predisposición a la infección observada en la DL_{50} y porcentajes de sobrevivencia en animales machos menores de 1 mes podría ser debida a un estado inmune supresivo previo a la infección o perfil del animal a esta edad y que fue capaz de ser transferido por células de bazo (21-25). Usando transferencia adoptiva, detectamos que el estado supresivo de estos ratones muy jóvenes abate la resistencia de ratones adultos, antes capaces de resolver exitosamente la infección histoplasmática (Tabla 3).

Ante la inquietud de conocer la población responsable de transferir el estado supresivo observado en los ratones receptores adultos, transferimos por separado poblaciones de células adherentes y no adherentes de bazo. Nuestros resultados actuales comprometen preferencialmente a las células adherentes como una población importante en la manifestación de este fenómeno aunque en un tiempo más largo el efecto supresivo también se presenta por la transferencia de células no adherentes.

La determinación de la DL_{50} constituyó un buen parámetro para el estudio de la resistencia a la infección. El manejo de las dos cepas de *H. capsulatum* con diferentes grados de virulencia, permitió una mejor discriminación de la resistencia a la infección histoplasmática en ratones singénicos BALB/c frente a diferencias de sexo y edad. Esta información se corroboró en un estudio similar realizado en una cepa abierta (no singénica) de ratones C-57. Estos ratones aunque más resistentes a la infección que los -

BALE/c, también desarrollaron una mayor resistencia a la infección por parte de las hembras adultas (observación personal).

Sin lugar a dudas, la expresión gráfica del porcentaje de supervivencia de los animales (Figs. 3 y 3'), pone de manifiesto con mayor realce la elevada resistencia de ratones hembras en comparación con los ratones machos. Se observó además, que en la población de machos susceptibles, fué posible diferenciar con mayor nitidez la resistencia a la infección con respecto al factor edad, ya que los machos de edades extremas, cursaron la infección en forma más severa, especialmente los animales menores de 1 mes. Como observación colateral, es interesante señalar lo que detectamos respecto a sensibilidad a radiaciones en los animales de prueba. Las curvas de irradiación para los diferentes sexos y edades de los ratones, mostraron que los ratones hembras resistieron a dosis más altas que los machos, sobresaliendo esta resistencia en los ratones de 4½ meses de edad, donde estos animales, soportaron las dosis de irradiación que afectan a los ratones de 1 mes y 1 año.

Es obvio que la edad y el sexo alteran la expresión de los mecanismos de defensa inmune de los individuos. En un momento dado, esta alteración bajo circunstancias especiales, podría favorecer la implantación de un proceso infeccioso. Sin embargo, siendo esto un hecho para muchos investigadores, no se han estudiado aún con detalles, los cambios originados por los factores como edad y sexo a nivel de respuesta inmune y que predisponen a la infección.

Nosotros en las histoplasmosis, detectamos que la edad puede tener un efecto no favorable en el curso de la infección porque posiblemente interfiere con la función protectora de la inmunidad mediada por células, permitiendo quizás una alteración en la regulación inmune, de ahí que los animales muy jóvenes al infectarse produzcan una mayor hiperactivación de la respuesta celular, la cual podría actuar causando daño.

Además, la edad puede tener un efecto variable sobre el número de células linfoides funcionales en los animales infectados. Se detectó un aumento en el número de los linfocitos (ligera linfocitosis) en ratones capaces de resistir a la infección o sea los animales de 4½ meses de edad. En cambio,

en los animales más susceptibles, los ratones de 1 mes y 1 año, no se presenta este fenómeno. Creemos que bajo condiciones de inmunocompetencia (ratones de 41 meses de edad) el aparato inmune es capaz de resolver la infección a *Histoplasma* a través de la eliminación del hongo por la acción de los efectores celulares, dando como resultado una mayor demanda de células que participan en la inmunocompetencia (células linfoides), las cuales se encuentran en condiciones óptimas para funcionar en la defensa del huésped. Sin embargo, en los casos en que el aparato inmune parece ser ineficiente en la eliminación del microorganismo (animales de 1 mes y 1 año), las estirpes celulares que toman parte en la defensa, de alguna manera, se encuentran modificadas, quizás por algún mecanismo previo a la infección, presentando posiblemente una alteración en la participación de las células responsables de eliminar de un modo eficiente al parásito.

Finalmente, es posible que la edad influya en la actividad presente en los macrófagos peritoneales de los diferentes grupos de edad y sexo de los animales estudiados. Como la vía de entrada del agente infeccioso fué intraperitoneal, el desarrollo de la defensa local sigue el mismo comportamiento de lo observado para edad y sexo respecto al número de linfocitos y a la alteración en la defensa celular. Esto es, en los ratones muy jóvenes y en los ratones viejos, se dañan más y en mayor número los macrófagos peritoneales, mientras que la supervivencia de la mayoría de los macrófagos vivos fué compatible con los animales adultos que desarrollaron mejor defensa a la infección. Naturalmente, este fenómeno es dosis dependiente, ya que a dosis más altas del hongo, se observó mayor destrucción de los macrófagos.

De lo expuesto anteriormente, es importante destacar que la respuesta de hipersensibilización más activa desarrollada en ratones de 1 mes y 1 año de edad, infectados con *Histoplasma*, al parecer no está evidenciando protección, sino más bien parece estar relacionada con el curso clínico más drástico de la enfermedad. Esto se apoya en la observación del mal estado general de estos animales, además de la frecuencia de reasistamiento de hongo. Este estado de hiperactivación se manifiesta incluso a partir de dosis infectantes más bajas del hongo, o sea de 2×10^1 y 2×10^3 células levaduriformes/ml. La persistencia de antígeno fúngico es compatible con la hiperactivación de

la respuesta inmune (desarrollo de hipersensibilidad), la cual puede ser ineficiente en la protección del animal y puede causar daño, originando una mala predisposición al curso clínico de la infección. Este fenómeno observado en los grupos de animales de edades extremas, no encuentra correspondencia - en los animales de 41 meses de edad, que mostraron una mayor resistencia a la infección experimental y en los cuales hay un estado de hipersensibilidad -- más bajo, respondiendo estos animales solamente a la dosis más alta de - - - 2×10^7 células levaduriformes/ml.

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos iniciales nos condujo al planteamiento de que el estado más susceptible frente a la infección de - los ratones muy jóvenes, estaba relacionado a elementos o funciones alteradas en la defensa de estos animales. Una posible manera de evidenciarlo sería seguir el comportamiento de células o grupos de células representativas de la defensa del animal, con fines a poder caracterizar su papel en el fenómeno de mayor susceptibilidad a la infección, desarrollada por estos ratones jóvenes. Dado que el hongo con que trabajamos es parásito del sistema reticuloendotelial y siendo el bazo uno de los órganos fundamentales en las etapas primordiales del desarrollo de la defensa, planteamos acompañar el efecto de estas células de bazo, de ratones de 1 mes a través de su transferencia a ratones de 41 meses, buscando observar posibles cambios inducidos por las células transferidas, en el comportamiento de animales receptores adultos aptos a responder a la infección.

Por la transferencia adoptiva se detectó un estado supresivo en los animales receptores adultos (41 meses de edad) que no se presentaba antes en -- sus condiciones normales. Los animales soportaron mal la dosis letal 50 para ratones de 1 mes y se enfermaron, como lo demuestra el número de muertes (Tabla 3), así como desarrollaron los signos característicos de la enfermedad (Tabla 4), además de que fué posible aislar por retrocultivo el hongo de los órganos de los animales muertos (Tabla 5). Probablemente este estado supresivo se podría deber a la transferencia de una actividad supresora que se encuentra en los bazos de ratones muy jóvenes. Sin embargo, había que considerar dos hechos: 1) El estado supresivo transferido a ratones adultos abate la defensa de éstos; 2) el estado supresivo en los ratones jóvenes está rela

cionado al desarrollo de una mala o ineficiente protección, pero si hay expresión de hipersensibilidad celular.

En los ratones muy jóvenes se podría hablar de una falta de madurez inmunológica o bien de una disminución en la eficiencia funcional de un tipo de células inmunocompetentes. Sin embargo, el hecho de que el estado supresivo es transferido, nos obliga a pensar en factores o en células supresoras. Dado que los factores están en pequeña concentración, su efecto no podría ser magnificado por la transferencia, de ahí que, es lógico pensar que el responsable de la supresión son las células transferidas. En varias infecciones - se ha comprometido 2 tipos de poblaciones supresoras, una de células adherentes tipo macrófagos y otra conocida como linfocitos T supresores (T_s) (49-53). Aunque la supresión aquí discutida no está inducida por el proceso infeccioso, pues es previo a éste, nos parece pertinente tener en cuenta que estas dos poblaciones supresoras serían las candidatas a explicar los hechos observados en nuestros experimentos.

