



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**“CARACTERIZACION DE POBLACIONES CELULARES SUPRESORAS
PRESENTES EN BAZO DE RATONES BALB/C MACHOS MENORES
DE UN MES, COMPROMETIDAS CON LA SUSCEPTIBILIDAD HACIA
LA INFECCION HISTOPLASMOA”**

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

Martha Patricia García Camacho

México, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
OBJETIVOS	8
HIPOTESIS	8
MATERIALES Y METODOS	9
Animales	9
Microorganismo	9
Medios de cultivo y soluciones	9
Tinción de células	13
Preparación del suero anti-células adherentes	13
Obtención de poblaciones celulares de base	15
Experimentos de transferencia de diferentes poblaciones celulares	17
RESULTADOS	20
Caracterización y viabilidad de células por las tinciones de esterasa no específica, Wright y azul de tripano	20
Titulación del suero anti-células adherentes por las técnicas de aglutinación y ELISA	21
Experimentos de transferencia de diferentes poblaciones celulares	21
DISCUSION	26
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFIA	31

INDICE DE FIGURAS

1. ESQUEMA DE TRANSFERENCIA 38

2. RESISTENCIA DE RATONES MACHOS BALB/C A LA INFECCION
HISTOPLASMOSA POR LA TRANSFERENCIA DE CELULAS DE BA
ZO (EXP No 1 Y No 2) 39

3. RESISTENCIA DE RATONES MACHOS BALB/C A LA INFECCION
HISTOPLASMOSA POR LA TRANSFERENCIA DE CELULAS DE BA
ZO (EXP No 3 Y No 4) 40

INDICE DE CUADROS

1. CARACTERIZACION Y VIABILIDAD DE CELULAS POR LAS TINCIONES DE ESTERASA NO ESPECIFICA, WRIGHT Y AZUL DE TRIPANO	41
2. TITULACION DEL SUERO ANTI-CELULAS ADHERENTES POR LAS TECNICAS DE AGLUTINACION Y ELISA	42
3. TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CELULAS ADHERENTES Y NO ADHERENTES DE BAZO CON 3 HRS DE INCUBACION EN RELACION CON LA RESISTENCIA A LA INFECCION HISTOPLASMOSA (EXP No 1 Y No 2)	43
4. DETECCION DE SIGNOS EN LOS RATONES BALB/C INFECTADOS CON <u>Histoplasma capsulatum</u> (EXP No 1)	44
5. DETECCION DE SIGNOS EN LOS RATONES BALB/C INFECTADOS CON <u>Histoplasma capsulatum</u> (EXP No 2)	45
6. TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CELULAS ADHERENTES Y NO ADHERENTES DE BAZO CON 48 HRS DE INCUBACION Y DE CELULAS TRATADAS CON SUERO ANTI-CELULAS ADHERENTES Y ANTI-THETA EN RELACION CON LA RESISTENCIA A LA INFECCION HISTOPLASMOSA (EXP No 3)	46
7. DETECCION DE SIGNOS EN LOS RATONES BALB/C INFECTADOS CON <u>Histoplasma capsulatum</u> (EXP No 3)	47
8. TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CELULAS ADHERENTES Y NO ADHERENTES DE BAZO CON 48 HRS DE INCUBACION Y DE CELULAS TRATADAS CON SUERO ANTI-CELULAS ADHERENTES Y ANTI-THETA EN RELACION CON LA RESISTENCIA A LA INFECCION HISTOPLASMOSA (EXP No 4)	48
9. DETECCION DE SIGNOS EN LOS RATONES BALB/C INFECTADOS CON <u>Histoplasma capsulatum</u> (EXP No 4)	49

RESUMEN

Es posible que factores como la edad y el sexo entre otros, influyan en la resistencia del individuo a la infección. En el laboratorio se ha observado que ratones singénicos Balb/c de 4 1/2 meses de edad presentan una marcada resistencia a la infección con Histoplasma capsulatum en comparación con los ratones de 1 mes y 1 año de edad. - En todos los grupos donde se estudió el sexo y la edad, los ratones machos muy jóvenes (1 mes) presentaron el curso más drástico a la infección histoplasmosa, lo que sugiere una mayor predisposición a la enfermedad (posiblemente un estado supresivo previo a la infección). La transferencia adoptiva de células de bazo procedentes de ratones machos de 1 mes de edad a receptores machos de 4 1/2 meses de edad - (con o sin irradiación) alteró la resistencia a la infección en los ratones receptores.

Aparentemente el estado supresivo transferido por las células de bazo de ratones de 1 mes de edad involucra a dos tipos de poblaciones celulares : células adherentes y no adherentes. Para lograr una mejor caracterización de estas células, se obtuvieron poblaciones de mayor pureza incrementando el tiempo de incubación que permite la adherencia al vidrio y utilizando antisueros en contra de células adherentes y receptores Thy 1 de células T.

INTRODUCCION

La histoplasmosis es una enfermedad causada por el hongo Histoplasma capsulatum, que es un organismo dimórfico que existe en forma micelial en la naturaleza y en forma parásita como levadura intracelular que ataca preferencialmente a las células del sistema retículo endotelial en humanos y animales susceptibles. El hongo se ha asociado al guano de los murciélagos y a las deyecciones de aves como gallinas y pollos, en suelos de cuevas, cavernas, minas o sótanos. En México la presencia del guano del murciélago tiene un papel de gran importancia en las infecciones por Histoplasma capsulatum (1). La enfermedad es adquirida al inhalar las esporas de la fase saprobia, que son diseminadas por todo el parénquima pulmonar y al parecer al ser capturadas por los macrófagos, se transforman en la fase parasitaria que es la levadura (2). La fase levaduriforme del hongo se observa en cultivos enriquecidos mantenidos a 37°C y en tejidos del huésped. La enfermedad puede presentar tres variedades según González Ochoa (3): la fase primaria generalmente asintomática, la fase residual de la fase primaria, que puede presentar un curso moderado o crónico y la reinfección endógena que la mayoría de las veces es fatal.

La respuesta inmune presenta básicamente dos tipos de mecanismos efectores: 1) Los de la inmunidad humoral, mediada por anticuerpos que son sintetizados por los linfocitos B y 2) Los de la inmunidad celular, mediada por los linfocitos T con sus diferentes subpoblaciones, que junto con los macrófagos se caracterizan por la gran cantidad de actividades biológicas realizadas a través de diferentes productos celulares como las linfoquinas y las interleucinas. La respuesta inmune celular es muy importante en la defensa del huésped en contra de las infecciones intracelulares y la histoplasmosis provee un modelo de estudio muy interesante de esta respuesta (4-9). Durante las primeras semanas después de la exposición al hongo, empiezan a desarrollarse los mecanismos involucrados en una respuesta inmune celular, cuyo éxito depende, por supuesto de la interacción coordinada y-

acertada de todos los factores comprometidos en la respuesta inmune general del individuo. Normalmente el huésped es capaz de resolver la infección y eliminar al hongo, pero si existen alteraciones en los mecanismos de inmunidad celular, las levaduras proliferan dentro de los macrófagos, resultando una histoplasmosis diseminada, con órganos reticuloendoteliales difusamente crecidos, como el hígado, bazo y ganglios linfáticos (2). Bullock y colaboradores han realizado estudios sobre fenómenos inmunosupresivos generados por la infección histoplasmosa, que podrían explicar el curso severo de la enfermedad. Esto también se ha reportado en procesos infecciosos causados por parásitos como: Mycobacterium leprae, M. tuberculosis, Toxoplasma gondii, Plasmodium chabaudi, Trypanosoma rhodesense y T. cruzi (10-17).

Así como es desarrollado este tipo de inmunosupresión por la presencia del hongo, son interesantes las observaciones de que existen individuos aparentemente normales que son más susceptibles a la histoplasmosis, probablemente debido a estados supresivos naturales o tal vez circunstanciales que se encuentran presentes previamente al proceso infeccioso, principalmente en aquellos individuos que desarrollan la infección violenta y que clínicamente no se le han detectado fallas en su sistema inmunitario, ni han estado bajo ningún tipo de terapia inmunosupresora. 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 y estados supresivos ocasionales y/o naturales del huésped, podrían estar relacionados con la facilitación de la infección misma, así como también pueden deberse a factores genéticos, hormonales, estados nutricionales deficientes, fatiga, stress, grupos sanguíneos, el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), sexo y edad. Con respecto al factor sexo, se ha observado en la infección histoplasmosa, que los individuos del sexo masculino adquieren la infección con mayor frecuencia que los individuos del sexo femenino. Anteriormente este hecho era atribuido al factor ocupacional, puesto que los hombres se encuentran en mayor contacto con los sitios de infección, sin embargo, actualmente se han evidenciado estados de susceptibilidad dependientes del factor sexo.

Se ha observado que individuos de ambos sexos aparentemente normales, expuestos al hongo Histoplasma capsulatum bajo idénticas condiciones, tienen diferentes cursos clínicos de la enfermedad, siendo los individuos del sexo femenino más resistentes a la infección. Con respecto a los cambios en la respuesta inmune en relación con el sexo existe muy poca información, aunque se ha reportado que el sexo femenino en comparación con el sexo masculino presenta mayor resistencia a las infecciones (18-19).

Así como se han realizado las observaciones anteriores con respecto al factor sexo, también existe información relacionada con respecto al factor edad. Cheney, K.E. (20) y colaboradores han recopilado información sobre la disminución de la respuesta inmune al avanzar la edad, y esta es asociada con el gran incremento de manifestaciones autoinmunes en la vejez. La respuesta de anticuerpos de ratones viejos hacia eritrocitos de carnero (que es una respuesta T-dependiente) es menor en comparación con la respuesta de ratones jóvenes, al igual que el número de células formadoras de anticuerpos (células B), y la respuesta de linfocitos mixtos que representa a la fase de reconocimiento de la respuesta inmune celular. En la vejez existe mayor incidencia de infecciones debido a que la respuesta inmune celular disminuye (21). La respuesta de linfocitos mixtos de ratones hembras viejos de la cepa C57BL/GJ, disminuye en comparación con la respuesta de los ratones jóvenes, relacionándose este fenómeno con la alta incidencia de neoplasias espontáneas que presentan las cepas de ratones con un período de vida largo (22). Walford, R. L. (23), propone que algunos genes mutantes que controlan específicamente a los genes de histocompatibilidad, llegan a ser deprimidos al final de la etapa fértil, teniéndose como consecuencia una pérdida en el control de los mecanismos homeostáticos de autoreconocimiento. También existen trabajos donde se reporta un aumento de la actividad supresora de células T, con la consecuente disminución de la actividad de las células T ayudadoras y células B al avanzar la edad (24-27). Igualmente, se ha encontrado en diferentes cepas de ratones, una disminución en el número de células presentes en el timo, bazo y nódulos linfáticos conforme aumenta la edad (28-29). En experimentos con ratones —

AKR/J, se ha realizado la transferencia adoptiva de células de bazo - provenientes de ratones viejos a ratones jóvenes, y se ha observado - que después de la transferencia estos desarrollan una respuesta inmu- ne deficiente (30). La producción de Interleucina-2 (IL-2), se - reduce al 42% en células de bazo y nódulos linfáticos de ratones vie- jos de la cepa BALB/c y C57BG/6, en comparación con los ratones jóve- nes, probablemente debido a la disminución de la actividad de las cé- lulas T y las células adherentes (31). Guillis, S. (32) y col., - también encontraron que los linfocitos de personas de edad avanzada - producen menor cantidad de IL-2, a comparación de los linfocitos de - individuos jóvenes .

Por otra parte, es bien conocido el hecho de que al nacimiento - los individuos presentan una competencia inmunológica limitada (33 - 39), y también existe una gran susceptibilidad hacia las infecciones que puede deberse a la falta de madurez inmunológica o a la inefica - cia de las células inmunocompetentes para realizar sus funciones nor- males. La respuesta de anticuerpos hacia un estímulo antigénico no - se origina en el ratón, solo hasta después de dos semanas del naci - miento (33-35). Los linfocitos T y B aparecen en el bazo de los ra - tones alrededor del quinceavo y dieciseisavo día de gestación, siendo al principio las células T más numerosas que las B, pero después del - nacimiento las células B incrementan más rápidamente (33). A pesar de que en los últimos estados de gestación ya se encuentran presentes células progenitoras de macrófagos y linfocitos, existe un lapso des - pués del nacimiento en donde la falta de respuesta inmune es evidente; sugiriéndose así la inmadurez funcional de las células linfocíticas y los macrófagos, o la supresión llevada a cabo directamente por célu - las o factores solubles (36). La actividad inmunológica de las cé - lulas B se desarrolla mucho más rápido que la actividad de las célu - las T en los recién nacidos; esto se demuestra porque la respuesta de de células de bazo de ratones recién nacidos hacia antígenos timo-in- dependientes aparece primero que la respuesta hacia antígenos timo-dg - pendientes, probablemente debido a la existencia de un gran número de células T supresoras (35), que Mosier y Cohen (37) también han en - contrado presentes en el bazo de ratones neonatos, analizando la -

respuesta hacia eritrocitos, encontrando que esta no se presenta aún cuando las células de los neonatos se reconstituyan con células T procedentes de ratones adultos.

La falta de reactividad inmunológica de los ratones recién nacidos también compromete a la población adherente o células tipo macrófago, sugiriéndose así, que en el recién nacido no existen macrófagos funcionales (38), es decir, que no están lo suficientemente maduros para participar en las respuestas inmunológicas. También en especies como la rata, se ha reportado la existencia de células adherentes y no adherentes de bajo que inhiben la respuesta blastogénica de esplenocitos hacia mitógenos (40).

Tomando en cuenta la información anteriormente mencionada, Reyes-Montes (41), realizó estudios con los factores de susceptibilidad como el sexo y la edad, utilizando un modelo murino de la cepa singénica Balb/c y un modelo infeccioso con el parásito intracelular Histoplasma capsulatum. Trabajando con animales de ambos sexos y tres edades diferentes (1 mes, 4 1/2 meses y 1 año), e infectando con dos cepas distintas de H. capsulatum (la 5037 y la León Pérez), observó que los ratones de 4 1/2 meses de edad presentaban una marcada resistencia a la infección, puesto que necesitaban una dosis letal 50 (DL 50) mayor, y además mostraban un alto porcentaje de supervivencia en comparación con los ratones de un mes y un año de edad. En todos los experimentos realizados, las hembras siempre fueron más resistentes. En cuanto a la respuesta inmune celular, se encontró un aumento en el número de linfocitos en los ratones capaces de resistir la enfermedad (4 1/2 meses), en cambio en los ratones susceptibles de 1 mes y 1 año no se presentó este fenómeno; mostrándose así, que al existir una resistencia hacia la infección, la respuesta inmune está demandando células para participar en la defensa. Otro parámetro que se estudió fue el porcentaje de viabilidad de las células peritoneales, que también fue mayor en los animales de 4 1/2 meses, tal vez debido a una mejor defensa local, puesto que la inoculación del hongo se realizó intraperitonealmente. De todos los grupos de edad y sexo estudiados, los ratones machos muy jóvenes o muy viejos no resolvieron favorablemente la infección, lo que sugiere una predisposición mayor debida a un estado-

supresivo previo a la infección. Ya que el bazo es uno de los órganos fundamentales en las etapas primordiales de desarrollo de la defensa - en contra de Histoplasma capsulatum, se trató de establecer si el estado supresivo se debía a alguna población celular de este órgano. Se realizó la transferencia de células de bazo y de médula ósea provenientes de ratones machos susceptibles (1 mes), a ratones machos resistentes (4 1/2 meses) sometidos a irradiación y se observó que los animales murieron cuando se le infectó con una dosis letal (DL 100) para ratones de 1 mes. Este mismo fenómeno sucedió con ratones de 4 1/2 meses no irradiados que solamente recibieron células de bazo de ratones de 1 mes, indicando que el estado supresivo era transferido y alteraba la resistencia a la infección en los ratones adultos receptores.

Se han reportado trabajos semejantes, realizados "in vivo" e "in vitro", en los que se demuestra la supresión de la respuesta humoral - por células de bazo, pero la respuesta celular aún no ha sido bien estudiada. El desarrollo de una respuesta inmune hacia eritrocitos heterólogos, utilizando células de bazo de ratones CBA recién nacidos, demostró ser deficiente debido a la presencia de una población celular no - adherente enriquecida con linfocitos (34). Por el contrario, Landahl, G. A. encontró un abatimiento o supresión de la respuesta in vitro hacia eritrocitos de células de bazo provenientes de ratones adultos, - cuando se sustituyeron las células adherentes de adultos por células de recién nacidos. En experimentos "in vivo", se ha observado el fenómeno inverso; al transferir macrófagos peritoneales de ratones adultos a ratones recién nacidos se obtiene un aumento de la respuesta hacia eritrocitos (38), y una mayor protección a la infección por Herpes (39). - Igualmente se han transferido macrófagos de ratones neonatos a recipientes irradiados adultos, dando como resultado una no reconstitución de - la reactividad inmunológica hacia Shigella, al contrario de lo que sucede cuando se transfieren macrófagos de ratones adultos (42).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La adquisición de un estado supresivo inmunológico en los ratones adultos de 4 1/2 meses, debido a la transferencia adoptiva de células de bazo de ratones recién nacidos de 1 mes, generó el interés de caracterizar que tipos de células presentes en el bazo de ratones recién nacidos están involucradas en la susceptibilidad hacia la infección histoplasmosa. Estas células pueden ser células adherentes tipo macrófago y/o células no adherentes del tipo de linfocitos T, puesto que son las células que participan con mayor actividad en el montaje de una respuesta inmune celular en contra del hongo Histoplasma capsulatum.

OBJETIVOS

- 1.- Obtener material biológico y estandarizar técnicas para la selección de diferentes poblaciones de células de bazo de ratón.
- 2.- Realizar la transferencia de células adherentes y no adherentes provenientes del bazo de ratones menores de un mes a ratones adultos de 4 1/2 meses.
- 3.- Observar el efecto "in vivo" de cada una de las poblaciones celulares, en la susceptibilidad hacia la histoplasmosis, por medio de los parámetros de muerte y desarrollo de signos de la enfermedad en los ratones.
- 4.- Caracterizar las poblaciones celulares presentes en el bazo de ratones recién nacidos responsables de la inmunosupresión previa al proceso infeccioso.

HIPOTESIS

Poblaciones celulares adherentes y no adherentes del bazo de ratones machos Balb/c menores de un mes, participan en el estado inmunosupresivo presente en el recién nacido, influyendo sobre la susceptibilidad a la infección por Histoplasma capsulatum, siendo capaces de transferir este estado a ratones adultos resistentes a la infección.

MATERIALES Y METODOS

Animales

En el trabajo experimental se utilizaron ratones machos Balb/c de la cepa singénica de dos edades diferentes: 4 1/2 meses (adultos) y un mes (jóvenes) de edad. Los ratones fueron mantenidos por cruzamiento cerrado y alimentados con Purina (Purina de México, S. A. de C. V.) y agua "ad libitum". La singenicidad fue comprobada por trasplantes de piel y cultivos mixtos de linfocitos (43). También se utilizaron conejos de Nueva Zelanda de ambos sexos de 3-4 kg.

Microorganismo

Se utilizó la cepa de Histoplasma capsulatum No. 5037, procedente del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET) México, proporcionada por el Dr. Oscar Velasco Castrejón. El hongo fue aislado de un caso humano y conservado en su fase micelial en el laboratorio, por cultivos a temperatura ambiente en medio Mycobiotic agar. La conversión a la fase levaduriforme se realizó por medio de cultivos semanales en infusión cerebro corazón (NHI agar), adicionada de 1% de Glucosa y 0.1% de L-cisteína hidrociorada, incubados a 37°C. Para obtener el inóculo infectante, el hongo fue cosechado y disgregado en forma estéril en un mortero para separar la masa celular, y se lavó en solución estéril mediante centrifugación por 10 min a 2000 rpm, hasta eliminar los restos del agar. Por último se ajustó la cantidad necesaria de levaduras por turbidimetría en un fotocolorímetro Klett Summerson con un filtro de 400-450 nm, usando una curva estandar (41).

Medios de cultivo y soluciones

1. Mycobiotic agar (Difco) para la conservación del hongo.
2. NHI (agar infusión cerebro-corazón) Difco, suplementado con glucosa al 1% y L-cisteína hidrociorada (Merck) al 0.1%, para la conservación de la fase levaduriforme del hongo.

3. RPMI-1640 (Gibco) en amortiguador HEPES (N-2 hidroxietil piperazina-N-2ácido etano sulfónico) 2.08 g/l, suplementado con glutamina y piruvato. El medio es adicionado con bicarbonato de sodio en una concentración de 2 g/l, 5 microgramos de gentamicina/ml y 1 microgramo de fungizona/ml. En el momento de su utilización se le añade suero fetal de ternera (Difco) al 20% descomplementado a 56°C por 30 minutos. Se ajusta el pH a 7.2.

4. Solución balanceada de sales (SBS).

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% - - - - - 2 ml.
Se afora a 1000 ml con agua destilada.

Solución II

Cloruro de calcio anhidro - - - - - 1.4g.
Cloruro de potasio - - - - - 4 g.
Cloruro de sodio - - - - - 80 g.
Cloruro de magnesio anhidro - - - - - 1.04 g.
Sulfato de magnesio 7 H₂O - - - - - 2 g.
Se afora a 1000 ml con agua destilada.

Mezcla de soluciones

Sol I - - - - - 100 ml.
Sol II - - - - - 100 ml.
Agua destilada c.b.p. - - - - - 1000 ml.
Se ajusta a pH 7.2 y se adicionan 50 microgramos/ml se gentamicina.

5. Solución fisiológica salina 0.83% en agua destilada.

6. Solución 0.01 M de EDTA (etilendinitrilotetracetato disódico $PM= 372.252$ g) en SBS, pH 7.

7. Azul de tripano.

A. Azul de tripano - - - - - 0.1 g
Agua destilada - - - - - 5 ml
Preparar el día de uso.
Sol. A - - - - - 0.1 ml
SBS - - - - - 1.9 ml.

8. Colorante de Wright (Sigma de México, S. A.)

Colorante en polvo - - - - - 0.2 g
Glicerina Q.P. - - - - - 3.0 ml
Metanol Q.P. - - - - - 97.0 ml

9. Bicarbonato de sodio al 5.8% en agua destilada.

10. Ácido clorhídrico 1N (HCl)

HCl (36%) - - - - - 0.9 ml
Agua destilada - - - - - 100 ml

11. Reactivos para ELISA

Solución de fosfatos salina (PBS).

Cloruro de sodio - - - - - 8.0 g
Cloruro de potasio - - - - - 0.2 g
Fosfato de sodio dibásico anhidro - 1.15 g
Fosfato de potasio monobásico - - - 0.2 g
Se afora a 1000 ml, de agua destilada.