Si las células transferidas fueran T supresoras, explicaría el efecto directo de abatimiento de la defensa en los ratones receptores, además de que explicaría también la supresión de la resistencia de los animales muy jóvenes a la infección. Por otro lado, si la población de los ratones jóvenes - - con actividad supresora fuera de células adherentes, podríamos pensar en un retraso en la capacidad de inhibir su propio sistema de defensa (de los ratones jóvenes), posiblemente por la producción gradual de la acción del factor de activación de linfocitos (FAL=interleucina 1) que se sabe activa poblaciones de células T (54). Además, si esto ocurriera estaría en el tiempo y estado de activación adecuados para ejercer una acción en las células de los animales receptores.

Observaciones experimentales han demostrado actividad supresora en bazo de ratones muy jóvenes, con respecto a la respuesta humoral, siendo que el efecto supresor no ha sido bien caracterizado, en estos animales, hacia la respuesta celular. Rodríguez y col.(21) encontraron que los bazos de ratones recién nacidos contienen células con actividad supresoras capaces de inhibir la respuesta dependiente de células T. Fidler y col. (55) observaron

que las células de bazo de ratones recién nacidos no son capaces de generar respuesta de anticuerpos *in vivo* hacia glóbulos rojos de conejo. Al comparar las respuestas en ratones de diferentes edades, detectó que en las primeras dos semanas la respuesta fue pobre para el antígeno estudiado (55).

Existen posiblemente algunas hipótesis que podrían explicar la falta de respuesta humoral en los bazos de ratones recién nacidos: a) los bazos de ratones recién nacidos contienen niveles anormalmente altos de células T supresoras, las cuales al actuar de una manera antigéno no específico sobre poblaciones de células T cooperadoras puede inducir un estado general de no respuesta (22); b) los bazos de ratones recién nacidos son ricos con células T amplificadoras de la supresión ($Ly-23^+$, $Qe-1^+$, $I-J^+$) (Jada et al.) las cuales actuarían elevando la actividad de células T supresoras ($Ly-1^+$, 32^+); c) los bazos de ratones recién nacidos son ricos en una población de células adherentes con actividad supresora (57).

Estas hipótesis están basadas sobre el hecho de que las células de bazo de recién nacidos poseen la capacidad para suprimir respuesta de una parte de las células adultas (56, 57, 58).

Otras observaciones apoyan el hecho de que la reactividad dependiente de T en la madurez del bazo se lleva a cabo en forma lenta, en comparación con otros órganos, ya que esta madurez se presenta alcanzando niveles normales en la segunda y tercera semana post-parto (59, 60, 61). Esta madurez lenta de la reactividad inmunológica en los bazos de ratones neonatos pretiene ser explicada por una falta de macrófagos funcionales (62, 63, 64). Se ha observado que la inoculación de macrófagos adultos puede mejorar significativamente la respuesta inmune de ratones recién nacidos. Una interesante observación en este aspecto es que los macrófagos no tienen que ser vivos para que las células neonatales hagan una buena respuesta humoral (62).

Todos estos datos nos permiten apoyar la idea de que la transferencia de la función supresora de las células de bazo de animales de 1 mes facilita el curso más severo de la infección histoplasmosa en estos animales, pero además parece ser que la población que está inicialmente involucrada en la transferencia del estado supresivo tiene la característica de ser adherente a vi-

drio y resistente a 800 rads de irradiación, lo que nos sugiere pensar en células tipo macrófagos.

Por último, el experimento donde se modificó el tiempo de incubación para una mejor separación de las poblaciones celulares y se procedió a la administración de una dosis subletal del hongo (Tabla 7), nos confirmó los planteamientos anteriores, ya que las células adherentes de ratones de 1 mes, -- así como las células procedentes de ratones irradiados (células radioresistentes a 800 rads, posiblemente macrófagos) al ser transferidas, mostraron ser aparentemente las responsables del estado supresivo en los ratones receptores adultos.

Nuestros resultados con relación a los factores como edad y sexo en la susceptibilidad a la infección intracelular por *Mycoplasma* nos parecieron muy interesantes. Para generalizar estos hallazgos, en el laboratorio estamos probando otros microorganismos, como es el caso de *Mycobacterium*, así como estudiando la susceptibilidad de otra cepa de ratones, que al parecer muestra el mismo comportamiento. Además, continuamos caracterizando con métodos más finos (marcadores de superficie), la población celular responsable de la respuesta observada en ratones recién nacidos.

SUMMARY

It has been observed that normal individuals exposed to *Histoplasma capsulatum* under identical conditions have different clinical courses of histoplasmosis. It is possible that factors like sex and age act on the individual's resistance to infection. Working with syngeneic BALB/c mice, we have observed in four and half month old mice (adults) a marked resistance (high DL_{50} and a high survival percent) to infection with the yeast phase of two strains of *Histoplasma capsulatum*, as compared with one month-(young) and one year old (old) mice. In all cases, females were more resistant to infection. Therefore, a sublethal infection in female mice of different ages (one month, four and half month and one year old) produced changes in the immune response at 15, 30 and 45 days post-infection. We observed no lymphocytosis, alteration of the percentage of living peritoneal macrophages and a higher hypersensitivity response with one month and one year old mice, suggesting the possible role of immune response (hyperactivity) in the severe course of infection in these two groups. In contrast, four and half month old female mice resolved the infection.

From all age and sex groups studies, one month old male mice developed the most severe course of the infection, suggesting a higher predisposition.

Spleen cells which had been irradiated or not from young male mice, after having been adoptively transferred to adult male mice, altered the resistance of the adult mice to infection. Apparently, the transference of the suppressive state is due to the population of adherent cells and radio-resistant cells present in the male one month old mice.

BIBLIOGRAFIA

1. RIPPON, J.W. Medical Mycology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1974. pp. 321.
2. GONZALEZ-OCHOA, A. (1959). Histoplasmosis pulmonar aguda en la República Mexicana. Rev. Invest. Salubr. Enferm. Trop. (Méx.). 19: 341-349.
3. EMMONS, C.W. (1961). Isolation of *H. capsulatum* from soil. In Washington, D.C. Pub. Health. Rep. 76: 591.
4. GONZALEZ-OCHOA, A. (1969). Las micosis pulmonares en México y Centroamérica. Rev. Invest. Salud Públ. (Méx.) 25: 179-196.
5. VELASCO, C.O. (1981). Quelques aspects de l'Histoplasmosse en République Mexicaine. Medicine Tropicale. 61: 691-693.
6. YOUMANS, G.P.; P.Y. PATERSON and H.M. SPENCERS. The biologic and clinical basis of infectious diseases. 2nd. Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1960. pp. 404.
7. ARTZ, R.P. and W.E. BULLOCK. (1979). Immunoregulatory responses in experimental disseminated histoplasmosis: Lymphoid organ histopathology - and serological studies. Infect. Immun. 23: 894-892.
8. ARTZ, R.P. and W.E. BULLOCK. (1979). Immunoregulatory responses in experimental disseminated histoplasmosis: Depression of T-cell dependent and T-effector response; by activation of splenic suppressor cells. Infect. Immun. 23: 893-902.
9. KAUFFMAN, C.A.; K.S. ISRAEL; J.W. SMITH; A.C. WHITE; J. SCHWARZ and G.F. BROOKS. (1978). Histoplasmosis in immunosuppressed patients. Amer. J. Med. 64: 923-932.
10. MEHRA, V.; L.H. MASON; J. FIELD and B.R. BLOOM. (1979). Lepromin-induced suppressor cells in patients with leprosy. J. Immunol. 123: 1813-1817.
11. VELASCO-CASTREJON, O.; S. ESTRADA-PARRA; E. PEDROZA; M.R. REYES-MONTES; J. PADIERNA; L. PORTILLO y F. QUEZADA. Los linfocitos T y B en el pronóstico de la histoplasmosis pulmonar primaria. Resumen II Congreso Nacional de Inmunología, Oaxtepec, México, 1976, pp. 98.
12. MAKINODAN, T.; E.H. PERKINS and H.G. CHEN. (1971). Immunologic activity of the aged. Adv. Gerontol. Res. 3: 171.
13. CHENEY, K.E. and R.L. WALFORD. (1974). Immune function and dysfunction in relation to aging. Life Sci. 14: 2075-2084.
14. PRICE, G.B. and T. MAKINODAN. (1972). Immunological deficiencies in senescence. I. Characterization of intrinsic deficiencies. J. Immunol. 108: 403-412.

15. PRICE, G.B. and T. MAKINODAN. (1972). Immunological deficiencies in senescence. II. Characterization of extrinsic deficiencies. *J. Immunol.* 108: 413-417.
16. BRENNAN, P.C. and B.W. JAROSLOW. (1975). Aged-associated decline in theta-antigens on spleen and thymus-derived lymphocytes of B6CF mice. *Cell - Immunol.* 15: 51-56.
17. STUTMAN, O. (1972). Lymphocyte subpopulations in NZB mice: Defect of thymus-dependent lymphocytes. *J. Immunol.* 109: 602-611.
18. OLSSON, L. and M.H. CLAESSON. (1973). Studies on subpopulations of theta-bearing lymphoid cells. *Nature New Biol.* 244: 50-51.
19. MAKINODAN, T.; J.W. ALBRIGHT; F.L. GOOD; C.P. PETER and H.L. HEIDRICK. (1976). Reduced humoral immune activity in long-lived old mice: an approach to elucidating its mechanisms. *Immunol.* 51: 903-911.
20. SEGRE, D. and M. SEGRE. (1976). Humoral immunity in aged mice. II. Increased suppressor T cell activity in immunologically deficient old mice. *J. Immunol.* 116: 735-738.
21. RODRIGUEZ, G.; G. ANDERSSON; H. WIGZELL and A.B. PECK. (1979). Non-T cell -- nature of the naturally occurring, spleen-associated suppressor cell present in the newborn mouse. *Eur. J. Immunol.* 9: 737-746.
22. MOSIER, D.E.; B.J. MATHIESON and P.S. CAMPBELL. (1977). Ly phenotype and mechanism of action of mouse neonatal suppressor T cells. *J. Exp. Med.* 146: 56-73.
23. ARGYRIS, B.F. (1978). Suppressor activity in the spleen of neonatal mice. *Cell. Immunol.* 36: 354-362.
24. MYRGITA, R.A.; E.A. GOIDL; S. KONTIAINEN; P.C.L. BEVERLEY and A. WIGZELL. (1978). Adult murine T cells activated *in vitro* by α -fetoprotein and naturally occurring T cells in newborn mice: Identity in function and cell surface differentiation antigens. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75: 2897-2904.
25. SKOWRON-CENDRZAK, A. and M. Ptak. (1976). Suppression of local graft-versus-hot reactions by mouse fetal and newborn spleen cells. *Eur. J. Immunol.* 6: 451-452.
26. KENNY, F.G. and A.J. GRAY. (1971). Sex differences in immunological response: studies of antibody production by individual spleen cells after stimulus with Escherichia coli antigen. *Pediatr. Res.* 5: 246-255.
27. EIDJINGER, D. and T.J. GARRETT. (1972). Studies in the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem-cell differentiation. *J. Exp. Med.* 136: 1093-1116.
28. KITTAS, C. and L. HENRY. (1980). Effect of sex hormones on the response of mice to infection with Toxoplasma gondii. *Br. J. Exp. Path.* 61: 590-600.

29. KOTANI, M.; Y. NAMA and H. FUJII. (1974). Inhibition by testosterone of immune reactivity and of lymphoid regeneration in irradiated and marrow reconstituted mice. Experientia. 30: 1343-1345.
30. DOBSON, E.L. and L.S. KELLY. (1973). The combined stimulation of the -- reticuloendothelial system by estradiol and endotoxin. Reticuloendoth. Soc. 13: 61
31. NOBLE, W.C. and G. MIDDLEY. (1979). Scalp carriage of Pityrosporum species: The effect of physiological maturity, sex and race. Sabouraudia. 16: 229-232.
32. MUCHMORE, H.G.; E.N. SCOTT; F.G. FELTON and R.A. FRONTLING. Sex differences in the virulence of C. neoformans for adult mice. Abstract VIII Congress International Society for Human and Animal Mycology, Palmerston North, New Zealand, 1982, p. 72.
33. DRUTZ, D.J.; M. HUPPERT; S.H. SUN; and E.L. McCURRHE. (1961). Human sex hormones stimulate the growth and maturation of Coccidioides immitis. Infect. Immun. 32: 897-907.
34. SASLAW, S. and J. SCHAEFER. (1955). Relation of sex and age to resistance of mice to experimental Histoplasma infections. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90: 400-402.
35. SALVIN, S.B. (1953). Immunization of mice against Histoplasma capsulatum. J. Immunol. 70: 267-276.
36. SALVIN, S.B. (1955). Resistance to reinfection in experimental histoplasmosis. J. Immunol. 74: 214-221.
37. SALVIN, S.B. (1955). Further studies on immunization of mice against Histoplasma capsulatum. Am. J. Hyg. 61: 72-81.
38. TEWARI, R.P. and H.L. KUSEL. (1971). Suppressive effect of streptomycin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages for Histoplasma capsulatum. Micopat. Mycol. Appl. 44: 231-240.
39. HERNANDEZ, R.A. (1979). Evaluación genética en ratones singénicos BALB/c usando pruebas inmunes de actividad celular in vivo e in vitro. Tesis de Licenciatura, Escuela de Ciencias Químicas, U.A.P. Puebla, Méx.
40. SMITH, C.E.; E.C. WHITTING; E.C. BAKER; R.R. ROSENBERGER; R.R. BEARD and M.T. SAITO. (1948). The use of coccidioidin. Amer. Rev. Tuberc. 57: 330-360.
41. LOWRY, O.H.; N.Y. ROSEBRAUGH; A.L. TARR and R.J. RANDALL. (1951). Protein measurements with the folin reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
42. KABAT, E.A. and M.M. MAYER. Inmunquímica Experimental. 1a. Edición La Prensa Médica Mexicana, México, 1968. p. 453.

43. HASSID, W.Z. and S. ABRAHAM. Chemical procedure for analysis of polysaccharides. In methods in enzymology. Colowick and N.O. Kaplan (Eds.) N. York, Academic Press. Vol. 3, 1957, pp. 34.
44. DUBOIS, M.; K.A. GUILLIS; J.K. HAMILTON; P.A. PEBERS and F. SMITH. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
45. MARCUS, S.; P.D. NIELSON and P.R. BASLO. (1956). Isolation of systemic mycotic pathogens: Qualitative and quantitative aspects. *J. Bact.* 72: 473-
46. REED, L.J. and H. MOENCH. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene.* 27: 493-497.
47. RIFKIN, D.; J.A. FREY; J.R. DAVIS; E.A. PETERSON and H. BINOWITZ. (1970). Delayed hypersensitivity to fungal antigens in mice. I. Use of the intradermal skin and foodpad swelling test as assays of active and passive sensitization. *J. Infect. Dis.* 123: 50-56.
48. MOSTER, D.F. (1967). A requirement for two cell types for antibody - formation in vitro. *Science*: 158: 1373-1375.
49. HICKERSON, D.A.; K.A. HAVENS and W.E. BOLLOCH. (1961). Immunoregulation in disseminated histoplasmosis: Characterization of splenic suppressor cell population. *Cell. Immunol.* 50: 287-297.
50. KATZ, P.; R.A. GOLDSTEIN and A.S. FABB1. (1979). Immunoregulation in infection caused by *Mycobacterium tuberculosis*: The presence of suppressor subpopulations of T lymphocytes. *J. Infect. Dis.* 140: 12-21.
51. HIRSCHBERG, H. (1978). The role of macrophages in lymphoproliferative response to *Mycobacterium leprae* in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 34: 46-51.
52. ELLER, J.J. (1978). Suppressor adherent cells in human tuberculosis. *J. Immunol.* 121: 2573-2579.
53. STOBO, J.D. (1977). Immunosuppression in man: suppression by macrophages can be mediated by interactions with regulatory T cells. *J. Immunol.* 119: 918-924.
54. BACH, J.F. The use of regulatory biological products to manipulate immune responses. In: Fourth International Congress of Immunology. Immunology 80, Progress in Immunology IV. M. Fougereau and J. Dausset (Ed.) Academic Press, London, 1980, p. 1181-1186.
55. FIDLER, J.M.; H.O. CHITSON and E.S. GCLUB. (1972). Functional development of the interacting cells in the immune response. II. Development of immunocompetence to heterologous erythrocytes in vitro. *J. Immunol.* 109: 136-140.