12. PBS/Tween

Tween 20 - - - - - 0.5 ml
Asida de sodio - - - - - 0.2 ml
PBS - - - - - 1000ml

13. PBS / Tween - ASB. Añadir 2g de albúmina sérica bovina (ASB)
a 100 ml de PBS-Tween.

14. Solución de boratos salina

Acido bórico - - - - -	6.19 g
Borato de sodio - - - - -	9.54 g
Cloruro de sodio - - - - -	4.39 g
Agua destilada - - - - -	1000 ml

15. Sistema de sustrato de la fosfatasa alcalina.

Amortiguador del sustrato

Dietanol amina - - - - -	97 ml
Asida de sodio - - - - -	0.2 g
Cloruro de magnesio 6 H ₂ O - - - - -	1 g
Agua destilada - - - - -	800 ml

Se añade HCl 1N hasta ajustar el pH a 9.8. Se afora a - 1000 ml. Se mantiene a temperatura ambiente en botella - oscura. Se prepara la solución del sustrato inmediata- mente antes de usarla. El Sustrato (p-Nitro fenil fosfa to) viene en tabletas de 5 mg, mismas que se conservan -- a - 20°C en la oscuridad. Se disuelve una tableta (rom- piéndola) en 5 ml. del amortiguador del sustrato.

16. Glutaraldehido al 1%

17. Hidróxido de sodio 3 N (NaOH).

18. Preparación para esterasa no específica.

Naftol As-D cloro acetato - - - - -	0.0025 g
N-N metil formamida - - - - -	0.5 ml
Agua destilada - - - - -	12.5 ml
Tris buffer pH 7.1 0.2 M - - - - -	12.5 ml
Fast red (TR sal 4-cloro-o-teluidina) -	20-40 miligramos

Tinción de células

1.- Método de esterasa no específica (44) para la identificación-enzimática de macrófagos: a) Se fija en acetona fría al 100% durante 5 min. b) Se incuba con la preparación para esterasa anteriormente mencionada (ver soluciones) durante 20-30 min. c) Se lava con agua corriente. d) Se contrasta con hematoxilina durante 2 min. e) Se lava con agua a 37°C y se monta en glicerol-gelatina para observación al microscopio; 2.- Tinción de Wright: a) Se fija en metanol al 70%. b) Se incuba con el colorante Wright (ver soluciones) durante 5 min. c) Se agrega igual volumen de agua destilada permaneciendo así durante 2-min. d) Se lava con agua destilada y se monta en bálsamo de Canadá; 3.- Tinción de exclusión con azul de tripano: se prepara una dilución 1:20 con el colorante y las células en PBS (ver soluciones) y se observa inmediatamente al microscopio (las células vivas no toman el colorante).

La separación de la población celular adherente para las tinciones se realizó de la siguiente manera: se prepararon 15 tubos de vidrio de fondo plano de 7 cm de altura por 1 cm de diámetro, que contenían en el fondo una lenteja de vidrio de aproximadamente 0.8 cm de diámetro por 0.2 mm de espesor, y se agregó a cada uno 1×10^6 células peritoneales de ratones adultos o de bajo de ratones de 1 mes en 1 ml de RPMI con suero fetal de ternera al 20%. Las células adheridas se incubaron en una estufa con atmósfera de CO_2 al 5% y a 37°C; se fijaron a diferentes tiempos (2 y 4 días) y se les aplicaron las tinciones descritas.

Preparación del suero anti-células adherentes

a) Obtención de células adherentes peritoneales. Se obtuvieron células de exudados peritoneales de ratones machos Balb/c singénicos de 4-6 meses de edad, que tres días antes fueron estimulados intraperitonealmente con 2 ml de MJE estéril. El procedimiento se realizó en forma estéril y fue el siguiente: 1.- Se sacrificó al animal por sección medular después de sangrarlo a blanco de la yugular (para evitarlo más posible la contaminación por eritrocitos del exudado) 2.- El -

animal se fijó en una tabla de disección y se le realizó asepsia en el abdomen con alcohol al 70%. 3.- Se dejó al descubierto la cavidad peritoneal y se inyectó entre 10-20 ml de SBS. Se agitó un poco al animal. 4.- El fluido peritoneal se obtuvo con una pipeta Pasteur y se colocó en tubos estériles de tapón de rosca. 5.- Para lavar las células, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 1500 rpm de 3 a 5 veces hasta eliminar completamente el nujol. 6.- Después del último lavado se contaron las células viables en una cámara de Neubauer usando azul de tripano. Posteriormente las células se colocaron en cajas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro, suspendidas en 10 ml de RPMI con suero fetal de ternera al 20% y pH 7, a una concentración de aproximadamente 5×10^6 células por caja. Se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ durante 4 días, cambiando el medio de cultivo diariamente. Pasado ese tiempo se eliminó el sobrenadante, se lavaron en las cajas de Petri con SBS y se desprendieron del vidrio con ayuda de un frotador de goma, recolectándose en tubos y lavándose con SBS por centrifugación a 1500 rpm durante 10 min. Por último se ajustó la cantidad necesaria de células en SBS.

b) Inmunización. El suero anti-células adherentes se obtuvo siguiendo el esquema de inmunización según Unanue (45), que a continuación se describe: dos conejos fueron inyectados intramuscularmente en cinco ocasiones, durante cinco semanas, con 1.5×10^6 células adherentes peritoneales/0.25 ml de SBS en adyuvante incompleto de Freud. Tres días después de la última inoculación se sangraron los conejos para probar el título de anticuerpos utilizando la técnica de aglutinación en tubo y el análisis inmunoensimático ELISA para antígenos particulados. Los sueros se conservaron en alícuotas a -20°C.

c) Titulación. Para las pruebas de aglutinación en tubo se hicieron diluciones del antisuero en solución salina por duplicado; desde el suero concentrado hasta la dilución 1:32, en un volumen constante de 0.25 ml. Posteriormente a cada tubo se le agregó la cantidad de 1×10^6 células peritoneales de ratones adultos en un volumen de 0.25 ml de SBS o solución salina. Los tubos se incubaron en baño María a 37°C de 30 min a 1 hr. Finalmente se leyó el grado de aglutinación en cada tubo cualitativamente. El mismo procedimiento se realizó con controles de

siero normal de conejo.

El antisuero también fue probado por la técnica ELISA, utilizando la enzima fosfatasa alcalina. Se prepararon placas de microtitulación con células adherentes y no adherentes de bazo de ratones adultos machos, con cuatro días de incubación. El desarrollo de la técnica fue el siguiente: 1.- Se depositó en los pozos glutaraldehído al 0.1% (p/v) en borato salina (0.1 ml/poso). Las placas se dejaron incubar a temperatura ambiente 4 hrs, o a 4°C toda la noche. 2.- Se lavaron dos veces con NaCl al 0.83% (p/v). 3.- Se añadieron las células (antígeno particulado) a los pozos lavados libres de proteína en PBS (50-100 microlitros/poso). Se esperó más o menos 1 hr para que se asentaran las células. 4.- Se añadieron 100 microlitros/poso de glutaraldehído al 0.1% (p/v) en PBS, con cuidado para no perturbar la capa adherida al fondo; las placas se dejaron a temperatura ambiente durante 30 min. 5.- Se les quitó el sobrenadante. 6.- Se bloquearon los sitios que quedaron libres (para incorporar proteína) con la adición de PBS/Tween-BSA (0.2 ml/poso). Se les dejó 1 hr a temperatura ambiente. 7.- Se desechó la solución y se lavaron dos veces con PBS/Tween dejando en contacto con la placa 2 min para cada lavado. 8.- Se añadieron y se hicieron diluciones del antisuero con PBS/Tween (0.05-0.2 ml/poso). Las placas se incubaron 4 hrs a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. 9.- Se desechó el material y se lavaron las placas tres veces con PBS/Tween, dejando 2-3 min en contacto en cada lavado. 10.- Se añadieron 0.2 ml de una concentración adecuada del conjugado enzima anticuerpo contra inmunoglobulina G (IgG) de conejo, diluido el día de uso en PBS/Tween 1:10. Se dejaron 3 hrs a temperatura ambiente. 11.- Se lavaron tres veces con PBS/Tween permitiendo el contacto 2-3 min por lavado. 12.- Se añadió el sustrato recientemente preparado (0.2 ml/poso). 13.- Se esperó el tiempo suficiente para revelar la reacción. 14.- Se detuvo la reacción con NaOH 3M. 15.- La lectura fue cualitativa.

Obtención de poblaciones celulares de bazo

a) Células adherentes y no adherentes. La separación de células adherentes y no adherentes se realizó de acuerdo a la técnica de Mosier

(46). Los bazos de 30-50 ratones machos menores de un mes fueron extraídos en forma estéril y disgregados con ayuda de pinzas en medio SBS. - Después se colectó el medio y se colocó en tubos dejando reposar durante 10 min, para poder recolectar solo las células en suspensión que posteriormente se lavaron 3 veces con SBS por centrifugación durante 10 min, a 1500 rpm. Las células se cuantificaron en una cámara de Neubauer con la técnica de tinción por azul de tripano, y se ajustó la cantidad de 30×10^6 células/ml en RPMI con SFT al 20%, pH 7.

Las células fueron mantenidas en cultivo y distribuidas entre 10-15 cajas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro, cada una con un volumen de 10 ml de la suspensión de células en RPMI. La incubación se realizó en una atmósfera de CO_2 al 5%, a $37^\circ C$ durante 48 hrs, añadiendo a las primeras 24 hrs de cultivo 15 ml de RPMI con SFT al 20% fresco a cada caja. Una vez terminado el período de incubación, las células no adherentes fueron recogidas en el sobrenadante del medio de cultivo y se lavaron 3 veces con SBS centrifugando 10 min a 1500 rpm, ajustándose nuevamente en SBS la cantidad de células viables necesarias para los experimentos de transferencia.

Las cajas de Petri con las células adherentes fueron lavadas con SBS y adicionadas cada una con 10 ml de una solución 1:2 de EDTA 0.01 M en SBS con RPMI 10% SFT, pH7 (47). Las cajas con la solución fueron incubadas 30 min a $37^\circ C$ en una estufa de CO_2 al 5%. Posteriormente se removieron los 10 ml de medio de cada caja y se colocaron en tubos de roca estériles para lavar las células con SBS por centrifugación a 1500 rpm durante 10 min. Por último se ajustó la cantidad de células viables en medio SBS con ayuda de la cámara de Neubauer y la tinción de azul de tripano.

b) Células provenientes de ratones irradiados. Un grupo de ratones jóvenes fue irradiado con 800 rads, dosis estandarizada en trabajo previo (41). La irradiación se llevó a cabo con una bomba terapéutica de Cobalto 765 de $50 Co$ 3400 Ci (Energía atómica de Canada limitada). - A las 24 hrs post-irradiación se obtuvieron los bazos de los ratones, se procesaron por disgregación y las células se lavaron en SBS. Se -

cuantificaron las células viables con azul de tripano y se ajustó la cantidad necesaria para los experimentos de transferencia.

c) Células tratadas con los sueros anti-theta y anti-células adherentes. El suero anti-cerebro de ratón o anti-theta (Bionetics, catálogo No. 8301-04), se reconstituyó siguiendo las instrucciones establecidas por el laboratorio que lo elaboró. El suero se descomplementó a 56°C durante 30 min, se diluyó 1:50 en un volumen de 35 ml, con medio RPMI para obtener la lisis de 60-80% de células blanco y se incubó a 4°C con 1×10^8 células de bazo de ratones machos de un mes suspendidas en 35 ml de RPMI, durante 30 min. Posteriormente se añadió complemento de cobayo liofilizado diluido 1:50 (para obtener el 100% de lisis), en un volumen de 70 ml con RPMI, se incubó a 37°C en baño María durante 30 min y se lavó 2 veces con RPMI pH7. Se cuantificó la viabilidad de las células por la técnica de exclusión con azul de tripano, y se ajustaron en SBS para utilizarlas en los experimentos de transferencia.