56. CANTOR, H.; J. HUGENBERGER; L. Mc VAY BOUDREAU; D. EARDLEY; J. KEMP; F.W. SHEN and R.K. GERSHON. (1978). Immunoregulatory circuits among T-cell sets. Identification of a subpopulation of T-helper cells that induces feedback inhibition. *J. Exp. Med.* 148: 871-877.
57. PTAK, W.; K.F. NAIDOFF; J. SZRZYENSKA and P.K. GERSHON. (1979). Ontogeny of cells involved in the suppressor circuit of the immune response. *Eur. J. Immunol.* 9: 495-500.
58. GERSHON, R.K. Suppressor T cells: a miniposition paper celebrating a new decade. in: Fourth International Congress of Immunology. Immunology 80, Progress in Immunology IV. M. Fougereau and J. Dausset (Ed.) Academic Press, London, 1980. p. 276-307.
59. MOSTER, D.E. and P.L. COHEN. (1975). Ontogeny of mouse T-lymphocyte function. *Fed. Proc.* 34: 137-140.
60. SPEAR, P.G.; A.L. WANG; U. WEISSHAUSER and G.M. EDELMAN. (1973). Characterization of splenic lymphatic cells in fetal and newborn mice. *J. Exp. Med.* 138: 557-571.
61. RABINOWITZ, S.C. (1976). Measurement and comparison of the proliferative and antibody responses of neonatal, immature and adult murine spleen cells to T-dependent and T-independent antigens. *Cell. Immunol.* 21: 201-216.
62. ARGYRIS, B.F. (1978). Role of macrophages in immunological maturation. *J. Exp. Med.* 128: 459-467.
63. HARDY, D.; A. GLOGERSON and B. DAMON. (1973). Ontogenic development of the reactivity of macrophages to antigenic stimulation. *Cell. Immunol.* 9: 282-293.
64. LAKDAHL, C.A. (1976). Ontogeny of adherent cells. I. Distribution and ontogeny of a cells participating in the response to sheep erythrocytes in vitro. *Eur. J. Immunol.* 6: 130-134.

INDICE DE FIGURAS

		Pág.
FIGURA 1.-	DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 (DL ₅₀) PARA <i>Histoplasma capsulatum</i> EN RATONES SINGÉNICOS - BALB/C.	45
FIGURA 2.-	ESQUEMA DE CARACTERIZACIÓN DE VARIACIONES EN LA RESPUESTA CELULAR, EN EL NÚMERO DE LINFOCITOS Y EN LA ACTIVIDAD DE MACRÓFAGOS PERITONEALES SEGÚN LA EDAD DEL ANIMAL Y FRENTE AL DESAFÍO DE LA INFECCIÓN POR <i>Histoplasma</i> .	46
FIGURA 3.-	ESQUEMA GENERAL PARA LA DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA INFECCIÓN HISTOPLASMÓSICA EN ANIMALES DE DIFERENTES EDADES.	47
FIGURA 4.-	RELACIÓN GRÁFICA ENTRE LA TRANSMITANCIA Y EL NÚMERO DE CÉLULAS LEVADURIFORMES DE <i>H. capsulatum</i> .	48
FIGURA 5.-	ESQUEMA DE LA CINÉTICA DE INFECCIÓN POST-TRANSFERENCIA DE CÉLULAS.	49
FIGURA 6.-	ESQUEMA DE TRANSFERENCIA DE CÉLULAS.	50
FIGURA 7.-	DISTRIBUCIÓN GRÁFICA DE LA DL ₅₀ CON CEPAS DE <i>Histoplasma capsulatum</i> EN RATONES BALB/C.	51
FIGURA 8.-	RESISTENCIA EN RATONES MACHOS BALB/C A LA INFECCIÓN HISTOPLASMÓSICA DETERMINADA POR EL PORCIENTO DE SOBREVIVIDA.	52

- FIGURA 9.- RESISTENCIA EN RATONES HEMBRAS BALB/C A LA INFECCIÓN HISTOPLASMÓICA DETERMINADA POR EL PORCIENTO DE SOBREVIVIDA. 5
- FIGURA 10.- DETERMINACIÓN DEL PORCIENTO DE LINFOCITOS EN RATONES BALB/C INFECTADOS CON *Histoplasma capsulatum*. 5
- FIGURA 11.- PRUEBA DE HINCHAZÓN DEL COJINETE PLANTAR A LOS 15 DÍAS POST-INFECCIÓN EN RATONES INFECTADOS CON *Histoplasma capsulatum*. 5
- FIGURA 12.- PRUEBA DE HINCHAZÓN DEL COJINETE PLANTAR A LOS 30 DÍAS POST-INFECCIÓN EN RATONES INFECTADOS CON *Histoplasma capsulatum*. 5
- FIGURA 13.- PRUEBA DE HINCHAZÓN DEL COJINETE PLANTAR A LOS 45 DÍAS POST-INFECCIÓN EN RATONES INFECTADOS CON *Histoplasma capsulatum*. 5
- FIGURA 14.- VIABILIDAD DE CÉLULAS PERITONEALES EN RATONES BALB/C INFECTADOS CON *Histoplasma capsulatum*. 5
- FIGURA 15.- CINÉTICA DE IRRADIACIÓN EN RATONES BALB/C HEMBRAS Y MACHOS DE 1 MES DE EDAD. 5
- FIGURA 16.- CINÉTICA DE IRRADIACIÓN EN RATONES BALB/C HEMBRAS Y MACHOS DE 4 MESES DE EDAD. 6
- FIGURA 17.- CINÉTICA DE IRRADIACIÓN EN RATONES BALB/C HEMBRAS Y MACHOS DE 12 MESES DE EDAD. 6
- FIGURA 18.- CINÉTICA DE INFECCIÓN POST-TRANSFERENCIA DE CÉLULAS. 6

INDICE DE TABLAS

	Pág.	
TABLA 1.-	CONDICIONES DE IRRADIACIÓN.	63
TABLA 2.-	EFICIENCIA DE TRANSFERENCIA DE CÉLULAS EN ANI- MALES IRRADIADOS. CINÉTICA DE DOSIS DE CÉLULAS Y TIEMPO DE TRANSFERENCIA.	64
TABLA 3.-	TRANSFERENCIA ADOPTIVA Y CAMBIOS EN LA RESIS- TENCIA A LA INFECCIÓN HISTOPLASMÓSICA.	
TABLA 4.-	SIGNOS DE LA INFECCIÓN HISTOPLASMÓSICA EN RATO- NES BALB/c.	66
TABLA 5.-	AISLAMIENTO DE <i>Histoplasma capsulatum</i> EN BAZO, HÍGADO Y PULMÓN EN RATONES INFECTADOS.	67
TABLA 6.-	TRANSFERENCIA DE CÉLULAS ADHERENTES Y NO ADHE- RENTES.	68
TABLA 7.-	TRANSFERENCIA DE CÉLULAS ADHERENTES Y NO ADHEREN- TES EN RATONES INFECTADOS CON DOSIS SUBLETAL DE <i>Histoplasma</i> .	69

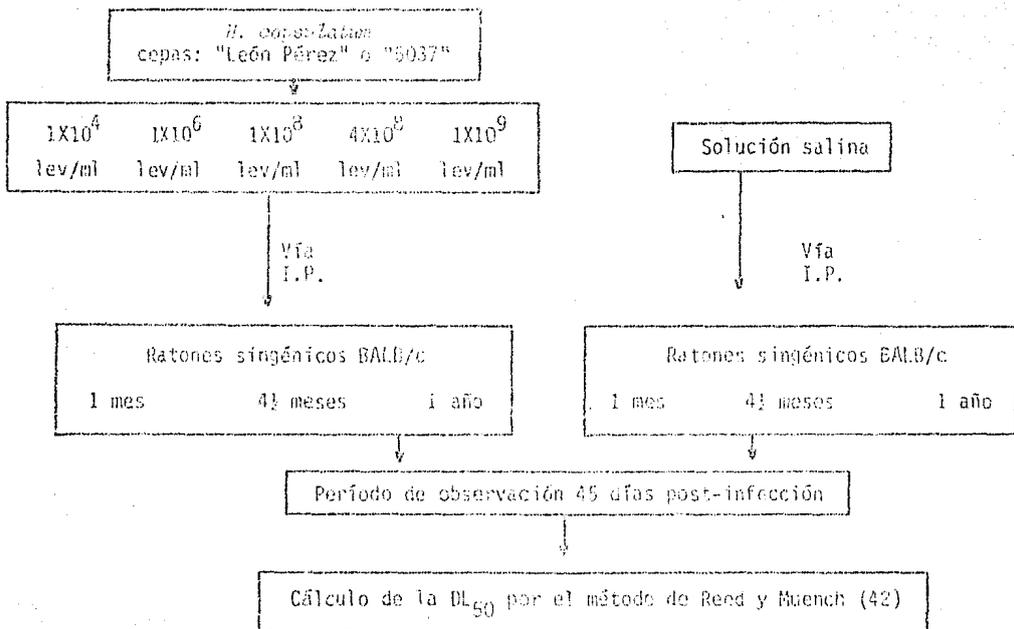


FIGURA 1.- DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 (DL₅₀) PARA *Histoplasma capsulatum* EN RATONES SINGÉNICOS BALB/c.

RATONES BALB/c
(1 SÓLO SEXO)

EDAD: 1 MES 4 1/2 MESES 1 AÑO

INFECCION CON
H. capsulatum

GRUPO CONTROL (SS)

DOSIS:

2×10^1 2×10^3 2×10^5 2×10^7
levaduras/ml

Vía I.P.

Vía I.P.

DIFERENTES
GRUPOS DE ANIMALES

DIAS POST-INFECCION

15 30 45

DETERMINACION DEL
% DE LINFOCITOS
EN SANGRE

DETERMINACION DE LA
RESPUESTA INMUNE CE-
LULAR

DETERMINACION DEL %
DE CELULAS PERITO-
NEALES VIVAS

I.D.R.

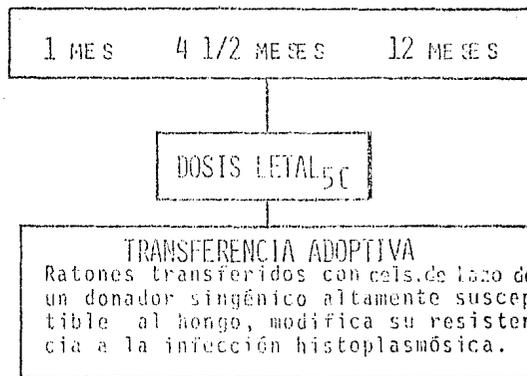
HISTOPLASMINA SOLUCION SALINA

FIGURA 2.- ESQUEMA DE CARACTERIZACION DE VARIACIONES EN LA RESPUESTA CELULAR, EN EL NUMERO DE LINFOCITOS Y EN LA ACTIVIDAD DE MACROFAGOS PERITONEALES SEGUN LA EDAD DEL ANIMAL Y FRENTE AL DESAFIO DE LA INFECCION POR HISTOPLASMA.

IDR - Intradermoreacción, SS - Solución Salina Estéril IP - Intraperitoneal

RATONES SINGENICOS BALB/c

EDAD



DETERMINAR:

1. La variación en la resistencia a la infección histoplasmósica a diferentes edades.
2. Que la variación linfóide en animales de diferentes edades modifica el curso de la infección histoplasmósica.

FIGURA 3.- ESQUEMA GENERAL PARA LA DETERMINACION DE LA RESISTENCIA A LA INFECCION HISTOPLASMOSICA EN ANIMALES DE DIFERENTES EDADES.

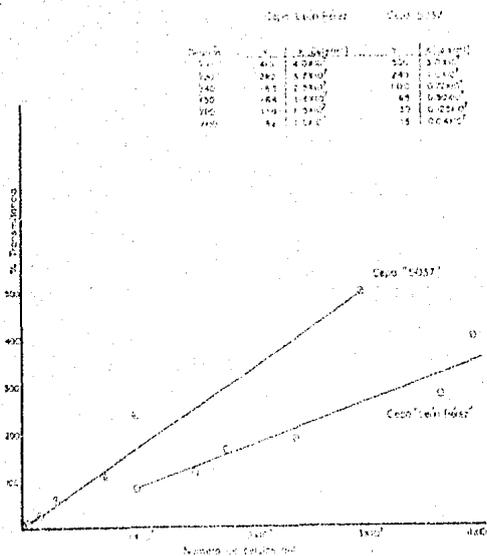


FIGURA 4.- RELACIÓN GRÁFICA ENTRE TRANSMITANCIA Y EL NÚMERO DE CÉLULAS LEVADURIFORMES DE *H. capsulatum*. Cada dilución de las células preparadas en solución salina fue leída en un hematocitómetro contrastando las células con azul de algodón. La lectura en fotocolorímetro se hizo en un aparato Klett-Summerson (Klett Manufacturing Co., Inc. New York).

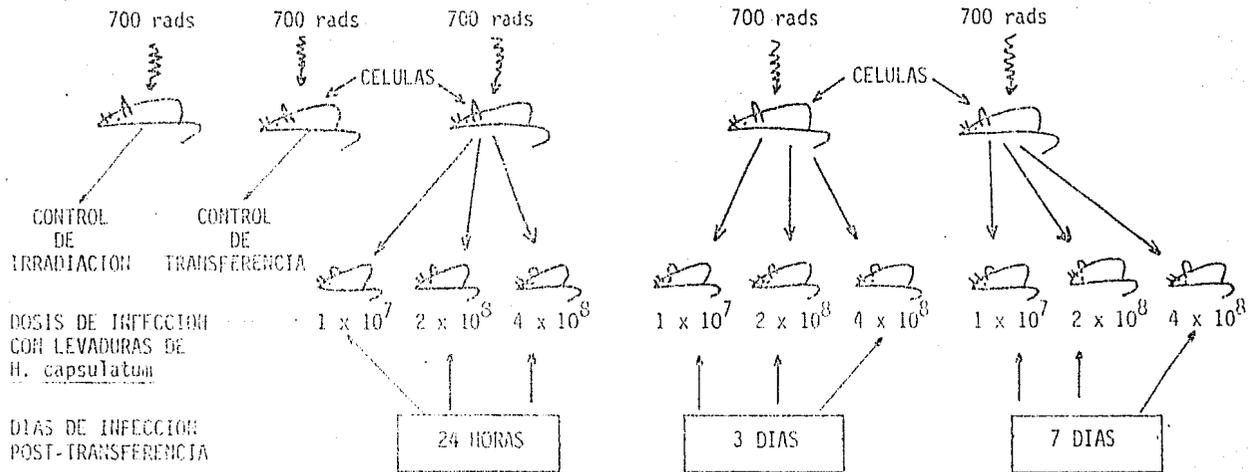


FIGURA 5.- ESQUEMA DE LA CINETICA DE INFECCION POST-TRANSFERENCIA DE CELULAS.

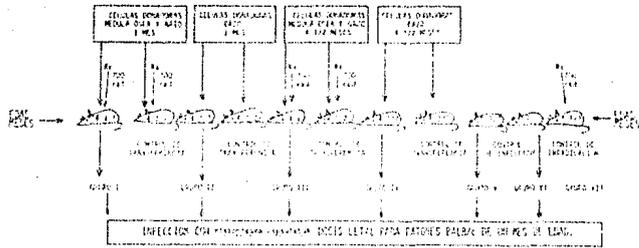


FIGURA 6.- ESQUEMA DE TRANSFERENCIA. Los animales receptores así como donadores utilizados en los experimentos de transferencia son de un sólo sexo y pertenecen a la cepa singénica de ratones BALB/c.

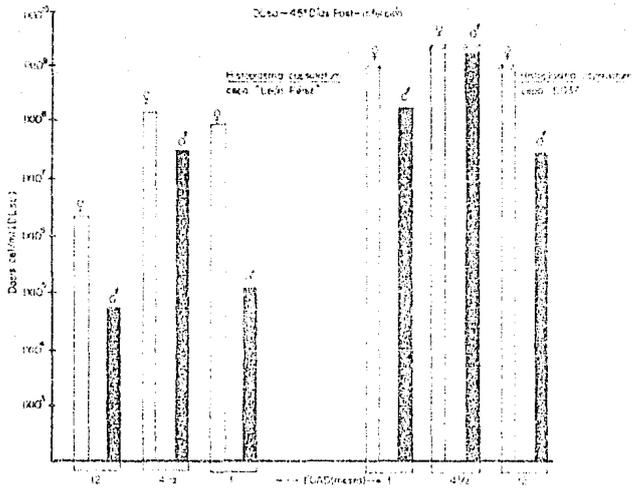


FIGURA 7.- DISTRIBUCIÓN GRÁFICA DE LA DL₅₀ CON CEPAS DE *Histoplasma capsulatum* EN RATONES BALB/C. Se trabajó con ratones singénicos machos y hembras de diferentes edades; las cepas de *Histoplasma* fueron mantenidas en fase levaduriforme a 37°C en medio de BHI enriquecido con L-cisteína y glucosa. Para la determinación de la DL₅₀ se utilizó el método de Reed & Muench.