El suero anti-células adherentes (anti-macrófago) se descomplementó a 56°C durante 30 min, se diluyó 1:4 (un título menor del máximo considerado en la aglutinación) en un volumen de 20 ml con RPMI y se incubó a 4°C con 1×10^8 células de bazo de ratones de un mes suspendidas en 20 ml de RPMI, durante 30 min. Posteriormente se agregó el complemento diluido 1:50 (100% de lisis) en un volumen de 40 ml con RPMI, se incubó en baño María a 37°C durante 30 min y se lavó 2 veces con RPMI pH7. Finalmente se cuantificaron las células viables y se ajustaron en SBS para utilizarlas en los experimentos de transferencia.

Experimentos de transferencia de diferentes poblaciones celulares.

La figura 1 muestra el esquema general de los experimentos de transferencia. Se realizaron 4 experimentos con animales machos singénicos Balb/c. Los ratones receptores de células fueron siempre de 4 1/2 meses de edad. Las células transferidas fueron inoculadas a cada ratón por vía ocular en 0.2 ml y 0.3 ml de SBS.

a) Transferencia de células adherentes y no adherentes. En los dos primeros experimentos se formaron grupos de 10 animales y a continuación se mencionan los grupos con sus respectivos tipos de células transferidas: grupo I, ratones de 4 1/2 meses transferidos con células adherentes de 1 mes (1×10^7 células/0.3 ml SBS); grupo II, ratones de 4 1/2 meses transferidos con células no adherentes de 1 mes (1×10^7 células/0.3 ml SBS); grupo III, ratones de 4 1/2 meses transferidos con células totales de bazo de 1 mes (5×10^7 células/0.3 ml SBS); grupo IV ratones de 4 1/2 meses transferidos con células irradiadas con 800 rads (41) de 1 mes (1×10^7 células/0.3 ml SBS); grupo V, ratones de 4 1/2 meses transferidos con células adherentes de 4 1/2 meses (1×10^7 células/0.3 ml SBS); grupo VI, ratones de 4 1/2 meses transferidos con células no adherentes de 4 1/2 meses (1×10^7 células/0.3 ml SBS); grupo VII, ratones de 4 1/2 meses transferidos con células totales de bazo de 4 1/2 meses (1×10^7 células/0.3 ml SBS). Los tiempos de incubación para la separación de las células adherentes y no adherentes fueron de 3-hrs en el primer experimento y 24 hrs en el segundo. Los controles que se utilizaron fueron: grupo VIII, control de infección de 4 1/2 meses, constituido por 5 ratones adultos que no recibieron células, pero si fueron infectados; grupo IX, control de infección de 1 mes, formado por 5 ratones recién nacidos que no recibieron células pero si fueron infectados; el grupo X de controles de transferencia, formados por la mitad de animales de cada uno de los grupos transferidos con células, los cuales no fueron infectados con el hongo y por último el grupo XI, control de irradiación formado por cinco de los animales de 1 mes que fueron donadores de células irradiadas con 800 rads.

Una semana después, de acuerdo a la cinética de infección post-transferencia anteriormente realizada (41), se infectaron por vía intraperitoneal la mitad de animales de cada grupo transferidos con células y los controles de infección; en el primer experimento con una dosis letal de Histoplasma capsulatum para ratones de 1 mes (4×10^8 levaduras/ml de S.S.), y en el segundo experimento con una dosis subletal para ratones de 1 mes (4×10^7 levaduras/ml de S.S.).

b) Transferencia de células tratadas con los sueros anti-theta y anti-células adherentes. En el tercer y cuarto experimento se siguió básicamente el mismo esquema anterior, aunque el tiempo de incubación de las células para permitir la adherencia aumentó a 48 hrs, permitiendo así una mejor purificación de las células adherentes y no adherentes, puesto que a mayor tiempo de cultivo, el porcentaje de células tipo-macrófago adheridas al vidrio aumenta. En estos experimentos se introdujeron dos nuevos grupos de ratones que ocuparon los lugares de los grupos V y VI anteriores, que respectivamente fueron transferidos con células adherentes y no adherentes de ratones de 4 1/2 meses; por lo tanto los grupos de animales son los siguientes en el tercer experimento: grupo I, de ratones de 4 1/2 meses transferidos con células adherentes de 1 mes (6.5×10^6 células/0.2 ml SBS); grupo II, de ratones de 4 1/2 meses transferidos con células no adherentes de 1 mes (1×10^7 células/0.2 ml SBS); grupo III, de ratones de 4 1/2 meses transferidos con células totales de bazo de 1 mes (5×10^7 células/0.2 ml SBS); grupo IV, ratones de 4 1/2 meses transferidos con células irradiadas con 800 rads de 1 mes (1×10^7 células/0.2 ml SBS); grupo V, de ratones de 4 1/2 meses, transferidos con células no adherentes (de cultivo de 48 hrs) de ratones de 1 mes, tratadas con suero anti-células adherentes (1×10^7 células/0.2 ml SBS); grupo VI, de ratones de 4 1/2 meses transferidos con células totales de bazo de 1 mes, tratadas con suero anti-theta (1×10^7 células/0.2 ml SBS); grupo VII, de ratones de 4 1/2 meses transferidos con células totales de bazo de 4 1/2 meses (1×10^7 células/0.2 ml SBS); grupo VIII, control de infección de 4 1/2 meses; grupo IX, control de infección de 1 mes; grupo X, control de transferencia, y el grupo XI, control de irradiación. En el cuarto y último experimento se formaron grupos iguales a los del tercer experimento, con pequeñas variaciones como las siguientes: en el grupo I, la dosis de células adherentes transferidas fue de 4.32×10^6 células/0.2 ml SBS y el grupo IV, no se realizó, colocándose en su lugar a un grupo de ratones de 4 1/2 meses transferidos con células de bazo totales de 1 mes, con dosis de 5×10^7 células/0.2 ml SBS.

Una semana post-transferencia, los animales fueron infectados por vía intraperitoneal; en el tercer experimento con una DL50 para ratones-

de 1 mes de edad (2.52×10^6 levaduras/ml de S.S.) y en el cuarto experimento con una dosis subletal para ratones de 1 mes (3.78×10^6 levaduras/ml S.S.), (la virulencia de la cepa varia con el tiempo).

Durante los experimentos, los animales permanecieron bajo observación diaria en un máximo de 48 días, tomando en cuenta los siguientes - parámetros: muerte, presencia de signos de la enfermedad (inmovilidad, pelo irsuto, pérdida de peso), y aislamiento del hongo del bazo, pulmón e hígado de los animales muertos, en medio Micobiotic agar.

RESULTADOS

Caracterización y viabilidad de células por las tinciones de esterasa - no específica, Wright y azul de tripano.

El cuadro # 1 resume los resultados obtenidos con las tres tinciones realizadas para células adherentes peritoneales de ratones adultos- (de 4-6 meses), que se incubaron durante dos y cuatro días, y para células adherentes de bazo de ratones jóvenes (de un mes) que solamente se incubaron dos días. Con la tinción de Wright se distinguieron morfológicamente dos tipos de células peritoneales que permanecieron adheridas a la lenteja de vidrio: células linfocíticas y células tipo macrófago, - las primeras, a los dos días de incubación se encuentran presentes en un 67%, y a los cuatro días de incubación solo en un 10%, mientras que inversamente las segundas células ocupan el 33% a los dos días y el 90% a los cuatro días de incubación. Con las células adherentes de bazo de un mes no se realizó el conteo diferencial. La actividad de esterasa - no específica que se presenta en monocitos y macrófagos (44) fue detectada en las células adherentes obtenidas y resultó del 90 al 100% positiva en las células tipo macrófago peritoneales adultas con dos días de incubación, aunque a los cuatro días disminuyó el porcentaje al 78% y - en las células de bazo de un mes, con dos días de incubación se encontró el 43% de reacción positiva y el 57% de reacción negativa. Finalmente con la tinción de azul de tripano, se obtuvo el 100% de viabilidad para ambos tipos de células adherentes.

Titulación del suero anti células adherentes por las técnicas de aglutinación y ELISA.

a) Aglutinación. Se colectaron tres porciones del suero que fueron descomplementadas a 56°C durante 30 min previamente a la titulación. La aglutinación se realizó por duplicado. Se utilizaron células peritoneales procedentes de ratones adultos y se obtuvieron los resultados mostrados en el cuadro # 2. La dilución a la cual se encontró el título mas alto en los primeros dos sueros fue de 1:16, mientras que en el tercero fué de 1:8. Al observar al microscopio una muestra de los tubos con aglutinación, se notaron grandes acúmulos de células. Finalmente se reunieron las tres porciones de suero para su posterior uso en los experimentos de transferencia, en los cuales se consideró como título máximo la dilución 1:8. Los controles con suero normal de conejo resultaron siempre negativos.

b) Análisis inmunoenzimático (ELISA). Otro método más sensible utilizado fue la prueba de ELISA, para la cual se prepararon dos placas recubiertas con diferentes antígenos. La primera con 1×10^6 células adherentes de bazo de ratón adulto por pozo y la segunda con 1×10^6 células no adherentes de bazo de ratón adulto por pozo. La prueba se realizó por duplicado, probándose el suero inmune y el suero normal de conejo; la lectura fué cualitativa. Al probarse el antisuero con las células adherentes se dió una reacción positiva muy intensa hasta la dilución 1:60, y al probarse con las células no adherentes también resultó ser positiva aunque en menor intensidad, obteniéndose un título de 1:40. Los controles con suero normal de conejo resultaron negativos.

A una alícuota del antisuero se le realizó adsorción con células no adherentes de ratones adultos y se encontró una pérdida de reactividad. Por esa razón el antisuero no se utilizó con la adsorción.

Experimentos de transferencia de diferentes poblaciones celulares.

Con el propósito de caracterizar a las poblaciones celulares pre-

sentes en el bazo de los ratones recién nacidos causantes del abatimiento de la resistencia de ratones adultos, a una dosis letal de Histoplasma capsulatum para ratones de un mes, se procedió a realizar los experimentos de transferencia, en los que se utilizaron como donadores de células, ratones machos de un mes y 4 1/2 meses de edad y como receptores ratones de 4 1/2 meses. Después de una semana de haber realizado la — transferencia adoptiva de células, los animales se infectaron con diferentes dosis de levaduras de Histoplasma capsulatum en los cuatro experimentos. El período de observación posterior a la infección fué de 30 a 40 días, tomándose en cuenta los siguientes parámetros: a) muerte de los animales; b) presencia de signos de la enfermedad; c) aislamiento — del hongo de los órganos procedentes de los animales muertos por la infección, que siempre fue positivo.

a) Cambios en la resistencia de ratones adultos hacia la infección histoplasmosa por la transferencia de células adherentes y no adherentes de bazo de ratones de un mes. En el experimento # 1 las células — transferidas se sometieron a tres horas de incubación para permitir la adherencia al vidrio, y se infectó intraperitonealmente a los animales con una dosis letal de levaduras para ratones de un mes de edad (4×10^8 levaduras/ml). En el cuadro # 3 se puede observar el número de muertes en los diferentes grupos de ratones infectados. El tiempo de muerte se consideró de la siguiente manera: 1.- A los 10 días (en el transcurso de 10 y 19 días); 2.- A los 20 días (en el transcurso de 20 y 29 días) — y 3.- A los 30 días (en el transcurso de 30 y 39 días). Todos los animales del grupo I, transferidos con células adherentes de un mes, murieron a los 10 días post-infección, siendo el grupo de animales que pereció mas rápidamente con la presencia de signos agudos de la enfermedad, como se muestra en el cuadro # 4. El grupo II, de ratones transferidos con células no adherentes y el grupo III, transferido con células de bazo totales de un mes, tuvieron el 100% de muertes a los 20 días post-infección y los signos de la enfermedad presentados también fueron muy — marcados. Todos los ratones del grupo IV, que recibieron una población de células de un mes previamente irradiadas con 800 rads (41), también murieron a los 20 días; por el contrario, los animales pertenecientes — al grupo V transferidos con células adherentes de 4 1/2 meses, el grupo

VI, transferido con células no adherentes de 4 1/2 meses y el grupo VII con células de bazo totales, procedentes igualmente de ratones adultos de 4 1/2 meses de edad, resolvieron la infección favorablemente, logrando sobrevivir. Los controles usados funcionaron adecuadamente; el grupo VIII de ratones de 4 1/2 meses que solamente fueron infectados con la dosis letal para ratones de un mes (control de infección de 4 1/2 meses), presentaron el 100% de sobrevida a lo largo de los experimentos y el grupo IX de ratones de un mes infectados (control de infección de un mes) presentó el 100% de muertes como era de esperarse, puesto que se les inculó una dosis letal para su edad. Los controles de transferencia que solamente recibieron células, sin ser infectados y que estuvieron formados por 5 ratones de cada uno de los grupos, sobrevivieron durante todo el tiempo del experimento, indicando que estos controles sanos funcionaron correctamente. Para los donadores de células irradiadas se realizó un control del efecto letal de la irradiación y se pudo observar que murieron en un período de 3 a 5 días (grupo XI.)

En el experimento No 2, se presentaron básicamente los mismos resultados que en el experimento anterior, se trató de obtener una mejor purificación en las poblaciones de células adherentes y no adherentes utilizando un tiempo más largo de incubación que fué de 24 hrs. Además se inyectó una dosis infectante subletal para ratones de un mes - - - - (4×10^7 levaduras/al), para discriminar con mayor claridad el efecto supresor de las células en los animales enfermos. Los cuadros 3 y 5 muestran las muertes y los signos de la enfermedad presentados por los diferentes grupos. El grupo I al igual que en el experimento 1, también tuvo el 100% de muertes a los 10 días después de la infección. Los grupos II y III, lo tuvieron a los 20 días post-infección. El grupo IV, de animales transferidos con células irradiadas de un mes, murieron dos a los 10 días y el resto a los 20 días post-infección y los ratones transferidos con células de 4 1/2 meses pertenecientes a los grupos V, VI y VII, sobrevivieron presentando signos de la enfermedad leves. Todos los controles funcionaron adecuadamente y se observa que no hubo muertes en el control de infección de un mes (grupo IX), puesto que recibieron una dosis subletal.

b) Cambios en la resistencia de ratones adultos hacia la infección histoplasmosa por la transferencia de células de bazo de ratones de un mes tratadas con suero anti-theta y anti-células adherentes. Ante la inquietud de lograr una mejor purificación de poblaciones celulares adherentes y no adherentes y poder así observar con más claridad el fenómeno supresivo, en el experimento No. 3 se aumentó el tiempo de incubación de las células de bazo a 48 hrs, y se incluyeron dos nuevos grupos de animales: uno de ratones de 4 1/2 meses transferidos con células no adherentes procedentes de ratones de un mes, tratadas con el suero anti-células adherentes, anteriormente fabricado, más complemento de cobayo, lográndose así una población no adherentes enriquecida con linfocitos T y el otro grupo fué de ratones de 4 1/2 meses de edad, transferidos con células totales de bazo de un mes, las cuales fueron tratadas con suero comercial anti-cerebro de ratón o anti-determinantes-theta, el cual elimina la mayoría de linfocitos T, lográndose así una población enriquecida con macrófagos. Estos dos nuevos grupos reemplazaron a los grupos V y VI anteriores; por lo tanto el grupo V, se denomina de ratones de 4 1/2 meses transferidos con células no adherentes de un mes más suero anti-células adherentes, y el grupo VI de ratones de 4 1/2 meses transferidos con células totales de bazo de un mes más suero anti-theta. Se plantearon las mismas condiciones experimentales anteriores y una semana después de la transferencia se aplicó una Dosis Letal 50 (DL50) para ratones de un mes (2.52×10^8 levaduras/ml), y los resultados de la muerte y los signos de la enfermedad se pueden observar en los cuadros 6 y 7. El grupo I, de ratones transferidos con células adherentes de un mes, presentó dos muertes a los 30 días post-infección, y el grupo II de animales transferidos con células no adherentes de un mes, presentó tres muertes a los 20 días post-infección. El grupo III, con células totales de bazo de un mes y el grupo IV, con células irradiadas obtuvieron tres y dos muertes respectivamente a los 30 días post infección. En el grupo V con células no adherentes más suero anti-células adherentes, se observó la muerte de todos los animales a los 20 días después de la infección y en el grupo VI de ratones transferidos con células totales de bazo de un mes más suero anti-theta murieron tres ratones a los 20 días. En el grupo VII, transferido con células de bazo totales de 4 1/2 meses solo se presentó una muerte a los 30 días

de observación. Todos los grupos controles funcionaron correctamente, como se puede apreciar en el cuadro 6; no hubo muertes, a excepción — del control de infección de un mes (grupo IX) en donde murieron 3 ratones a los 30 días post-infección y del control de irradiación (grupo — XI) en donde murieron todos los animales a los 10 días después de la — infección. Los otros controles (grupo VIII y X) permanecieron vivos — durante el período de observación.

El experimento No. 4 y último, fué una repetición del anterior a diferencia de la dosis infectante que fué subletal (3.78×10^8 levaduras/ml), aunque es una dosis mayor de levaduras, la virulencia de la — cepa 5037 de Histoplasma capsulatum disminuye con el tiempo de cultivo. También se eliminó el grupo IV, de ratones transferidos con células — irradiadas, y en su lugar se repitió el grupo III con células de bazo — totales de un mes, pero con una dosis menor de células.

Como puede verse en el cuadro No. 8, en el grupo I de animales — con células adherentes se presentaron 3 muertes a los 20 días después — de la infección y en el grupo II con células no adherentes murieron to — dos los animales a los 10 días post-infección. Los grupos III y IV de — ratones transferidos con células totales de bazo de un mes, que reci — bieron diferentes dosis de células, tuvieron 4 y 3 muertes a los 10 y — 20 días post-infección respectivamente. Finalmente se encontraron 3 y — 2 muertes post-infección en los grupos V y VI de animales transferidos — con células tratadas con el suero anti-células adherentes y el suero — antitheta. Los grupos controles sobrevivieron a lo largo de la obser — vación, incluyendo al control de infección de 1 mes (grupo IX) debido — a la inoculación de una dosis subletal de Histoplasma capsulatum. En — general los signos mostrados en todos los grupos de ratones fueron muy — marcados encontrándose así que los animales desarrollaron la enferme — dad (cuadro No. 9).

Las figuras 2 y 3 representan el tiempo de muerte de los ratones — a lo largo de los cuatro experimentos realizados.

DISCUSION

El factor edad parece tener gran importancia en relación con la — susceptibilidad hacia la infección histoplasmosa. La mayor predisposición a la enfermedad que presentan los ratones machos menores de un mes (41), podría deberse a un estado inmune supresivo previo a la infección y que tiene la capacidad de ser transferido por medio de células de bazo a ratones adultos de 4 1/2 meses de edad, normalmente resistentes a una dosis letal para ratones de un mes. Al transferirse por separado — células de bazo adherentes y no adherentes de ratones de un mes de edad a receptores adultos de 4 1/2 meses, se encontró que ambas poblaciones — participan en el fenómeno de inmunosupresión.

En varias infecciones se han comprometido dos tipos de poblaciones celulares supresoras; una de células adherentes tipo macrófago y otra — de linfocitos T supresores (6-17, 48, 49). Por lo tanto, se trató de — encontrar a estos tipos celulares dentro de las poblaciones adherentes — y no adherentes del bazo de ratones de un mes de edad, para comprobar — si alguna de ellas o ambas participaban en esta inmunosupresión capaz — de ser transferida.

La tinción de esterasa no específica característica de monocitos y macrófagos (44) realizada para las células adherentes, mostró que tanto las células peritoneales de ratones adultos como las células de bazo de ratones de 1 mes presentaron esta actividad enzimática, aunque debe observarse en el cuadro No. 1 que en las células de ratones adultos disminuye la actividad de esterasa conforme aumenta el tiempo de cultivo, — probablemente debido a alteraciones en su metabolismo en relación con — el tiempo de cultivo, y las células de ratones de 1 mes tuvieron un 43% de reacción positiva, tal vez porque al tratarse de ratones muy jóvenes, la actividad enzimática aún no es bien detectable. Con la tinción de — Wright se realizó la diferenciación morfológica de las células adherentes peritoneales y se observó que al aumentar el tiempo de incubación — del cultivo, se logra una mejor purificación de células tipo-macrófago; por esta razón se dejaron cuatro días de incubación para la separación — de las células adherentes utilizadas para obtener el antisuero. La tin

ción de Wright no se aplicó a las células adherentes de bazo de 1 mes, - debido a que son altamente sensibles al fijador (etanol). Finalmente - la viabilidad de ambos tipos de poblaciones celulares adherentes fué - del 100% al realizarse la tinción con azul de tripano.

En el cuadro No. 2 se observó que el suero anti-células adherentes peritoneales presentó títulos positivos en la aglutinación y la ELISA - con células adherentes peritoneales y con células adherentes de bazo, - aunque es importante considerar que se detectó reacción cruzada con células no adherentes de bazo y que las células utilizadas para la inmunización procedían de ratones adultos, mientras que las células que se - transfirieron provenían de ratones de 1 mes de edad.

Como muestra el cuadro No. 3, los dos primeros experimentos de - transferencia sugirieron que la población celular inicialmente involu- crada en la transferencia del estado supresivo tiene la característica- de ser adherente al vidrio y resistente a 800 rads de irradiación; pro- bablemente se trata de células tipo macrófago, aunque en un tiempo más- largo el efecto supresivo también se presentó en los ratones transferi- dos con células no adherentes. En los siguientes experimentos, las cé- lulas transferidas fueron sometidas a 48 hrs de cultivo previo (el do- ble del tiempo que en experimento No. 2), e incubadas con los sueros an- ti-theta y anti-células adherentes más complemento de cobayo, para lo- gar una mejor purificación de las poblaciones celulares adherentes y - no adherentes y poder confirmar o modificar la suposición anteriormente realizada. Al poner el suero anti-theta en contacto con células de ba- so totales de ratones de un mes, se eliminó gran parte de la población- de células T, lograndose así una población de bazo enriquecida en macró- fagos y por el contrario, al exponer células no adherentes con suero an- ti-células adherentes, se obtuvo una población enriquecida en linfocí- tos T. Así en los dos últimos experimentos, se tuvieron poblaciones ce- lulares enriquecidas con células tipo macrófago en los grupos transferi- dos con células adherentes (grupo I), células radio resistentes (grupo- IV) y células totales de bazo tratadas con suero anti-theta (grupo VI), además de poblaciones celulares enriquecidas con linfocitos T, en los - grupos transferidos con células no adherentes (grupo II) y células tra-

tadas con el suero anti-células adherentes (grupo V).