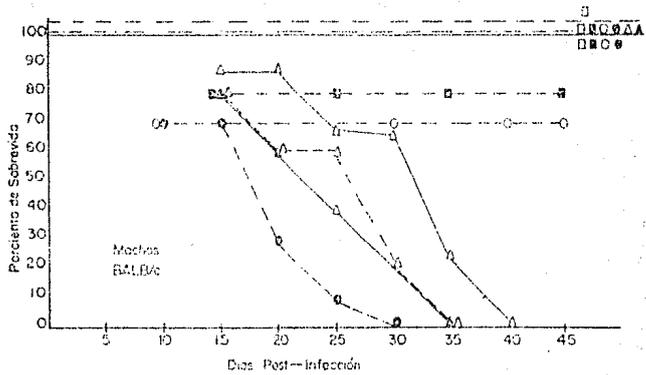


FIGURA 8.- RESISTENCIA DE RATONES MACHOS BALB/C A LA INFECCIÓN HISTOPLASMÓSICA DETERMINADA POR EL PORCIENTO DE SOBREVIVENCIA. Ver detalles en el texto.

Las líneas continuas (—) corresponden a ratones de 1 mes; las discontinuas (---) a ratones de 1 año y las líneas continuas punteadas (-.-) a ratones de 4 meses.

Dosis de desafío: (□) 1×10^4 levaduras/ml; (○) 1×10^6 levaduras/ml; (●) 1×10^8 levaduras/ml; (Δ) 4×10^8 levaduras/ml; (▲) 1×10^9 levaduras/ml.

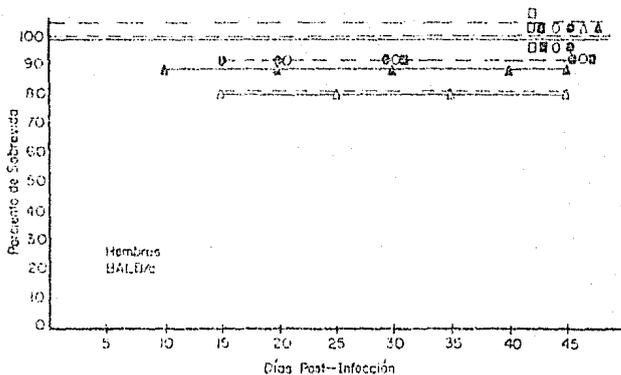


FIGURA 9.- RESISTENCIA DE RATONES HEMBRAS BALB/C A LA INFECCIÓN HISTOPLASMÓICA DETERMINADA POR EL PORCIENTO DE SOBREVIVENCIA. Ver detalles en el texto.

Las líneas continuas (—) corresponden a ratones de 1 mes; las discontinuas (---) a ratones de 1 año y las líneas continuas punteadas (-.-.) a ratones de 4 meses.

Dosis de desafío: (□) SS; (□) 1×10^6 levaduras/ml; (○) 1×10^8 levaduras/ml; (⊙) 1×10^9 levaduras/ml; (Δ) 4×10^8 levaduras/ml; (Δ) 1×10^9 levaduras/ml.

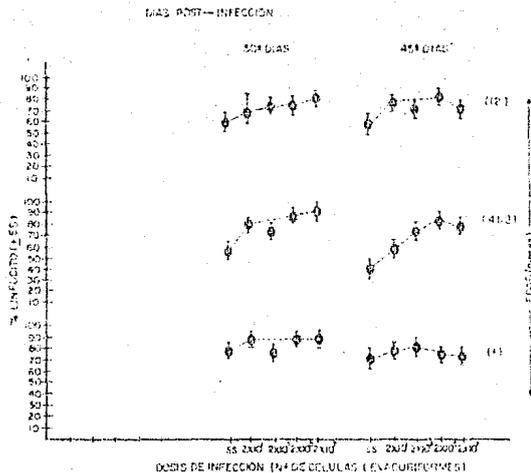


FIGURA 10.- DETERMINACIÓN DEL PORCIENTO DE LINFOCITOS EN RATONES BALB/C INFECTADOS CON - - - *Histoplasma capsulatum*. Los linfocitos fueron estimados por cuenta diferencial de las células blancas de sangre periférica usando la tinción de - - Wright. Cada punto fué calculado con 5 animales. + ES error estandard; SS= solución salina.

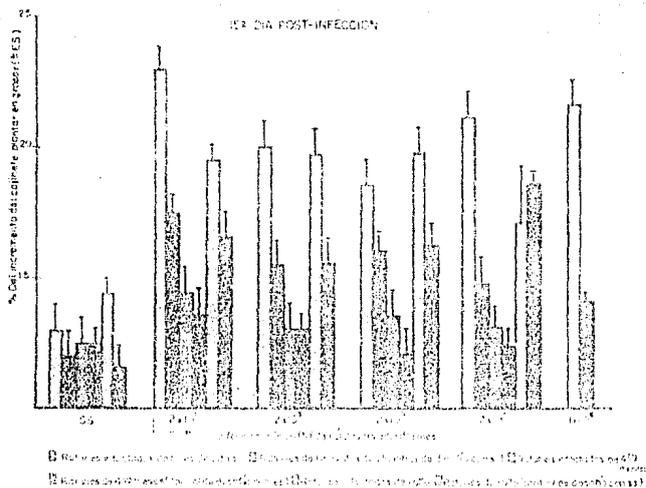


FIGURA 11.- PRUEBA DE HINCHAZÓN DEL COJINETE PLANTAR A LOS 15 DÍAS POST-INFECCIÓN EN RATONES INFECTADOS CON *Histoplasma capsulatum*. Las condiciones de la prueba vienen descritas en material y métodos.

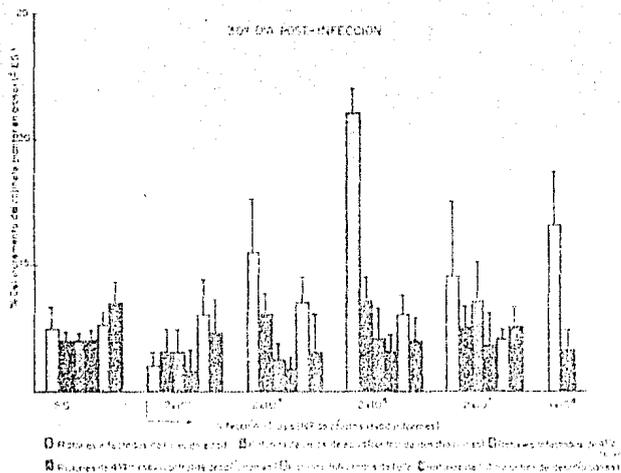


FIG. 12.- PRUEBA DE HINCHAZÓN DEL COJINETE PLANTAR A LOS 30 DÍAS POST-INFECCIÓN EN RATONES INFECTADOS CON *Histoplasma capsulatum*. Las condiciones de la prueba vienen descritas en material y método.

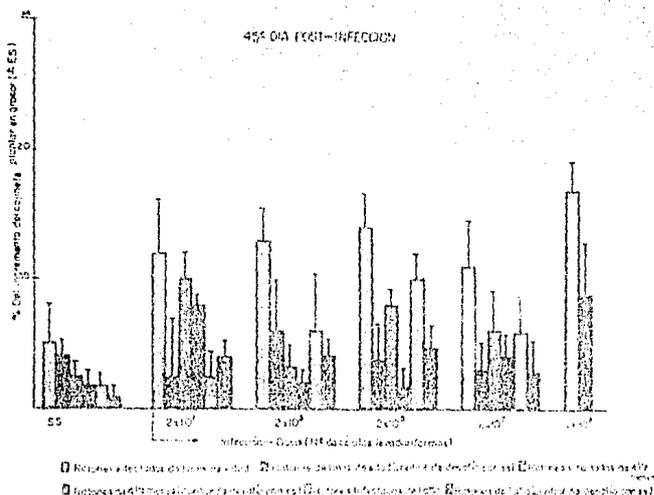


FIGURA 13.- PRUEBA DE HINCHAZÓN DEL COJINETE PLANTAR A LOS 45 DÍAS POST-INFECCIÓN EN RATONES INFECTADOS CON *Histoplasma capsulatum*. Las condiciones de la prueba vienen descritas en material y método.

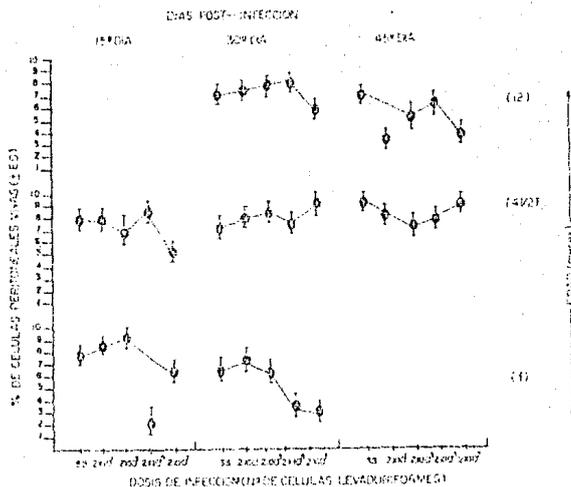


FIGURA 14.- VIABILIDAD DE CÉLULAS PERITONEALES EN RATONES BALB/C INFECTADOS CON *Histoplasma capsulatum*. La viabilidad de las células fué determinada por la técnica de exclusión con azul de tripano. Nº total de animales por cada punto, N= 5; + ES= error estandard; SS= solución salina.

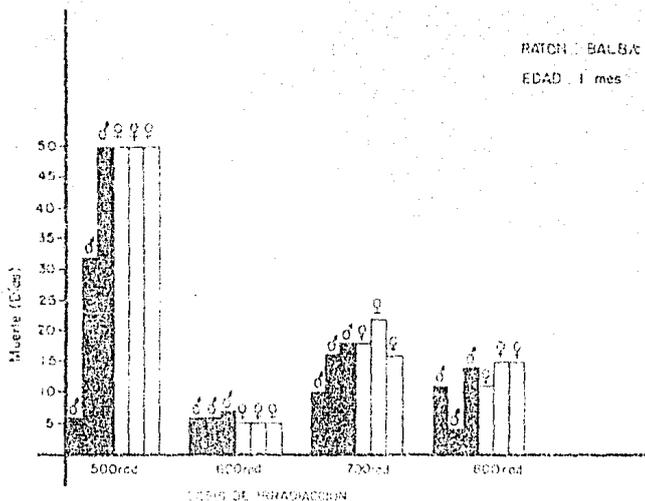


FIGURA 15.- CINÉTICA DE IRRADIACIÓN EN RATONES BALB/C HEMBRAS Y MACHOS DE 1 MES DE EDAD. Se utilizó un aparato de irradiación de Atomic Energy - Canada Limited (Bomba de Cobalto Theratron 765). Las condiciones de irradiación vienen descritas - en la Tabla 1.



FIGURA 16.- CINÉTICA DE IRRADIACIÓN EN RATONES BALB/C HEMBRAS Y MACHOS DE 4½ MESES DE EDAD. Las condiciones de irradiación vienen descritas en la Tabla 1.

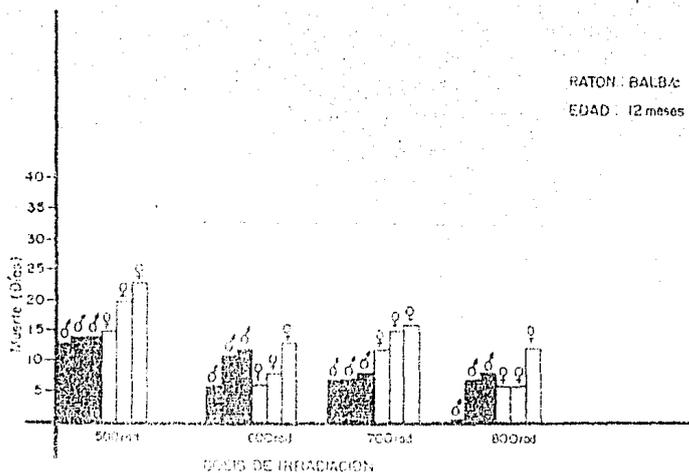


FIGURA 17.- CINÉTICA DE IRRADIACIÓN EN RATONES BALB/C HEMBRAS Y MACHOS DE 12 MESES DE EDAD, Las condiciones de irradiación vienen descritas en la Tabla 1.

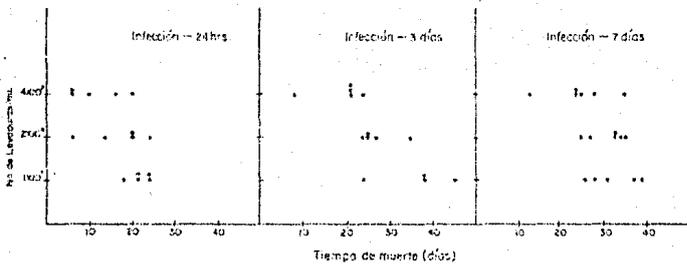


FIGURA 18.- CINÉTICA DE INFECCIÓN POST-TRANSFERENCIA DE CÉLULAS. Ratonos receptores singénicos BALB/c machos de 4½ meses recibieron células donadoras -- singénicas de ratones machos de 1 mes post-irradiación. La dosis de irradiación fué de 700 rads. La infección con el hongo se llevó a cabo a las 24 -- hrs. 3 y 7 días post-transferencia adoptiva. Se utilizó la cepa de *H. capsulatum* Nº 5037 en su fase levaduriforme. La vía de inoculación fué intra peritoneal. Para cada dosis del hongo se usaron -- de 5-7 ratones.

TABLA 1. CONDICIONES DE IRRADIACION.

RADS (R)	500	600	700	800
Campo	10 x 10 cm	10 x 10 cm	10 x 10 cm	10 x 10 cm
Profundidad	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm
Distancia	65 cm	65 cm	65 cm	65 cm
Rendimiento	53.57 rad/min	52.425 rad/min	53.57 rad/min	53.57 rad/min
Tiempo	10.12 min	12 min	14.05 min	16.05 min
Superficie (cm ²)	533.50	569	753	860

Se llevó a cabo en una aparato de terapia: Atomic Energy of Canada Limited (Bomba Cobalto Theratron 765, Pastilla (cantidad cobalto) de Co⁵⁰-3400 Ci).

TABLA 2.- EFICIENCIA DE TRANSFERENCIA DE CELULAS EN ANIMALES IRRADIADOS. CINETICA DE DOSIS DE CELULAS Y TIEMPO DE TRANSFERENCIA.

GRUPOS DE RATONES RECEPTORES (IRRADIADOS)	TRANSFERENCIA DE CELULAS DE RATONES DE 1 MES DE EDAD		TRANSFERENCIA DE CELULAS DE RATONES DE 4 1/2 MESES DE EDAD		% DE SOBREVIVENCIA TRANSFERENCIA A LAS 3 HRS.	% DE SOBREVIVENCIA TRANSFERENCIA A LAS 24 HRS.
	Médula Ósea	Bazo	Médula Ósea	Bazo		
1	1×10^6	5×10^5			↓ 100 ↑	↓ 100 ↑
2	1×10^6	5×10^7				
3	1×10^7	5×10^6				
4	1×10^7	5×10^7				
5	2×10^7	5×10^6				
6	2×10^7	5×10^7				
7			1×10^6	5×10^6		
8			1×10^6	5×10^7		
9			1×10^7	5×10^6		
10			1×10^7	5×10^7		
11			2×10^7	5×10^5		
12			2×10^7	5×10^7		
13	-	-	-	-		

Se utilizaron ratones machos singénicos. La dosis de irradiación fué de 700 radas. Las células donadoras se transfirieron en un volumen de 0.3 ml en SBS por vía retroorbital. Los animales se mantuvieron en observación durante un período de 2 meses. Cada grupo comprendió un número total de 5 ratones. El grupo 13 corresponde al control de irradiación, estos animales murieron en un período de tiempo de 5 a 12 días.