En los dos últimos experimentos cuyos resultados se encuentran en los cuadros No. 6 y No. 8, al trabajar con poblaciones celulares mejor purificadas, se observó que aparentemente la población no adherente es la que causa más rápidamente la muerte en los ratones, aunque las células adherentes también siguen presentando el efecto supresor; lo más probable es que ambas poblaciones estén participando en este fenómeno, podrían existir relaciones funcionales entre los macrófagos y los linfocitos T supresores, para dar como resultado el abatimiento de la respuesta inmune encontrada en los ratones recién nacidos, y que es posible de transferir a receptores adultos.

Los mecanismos de supresión de la respuesta inmune se llevan a cabo principalmente por medio de factores solubles. Se ha encontrado que muchos de los factores de células T participan en la iniciación de una serie de eventos celulares que consiguen el aumento o la supresión de la respuesta inmune (50). Existen varios modelos de supresión y el más aceptado es el que proponen Cantor y Gershon (51-52), en donde una primera célula T supresora (Ts 1) produce un factor (Tsf 1), que actúa sobre una célula precursora de una segunda célula supresora (Ts 2), que a su vez va a liberar un segundo factor (Tsf 2) que va actuar sobre la tercera célula supresora (Ts 3) o célula efectora, que llevara a cabo directamente la supresión, teniendo como células blanco a las células T (probablemente T ayudadoras), células B o macrófagos. En los experimentos realizados en el presente trabajo es poco probable la transferencia de algún factor soluble junto con las células, y aún en el caso de que se pudiera haber introducido en los animales, se encontraría en una concentración mínima, puesto que las células fueron lavadas previamente a la inoculación en los ratones. Por el contrario, las células transferidas al encontrarse dentro del organismo sí podrían producir y/o liberar estos factores y de alguna manera inducir el desarrollo del circuito supresor.

La existencia de células T supresoras en el bazo de los ratones neonatos, ha sido demostrada por varios investigadores como Mosier y Cohen (37), que proponen que estas células se encuentran en exceso al

nacimiento y llegan a un equilibrio con las demás subpoblaciones de células T alrededor de la quinta y sexta semana de edad. En diferentes experimentos se ha reportado que los linfocitos fetales y neonatales son capaces de suprimir la respuesta de células T y B (53-54). Ptak y col. (55), han encontrado que en los bazo de los ratones recién nacidos existen células T ayudadoras que no son capaces de realizar su actividad debido a la existencia de mecanismos supresores.

Por otra parte, los macrófagos facilitan el desarrollo de los fenómenos inmunológicos timo-dependientes y por lo tanto son esenciales para el desarrollo de la inmunocompetencia humoral y celular (56). El papel del macrófago en la inmunidad ha dejado de ser el del simple presentador pasivo del antígeno y se ha transformado en un papel más activo al conocerse su capacidad de mandar señales involucradas en la activación y funcionamiento de las células B y T, como por ejemplo en la inducción de la actividad de las células T ayudadoras. El macrófago por medio de la producción de Interleucina I, puede tener importancia en la activación de las células T, cuando se presenta algún antígeno o mitógeno (57). Además, existen evidencias de la presentación de señales inductoras de la supresión transmitidas a las células T mediante un macrófago intermediario (58).

También es importante considerar que algunas células T pueden resistir al tratamiento con suero anti-Thy (59), que las células T supresoras presentes en el bazo de los ratones recién nacidos, pueden ser diferentes a las células T supresoras adultas (60), y que recientemente se ha reportado la existencia de células B supresoras (61).

Probablemente en el recién nacido todos los factores y eventos inmunes estén afectados de tal manera que se presente una marcada susceptibilidad hacia las infecciones. Es evidente que existen interacciones celulares, principalmente entre macrófagos y linfocitos T, que son importantes junto con todos los factores involucrados en la respuesta inmune del organismo para que se lleve a cabo la generación de un estado supresivo inmunológico.

CONCLUSIONES

- 1.- Para poder seleccionar diferentes poblaciones celulares de bazo de ratón se realizó lo siguiente :
 - a) La obtención de células adherentes tipo-macrófago peritoneales, esterasa positivas.
 - b) La preparación de un suero anti-células adherentes.
 - c) El manejo adecuado de cultivos celulares.
- 2.- Se trabajó con un diseño experimental adecuado, con el cual se observó que :
 - a) Existe un abatimiento en la resistencia de ratones de 4 1/2 meses hacia la infección histoplasmosa después de la transferencia de poblaciones celulares provenientes de ratones de 1 mes de edad altamente susceptibles a la enfermedad.
 - b) Las células adherentes y no adherentes de ratones de 1 mes de edad originan un estado inmunosupresivo en ratones de 4 1/2 meses.
- 3.- Para caracterizar con métodos más finos a la población celular responsable de la respuesta hacia la infección presentada en los ratones recién nacidos, en el futuro se espera utilizar anticuerpos monoclonales para receptores de linfocitos T supresores y macrófagos.

BIBLIOGRAFIA

1. GONZALEZ OCHOA, A. (1963). Relaciones entre el habitat del murciélago y el Histoplasma capsulatum. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Mex.) Vol. XXIII (1,2) : 81-86.
2. FUDENBERG, H. H ; STITES, D. L ; CALDWELL, J. L, and WELLS, J. V. - Inmunología clínica. Ed Manual Moderno, México (1980).
3. GONZALEZ OCHOA, A. (1959). Histoplasmosis pulmonar aguda en la República Mexicana. Rev. Invest. Salubr. Enferm. Trop. (Mex.) 19 : 341-349.
4. TAYLOR, M. L, DIAZ, S ; GONZALEZ, A ; SOSA, A. C ; and TORIELLO, C. (1984). Relationship between pathogenesis and immune regulation mechanism in histoplasmosis: A hypothetical approach. Reviews of Infectious Diseases. 6 : 775-782.
5. TAYLOR, M. L ; RICO GALINDO, B ; BENITEZ, M. T ; DIAZ SANCHEZ, G ; CASTRO, A. M ; POLITO ALARCON, G, y TORIELLO, C. (1984). Infección in vitro de Histoplasma capsulatum en macrófagos peritoneales de ratón. Bol. Soc. Mex. Mic. 19 : 327-342.
6. DEEPE, G. S ; WATSON, S. R, and BULLOCK, W.E. (1982). Generation of disparate immunoregulatory factors in two inbred strains of mice — with disseminated histoplasmosis. J. Immunol. 129 : 2186- 2191.
7. NICKERSON, D. H ; HAVENS, R. A, and BULLOCK, W. E. (1981). Immunoregulation in disseminated histoplasmosis : Characterisation of — splenic suppressor cell population. Cell. Immunol. 60 : 287-297.
8. WATSON, S. R, and BULLOCK, W. E. (1982). Immunoregulation in disseminated Histoplasmosis : Characterisation of the surface phenotype of splenic suppressor T-lymphocytes. Infection and Immunity ; 37 ; 940-945.

9. TEWARI, R. P ; KHARDORI, N ; MC CONNACHIE, P ; VON BEHREN, L. A , - and YAMADA, T. (1982). Blastogenic responses of lymphocytes from - mice immunised by sublethal infection with yeast cells of Histo - plasma capsulatum . Infection and Immunity. 36 : 1013- 1018.
10. HIRSCHBERG, H. (1978). The role of macrophages in the lymphoproliferative response to Micobacterium leprae in vitro. Clin. Exp. - Immunol. 34 : 46-51.
11. KATZ, P, and GOLDSTEIN, R. A. (1979). Immunoregulation in infection caused by Micobacterium tuberculosis : The presence of suppressor-monocytes and the alteration of subpopulations of T lymphocytes . - J. Infect. Dis. 140 : 12-21.
12. Ellner, J.J. (1978). Suppressor adherent cells in human tuberculosis. J. Immunol. 121 : 2573-2579.
13. SUSUKI, Y ; WATANABE, N, and KOBAYASHI, A. (1981). Non specific - suppression of primary antibody responses and presence of plastic+ adherent suppressor cells in Toxoplasma gondii infected mice. - Infect. Immun : 34 : 30-35.
14. CORREA, M ; NARAYANAN, P. R, and MILLER, H. C. (1980). Suppressive activity of splenic adherent cells from Plasmodium chabaudi-infected mice. J. Immunol. 125 : 749-754.
15. WARREN, H.S, and WEIDANZ, W.P. (1976). Malarial immunodepression - in vitro: Adherent spleen cells are functionally defective as accessory cells in the response to horse erythrocytes. Eur. J. Immunol. 6 : 816-819.
16. WELLHAUSEN, S. R, and MANSFIELD, J. M. (1980). Characteristics of - the splenic suppressor cell-target cell interaction in experimen - tal african trypanosomiasis. Cell. Immunol. 54 : 414-424.

17. KIERSZENBAUM, F. (1982). Immunologic deficiency during experimental Chagas disease (Trypanosoma cruzi infection) : Role of adherent , nonspecific esterase positive splenic cells. J. Immunol. 129 : - 2202-2205.
18. EIDINGER, D, and GARRET, T.J. (1972). Studies of regulatory effect of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. J. Exp. Med. 136 : 1098-1116.
19. KOTANI, M ; NAWA, Y, and FUJII, H. (1974). Inhibition by testosterone of immune reactivity and of lymphoid regeneration in irradiated and marrow reconstituted mice. Experientia. 30 : 1343-1345.
20. CHENEY, K. E, and WALFORD, R. L. (1974). Immune function and dysfunction in relation to aging. Life Sci. 14 : 2075-2084.
21. GARDNER, I.D. (1980). The effect of aging on susceptibility to infection. Reviews of Infectious Diseases. 2 : 801-810.
22. KONEN, T.G ; SMITH, G.S, and WALFORD, R. L. (1973). Decline in mixed lymphocyte reactivity of spleen cells from aged mice of a long-lived strain. J. Immunol. 110 : 1216-1221.
23. WALFORD, R. L. (1970). Antibody diversity, histocompatibility systems, disease states, and ageing. The Lancet. 12 : 1226-1229.
24. WILSON, D.A, and BRALY-MULLEN, H. (1982). Immunoregulation in MRL/Mp -Ipr/Ipr mice: Evidence for decreased helper-T cell and increased suppressor - T - cell function with age. Cell Immunol. 74 : - 72-85 .
25. LIU, J.J ; SEGRE, M, and SEGRE, D. (1982). Changes in suppressor, helper and B-cells functions in aging mice. Cell. Immunol. 66 : 372-382.