57
 TABLA 3.- TRANSFERENCIA ADOPTIVA Y CAMBIOS EN LA RESISTENCIA A LA INFECCION HISTOPLASMOSICA.

GRUPO DE ANIMALES	DONADORES EDAD (POBLACION CELULAR) BALB/C	IRRADIACION TRATAMIENTO (EDAD)	RECEPTORES SINGENICOS					
			INFECCION NÚMERO DE MUERTOS			NO INFECCION NÚMERO DE MUERTOS		
			EXPERIMENTO			EXPERIMENTO		
			1	2	3	1	2	3
I	1 MES (MEDULA OSEA Y BAZO)	SI (4½)	5(9)*	7(9)	7(9)	0(9)	0(9)	0(10)
II	1 MES (BAZO)	NO (4½)	3(9)	4(10)	4(10)	2(9)	2(9)	0(10)
III	4½ MESES (MEDULA OSEA Y BAZO)	SI (4½)	NR**	1(9)	0(10)	NR	0(10)	0(10)
IV	4½ MESES (BAZO)	NO (4½)	2(9)	0(10)	0(10)	0(9)	0(9)	0(9)
V	NINGUNA	NO (4½)	0(9)	2(9)	0(10)			
VI	NINGUNA	NO (1)	7(8)	9(10)	7(9)			
VII	NINGUNA	SI (4½)				9(9)	9(9)	9(9)

Animales-ratones singénicos BALB/c, machos. Transferencia a las 24 horas post-irradiación. Dosis de células donado ras: 1×10^7 células/0.5 ml de células de médula ósea en SSB y 5×10^7 células/0.5 ml de células de bazo en SSB. Estas células fueron transferidas por inoculación retroorbital. Dosis de irradiación 700 rad. La infección con levaduras de *Histoplasma* cepa Nº 5037 fue hecha una semana post-irradiación. La dosis de infección fue de 4×10^8 células/ml (Dosis letal). (*) Los paréntesis contienen el número total de cada grupo de animales. (**) NR= no realizado.

TABLA 4.- SIGNOS DE LA INFECCION HISTOPLASMOSICA EN RATONES BALB/c.

GRUPOS DE RATONES INFECTADOS	DÍAS DE OBSERVACION	I N F E C C I O N												
		PÉRDIDA DE PESO EXPERIMENTO			INNOVILIDAD EXPERIMENTO			PELOS ERIZADOS EXPERIMENTO			MUERTE EXPERIMENTO			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
I	30	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	5	5	4
	60	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	0	2	4
II	30	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3	4	4
	60	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	-	-	-
III	30	NR	+	+	NR	+	+	NR	+	+	NR	NR	1	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	30	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	2	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	30	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
VI	30	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	4	5	6	
	60	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3	4	2	

Los ratones fueron observados diariamente y la intensidad de los signos se expresan por las siguientes indicaciones: 3+ muy intenso; 2+ intenso; + ligero; - no signo; NR= no realizado.

TABLA 5.- AISLAMIENTO DE *Histoplasma capsulatum* EN BAZO, HIGADO Y PULMON DE RATONES INFECTADOS.

GRUPOS DE RATONES INFECTADOS	C U L T I V O S		
	EXPT. 1	EXPT. 2	EXPT. 3
I	5 (5)	7 (7)	7 (7)
II	3 (3)	4 (4)	4 (4)
III	NR	0 (1)	0
IV	1 (2)	0	0
V	0	1 (2)	0
VI	7 (7)	7 (9)	6 (7)

El homogenizado de cada órgano fué cultivado en Mycobiotic y BHI con 0.1% de L-cisteína y 1% de glucosa. Los cultivos permanecieron en observación en un período máximo de 30 días. Especificaciones de los grupos de ratones infectados están descritas en la Tabla 3. Paréntesis: () número de animales muertos de cada grupo.

Expt. = experimento; NR= no realizado.

TABLA 6.- TRANSFERENCIA DE CELULAS ADHERENTES Y NO ADHERENTES.

DONADORES (POBLACIÓN CELULAR)	RECEPTORES	INFECCIÓN	PÉRDIDA PESO			INMOVILIDAD			PELOS ERIZADOS			M U E R T E		
			D I A S			D I A S			D I A S			D I A S		
			10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
1 mes, cels. adherentes	4½ meses	NO	1X	-	-	1X	-	-	1X	-	-	-	-	-
1 mes, cels. de bazo totales	4½ meses	NO	-	1X	-	-	1X	-	1X	2X	-	-	2(5)	-
1 mes, cels. no adherentes	4½ meses	NO	-	1X	-	-	1X	-	-	1X	-	-	-	-
1 mes, cels. irradiadas 800 rads	4½ meses	NO	1X	1X	-	2X	2X	-	1X	2X	-	-	-	-
4 meses, cels. de bazo totales	4½ meses	NO	-	-	-	-	-	-	1X	-	-	-	1(5)	-
1 mes, cels. adherentes	4½ meses	SI	2X	-	-	2X	-	-	2X	-	-	-	5(5)	-
1 mes, cels. de bazo totales	4½ meses	SI	2X	-	-	2X	-	-	2X	-	-	-	5(5)	-
1 mes, cels. no adherentes	4½ meses	SI	1X	3X	-	1X	3X	-	2X	3X	-	-	5(5)	-
1 mes, cels. irradiadas 800 rads	4½ meses	SI	2X	2X	-	2X	3X	-	2X	3X	-	-	5(5)	-
4½ meses, cels. de bazo totales	4½ meses	SI	1X	2X	-	2X	3X	-	1X	3X	-	-	2(5)	-
4½ meses, control de infección		SI	1X	3X	-	1X	3X	-	1X	3X	-	-	-	-
1 mes, control de infección		SI	1X	2X	-	1X	2X	-	1X	3X	-	-	5(5)	-
1 mes, control de irradiación 800 rads			3X	-	-	3X	-	-	3X	-	-	-	3(3)	-

ANIMALES.- Se utilizaron grupos de 5 ratones singénicos BALB/c, machos. Dosis de células donadoras: 1×10^7 cels/0.3 ml de células adherentes y 1×10^7 células no adherentes; 5×10^7 cels/ml de células de bazo totales. La infección fue realizada una semana después de la transferencia con levaduras de *Platoplasma* de la cepa R² 5037, a una dosis letal.

Los ratones fueron observados diariamente y la intensidad de los signos se expresan por las siguientes indicaciones: 3X muy intenso; 2X intenso; X ligero; - no signo. La expresión de los signos coincide a una observación arbitraria de la intensidad del signo predominante en cada grupo completo de animales (5 ratones por grupo).

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 7.- TRANSFERENCIA DE CELULAS ADHERENTES Y NO ADHERENTES EN RATONES INFECTADOS CON DOSIS SUB-
LEATAL DE *Histoplasma*.

DONADORES POBLACION (CELULAR)	RECEPTORES	INFECCION	P E R D I D A P E S O			I N M O V I L I D A D			P E L O S E R I Z A D O S			M U E R T E		
			D I A S			D I A S			D I A S			D I A S		
			10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
1 mes, células adheren- tes	4½ meses	NO	-	-	1X	-	-	-	-	-	1X	-	-	1X
1 mes, células de bazo totales	4½ meses	NO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 mes células no adhe- rentes	4½ meses	NO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 mes células irradiada- das 800 rads	4½ meses	NO	-	1X	2X	-	1X	2X	-	1X	2X	-	-	-
4 meses, células de ba- zo totales	4½ meses	NO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 mes, células adheren- tes	4½ meses	SI	2X	-	-	3X	-	-	3X	-	-	5(5) - -		
1 mes, células de bazo totales	4½ meses	SI	2X	2X	3X	1X	1X	1X	2X	2X	3X	-	-	-
1 mes, células no adhe- rentes	4½ meses	SI	1X	2X	1X	1X	2X	1X	2X	1X	1X	-	-	-
1 mes, células irradiada- das 800 rads	4½ meses	SI	2X	3X	-	1X	2X	-	2X	3X	-	2(5) 3(5) -		
4½ meses, células de - bazo totales	4½ meses	SI	-	1X	-	-	1X	-	-	1X	-	-	-	-
4½ meses, control de infección		SI	1X	-	-	1X	-	-	1X	-	-	-	-	-
1 mes, control de in- fección		SI	1X	2X	1X	1X	2X	1X	1X	2X	1X	-	-	-
1 mes, control de irra- diación 800 rads			3X	-	-	3X	-	-	3X	-	-	5(5)	-	-

ANIMALES.- Véase la leyenda en la Tabla 6. En este caso la dosis infectante fué una dosis subletal para ratones de 1 mes.