26. MAKINODAN, T ; PERKINGS, E. H, and CHEN, M.G.(1971). Immunologic - activity of the aged. Adv. Gerontol. Res. 3 : 171.
27. PRICE, G.B, and MAKINODAN, T. (1972). Immunological deficiencies in senescence. I. Characterization of intrinsic deficiencies. J. Immunol. 108 : 403-412.
28. ZATZ, M. M ; GOLDSTEIN, A. L, and WHITE, A. (1973). Lymphocyte populations of AKR/J mice : I. Effect of aging on migration patterns response to PHA and expression of theta antigen. J. Immunol. 111 : 1514-1518.
29. DUMONT, F, and HABBERSSETT, E. G. (1982). Age-related alterations of (NZB x SJ) F1 mice : Analysis by flow cytofluorometry. Eur. J. Immunol. 12 : 648-652.
30. PRICE, G.B, and MAKINODAN, T. (1972) . Immunologic deficiencies in senescence : II. Characterization of extrinsic deficiencies. J. Immunol. 108 : 413-417.
31. CHANG, M ; MAKINODAN, T ; PETERSON, W.J, and STREHLER, B. L.(1982) Role of T-cells and adherent cells in age related decline in murine Interleukin 2 production. J. Immunol. 129 : 2426-2430.
32. GULLIS, S ; KOZAK, R ; DURANTE, M, and WEKSLER, M. E. (1981). Immunological studies of aging : Decreased production of and response to T-cell growth factor by lymphocytes from aged humans. J. Clin. Invest. 67 : 937-942.
33. SPEAR, P. G ; WANG, A ; RUTISHAUSER, V, and EDELMAN, G. M. (1973). Characterization of splenic lymphoid cells in fetal and newborn mice. J. Exp. Med. 138 : 557-573.
34. FIDLER, J. M ; CHISCON, M. O, and GOLUB, E. S. (1972). Functional development of the interacting cells in the immune response; II. De-

- velopment of immunocompetence to heterologous erythrocytes in vitro. *J. Immunol.* 109 : 136-140.
35. RABINOWITZ, S.G. (1976). Measurement and comparison of the proliferation and antibody responses of neonatal immature and adult murine spleen cells to T-dependent and T-independent antigens. *Cell. Immunol.* 21 : 201-216.
 36. LANDAHL, G.A. (1976). Ontogeny of adherent cells: Distribution and ontogeny of A cells participating in the response to sheep erythrocytes in vitro. *Eur. J. Immunol.* 6 : 130-134.
 37. MOSIER, D.E., and COHEN, P. L. (1975). Ontogeny of mouse T-lymphocyte function. *Federation. Proc.* 34 : 137-140.
 38. ARGYRIS, B.F. (1968). Role of macrophage in immunological maturation. *J. Exp. Med.* 128 : 459-467.
 39. HIRSCH, M.S ; ZISMAN, B, and ALLISON, A.C. (1970). Macrophages and age-dependent resistance to Herpes simplex virus in mice. *J. Immunol.* 104 : 1160-1165.
 40. FOLCH, H, and WAKSMAN, B.H. (1973). Regulation of lymphocyte responses in vitro : V. Suppressor activity of adherent and nonadherent rat lymphoid cells. *Cell. Immunol.* 9 : 12-24.
 41. REYES MONTES, M.R. (1983). *Immunología de la histoplasmosis: Cambios inmunológicos y su relación con los mecanismos que influyen en la susceptibilidad del huésped a la infección con Histoplasma capsulatum*. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina U.N.A.M. México, D.F.
 42. HARDY, B ; GLOBERSON, A, and DAMON, D. (1973). Ontogenic development of the reactivity of macrophages to antigenic stimulation. *Cell. Immunol.* 9 : 282-288.

43. HERNANDEZ, R.A.(1979).Evaluación genética en ratones singénicos -- Balb/c udando pruebas inmunes de actividad celular in vivo e in vi tro. Tesis de Licenciatura, Escuela de Ciencias Químicas, U.A.P. - Puebla, Mex.
44. YAM,L.T ; LI,G.Y, and CROSBY,W.H. (1971). Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Amer.J. Clin. Path. 52 : 283 - 290.
45. UNANUE,E.R.(1968).Properties and some uses of anti-macrophage anti bodies. Nature. 218 : 36-38.
46. MOSIER,D.E.(1967). A requirement for two cell types for antibody # formation in vitro. Science. 158 : 1573- 1575.
47. DOUGLAS, S.D, and QUIE,D.G. Investigation of phagocytes in disease Churchill Livingstone, New York (1981) : 66-75.
48. STOBO,J.D; PAUL,S ; VAN SCOY,R.E.,and HERMANS,P.E. (1976). Suppressor-thymus derived lymphocytes in fungal infection. J. Clin.In vest. 57 : 319-328.
49. STOBO, J. D. (1977). Immunosuppression in man : Suppression by macrophages can be medisted by interactions with regulatory T cells. J. Immunol. 119 :918-924.
50. TADA,T,and HAYAKAWA,K. Antigen-specific Helper and Suppressor factors. In: Fourth International Congress of Immunology. Immunology 80. Progress in Immunology IV. M. Fougereau and J. Dausset (Ed). Academic Press, London, 1980. 392-402.
51. GERSHOW, R.K. Suppressor T cells : A miniposition paper celebra -- ting a new decade. In : Fourth International Congress of Immunology. Immunology 80. Progress in Immunology IV. M. Fougereau and Dausset (Ed) Academic Press, London, 1980.376-387.

52. CANTOR, H ; HUGENBERGER, L ; BOUDREAU, M. V ; EARDLEY, D.D ; KEMP, J SHEN, F.W, and GERSHON, R.K. (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.
53. SKOWRON, CENDRZAK, A , and PTAK, W.(1976). Suppression of local — graft-versus-host reactions by mouse fetal and newborn spleen cell Sur. J. Immunol. 6 : 451-452.
54. MOSIER, D. E, and JOHNSON, B.M. (1975). Ontogeny of mouse lymphocyte function : II. Development of the ability to produce antibody — is modulated by T lymphocytes. J. Exp . Med. 141: 216-226.
55. PTAK, W ; NAIDORF, K. F ; STRZYZEWSKA, J, and GERSHON, R.K. (1979) Ontogeny of cells involved in the suppressor circuit of the immune response. Eur. J. Immunol. 9 : 495-500.
56. ROSENTHAL, A.S, and SHEVACH, E.M. (1973). Function of macrophages — in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. J. Exp. Med . 138 : 1194-1212.
57. DUTTON, R.W. (1982). Regulation of the immune response: T cell interactions CRC. Critical Reviews in Immunology. 2 : 209.
58. PTAK, W, and GERSHON, R.K. (1975). Immunosuppression effected by — macrophage surfaces. J. Immunol. 115 : 1346-1350.
59. MOSIER, D.E ; MATHIESON, B.J, and CAMPBELL, P.S. (1977). Ly phenotype — and mechanism of action of mouse neonatal suppressor T cells. J. — Exp. Med. 146 : 59-73.
60. RODRIGUEZ, G; ANDERSSON, G; WIGZELL, H, and PECK, A.B. (1979). Non-T cell nature of the naturally occurring spleen-associated suppressor — cells present in the newborn mice. Eur.J. Immunol. 9 : 737-746.
61. CANPA, M; TOCA, L; GARZELLI, C; COLIZZI, V, and FAIGONE, G. (1980). Reversal of Pseudomonas aeruginosa-induced disturbance of lymphocyte — circulation in oxazolone-sensitized mice by cyclophosphamide.

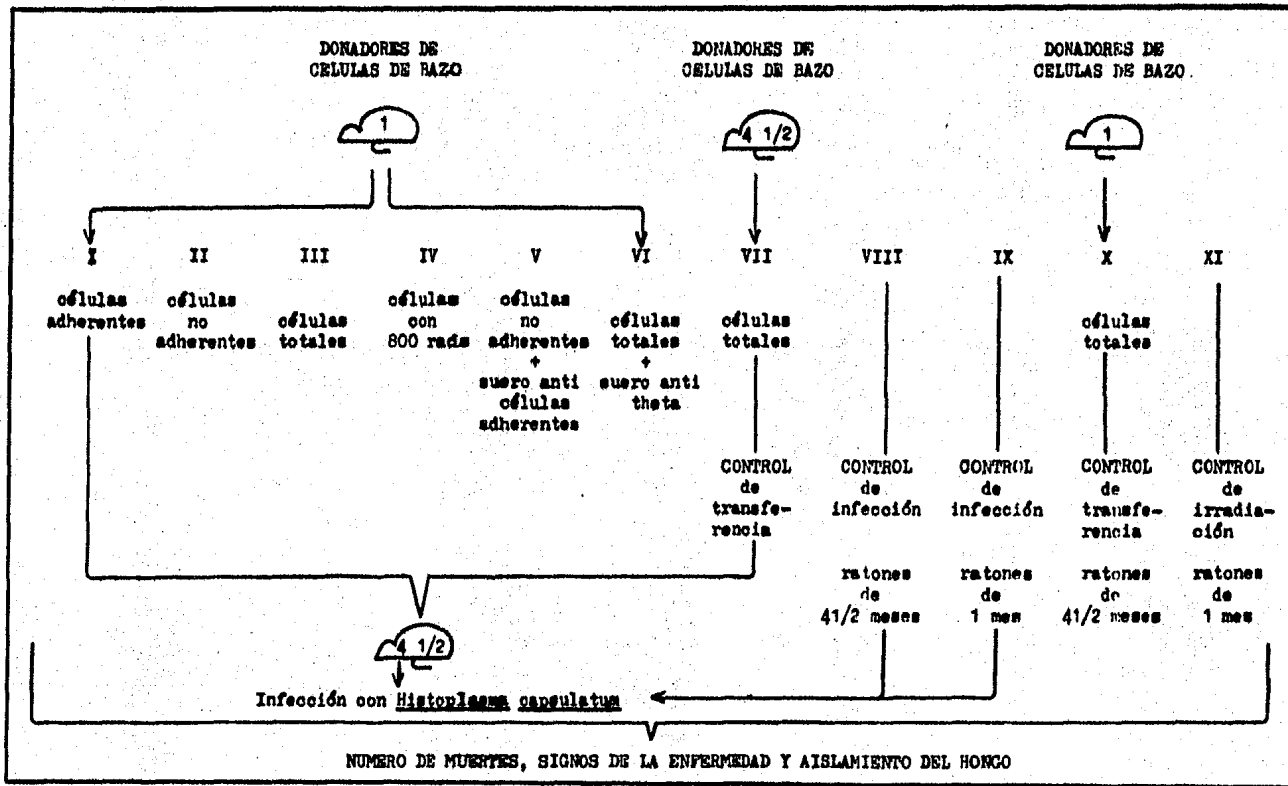


Figura 1.- ESQUEMA DE TRANSFERENCIA. Los animales receptores así como los donadores utilizados en los experimentos de transferencia, son machos y pertenecen a la cepa autógena de ratones Balb/c.

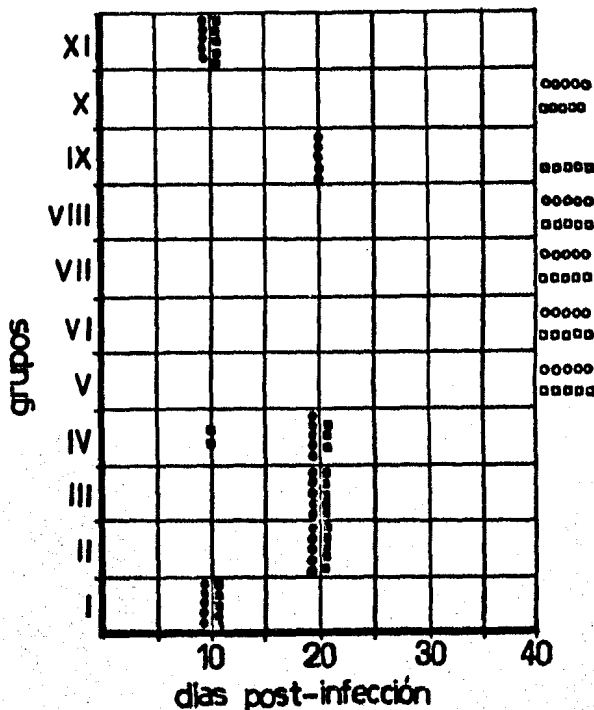


Figura No 2.- RESISTENCIA DE RATONES MACHOS BALB/C A LA INFECCION -- HISTOPLASMOSA POR LA TRANSFERENCIA DE CELULAS DE BAZO. (EXP No 1 Y No 2). Todos los animales receptores de células fueron de 4 1/2 meses de edad. Grupo I, transferido con células adherentes de 1 mes; grupo II, transferido con células no adherentes de 1 mes; grupo III, transferido con células totales de 1 mes; grupo IV, transferido con células irradiadas de 1 mes; grupo V, transferido con células adherentes de 4 1/2 meses; grupo VI, transferido con células no adherentes de 4 1/2 meses; grupo VII, transferido con células totales de 4 1/2 meses. Controles : grupo VIII, control de infección de 4 1/2 meses; grupo IX, control de infección de 1 mes; grupo X, control de transferencia y grupo XI, control de irradiación . (Ver detalles en el texto).

Las figuras negras representan a los animales muertos y las blancas a los animales vivos, Los círculos corresponden al experimento No 1 y los cuadrados corresponden al experimento No 2.

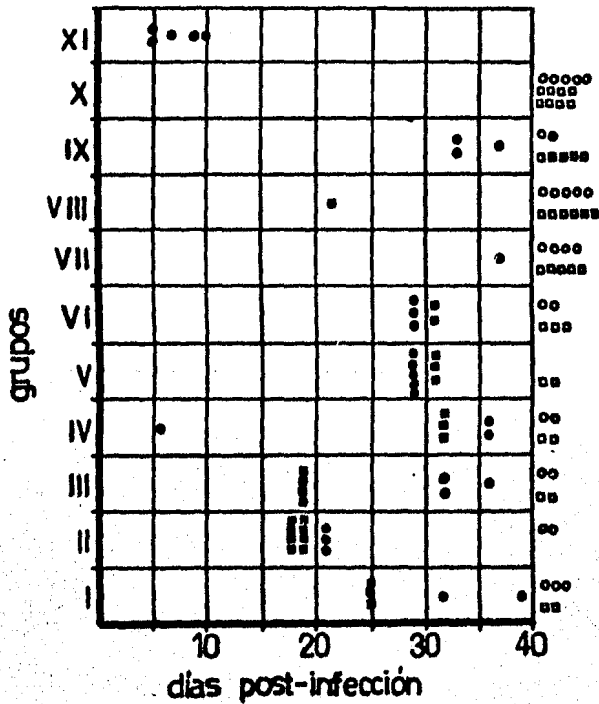


Figura No 3.- RESISTENCIA DE RATONES MACHOS BALB/C A LA INFECCION HISTOPLASMOSA POR LA TRANSFERENCIA DE CELULAS DE BAZO. (EXP No 3 Y No 4). Todos los animales receptores de células fueron de 4 1/2 meses de edad. Grupo I, transferido con células adherentes de 1 mes; grupo II, transferido con células no adherentes de 1 mes; grupo III, transferido con células totales de 1 mes; grupo IV, transferido con células irradiadas de 1 mes; grupo V, transferido con células no adherentes de 1 mes tratadas con suero anti-células adherentes; grupo VI, transferido con células totales de 1 mes tratadas con suero anti-theta; grupo VII, transferido con células totales de 4 1/2 meses. Controles : grupo VIII, control de infección de 4 1/2 meses; grupo IX, control de infección de 1 mes; grupo X, control de transferencia y grupo XI, control de irradiación. (Ver detalles en el texto).

Las figuras negras representan a los animales muertos y las blancas a los animales vivos. Los círculos corresponden al experimento No 3 y los cuadrados corresponden al experimento No 4.

CUADRO No. 1.- CARACTERIZACION Y VIABILIDAD DE CELULAS POR LAS TINCIONES DE ESTERASA NO ESPECIFICA, WRIGHT Y AZUL DE TRIPANO.

TINCION	ESTERASA				WRIGHT				AZUL DE TRIPANO	
	2 días		4 días		2 días		4 días		2 días	4 días
RESULTADOS	+	-	+	-	Linfocito	Macrófago	Linfocito	Macrófago		
CELULAS -- ADHERENTES PERITONEA- LES (ADUL- TAS).	90%	0	76%	22%	67%	33%	10%	90%	100%	VIABILIDAD
CELULAS -- ADHERENTES DE BAZO -- (1 MES).	43%	57%	-----		NR	NR	---	---	100%	VIABILIDAD

Las células de bazo y peritoneo provenientes de ratones adultos se colocaron en tubos de vidrio de fondo plano, - que contenían una lenteja de vidrio en el fondo. Se incubaron a 37°C en atmósfera del 5% de CO₂ durante 2 y 4 días. - Después de este tiempo las células adherentes se fijaron con etanol o acetona y fueron teñidas con la técnica de este- rasa no-específica y Wright. El azul de tripano se aplicó directamente. Las tinciones se realizaron por duplicado. - Los porcentajes se obtuvieron del promedio del conteo de 100 células al azar en cada lenteja con su respectivo duplica- do.

CUADRO No. 2.- TITULACION DEL SUERO ANTI-CELULAS ADHERENTES POR LAS TECNICAS DE AGLUTINACION Y ELISA.

A G L U T I N A C I O N	PORCIONES		D I L U C I O N E S					
	SUERO	CONCENTR.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
1	+		+	+	+	+	-	-
2	+		+	+	+	+	-	-
3	+		+	+	+	-	-	-
NORMAL	-		-	-	-	-	-	-

PLACAS		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	
E L I S A	Células adherentes de base - adultos	Suero Inmune	+	+	+	+	-	-
		Suero Normal	-	-	-	-	-	-
S A	Células no adherentes de base - adultos	Suero Inmune	+	+	-	-	-	-
		Suero Normal	-	-	-	-	-	-

En la aglutinación en tubo se utilizaron 1×10^6 células peritoneales de ratones adultos por tubo, en 0.25 ml de PBS que se agregaron a cada una de las diluciones de las 3 porciones del antisuero en un volumen de 0.25 ml. En la ELISA se utilizaron por separado 1×10^6 células de base adherentes y no adherentes de ratones adultos por pozo. Fueron adheridas con glutaraldehído al 0.1% en PBS. Se utilizó el sistema de la Fosfatasa Alcalina y la lectura fue cualitativa.

CUADRO No. 3.- TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CELULAS ADHERENTES Y NO ADHERENTES DE BAZO CON 3 HRS. Y 24 HRS. DE INCUBACION EN RELACION CON LA RESISTENCIA A LA INFECCION HISTOPLASMOSA.

EXPERIMENTOS No. 1 y No. 2

GRUPO	EDAD DE LOS DONADORES (Población Celular)	RATONES RECEPTORES NUMERO DE MUERTES EN DIAS			
		10 días		20 días	
		EXPERIMENTO			
		1	2	1	2
I	1 MES (células adherentes)	5(5)	5(5)	—	—
II	1 MES (células no adherentes)	0(5)	0(5)	5(5)	5(5)
III	1 MES (células totales)	0(5)	0(5)	5(5)	5(5)
IV	1 MES (células con 800 rads)	0(5)	2(5)	5(5)	3(5)
V	4 1/2 MESES (células adherentes)	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)
VI	4 1/2 MESES (células no adherentes)	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)
VII	4 1/2 MESES (células totales)	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)
VIII	4 1/2 MESES Control de infección	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)
IX	1 MES Control de infección	0(5)	0(5)	5(5)	0(5)
X	4 1/2 MESES Control Transferencia no infectado	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)
XI	1 MES Control irradiación no infectado	5(5)	5(5)	—	—

Todos los animales receptores fueron machos adultos singénicos Balb/c de 4 1/2 meses de edad. Dosis de células donadoras: 1×10^7 células adherentes, - no adherentes e irradiadas/0.3 ml SBS; 5×10^7 células totales de bazo/0.3 ml SBS. La infección se realizó el 7o. día después de la transferencia de células. Se utilizó la fase levaturiforme de la cepa 5037 de *H. parvulatum*, en el primer experimento con una dosis letal para ratones de un mes de edad (4×10^8 células/ml), y en el segundo experimento con una dosis subletal (4×10^7 células/ml). Los ratones se observaron diariamente.

() Los paréntesis representan el # total de o/grupo de animales.

CUADRO No. 4.- DETECCIÓN DE SIGNOS EN LOS RATONES BALB/O INFECTADOS CON HISTOPLASMA CAPSULATUM.

EXPERIMENTO No. 1

GRUPO	EDAD DE LOS DONADORES (Población Celular)	Pérdida de Peso días			Inmovilidad días			Pelos erizados días			Muerte días		
		10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
I	1 mes, (células adherentes)	2x			2x			2x			5(5)		
II	1 mes, (células no adherentes)	1x	3x		1x			2x	3x		-	5(5)	
III	1 mes, (células de base totales)	2x	-		2x	-		2x	-		-	5(5)	
IV	1 mes, (células irradiadas-800 rads)	2x	2x		2x	3x		2x	3x			5(5)	
V	4 1/2 meses, (células adherentes)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VI	4 1/2 meses, (células no adherentes)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VII	4 1/2 meses, (células de base total)	1x	2x	-	2x	3x	-	1x	3x	-	-	-	-
VIII	4 1/2 meses, Control de infección	1x	3x	-	1x	3x	-	1x	3x	-	-	-	-
IX	1 mes, Control de infección	1x	2x		1x	2x		1x	3x		-	5(5)	-
X	4 1/2 meses, Control de transferencia no infectado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XI	1 mes, Control de irradiación no infectado	3x			3x			3x			5(5)		

La infección se realizó el 7o. día después de la transferencia de células. Se utilizó la fase levaduriforme de la cepa 5037 de Histoplasma capsulatum, con una dosis letal para ratones de 1 mes de edad (4×10^8 células/ml.).

Los ratones fueron observados diariamente y la intensidad de los signos se expresa por las siguientes indicaciones: 3x muy intenso; 2x intenso; 1x ligero; - no signos. La expresión de los signos obedece a una observación arbitraria de la intensidad del signo predominante en cada grupo completo de animales (5 ratones por grupo).

CUADRO No. 5.- DETECCIÓN DE SIGMOS EN LOS RATONES BALB/C INFECTADOS CON HISTOPLASMA CAPSULATUM

EXPERIMENTO No. 2

GRUPO	EDAD DE LOS DONADORES (Población Celular)	Pérdida de Peso días			Inmovilidad días			Pelos Erisados días			Muerte días		
		10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
I	1 mes, (células adherentes)	2x	-	-	3x	-	-	3x	-	-	5(5)	-	-
II	1 mes, (células no adherentes)	1x	2x		1x	2x		2x	1x		-	5(5)	
III	1 mes, (células de base totales)	2x	2x		1x	1x		2x	2x		-	5(5)	
IV	1 mes, (células irradiadas- (800 rads)	2x	3x		1x	2x		2x	3x		2(5)	3(5)	
V	4 1/2 meses, (células adherentes)	-	-	1x	-	1x	1x	-	1x	1x	-	-	-
VI	4 1/2 meses, (células no adherentes)	-	-	1x	-	1x	1x	-	1x	1x	-	-	-
VII	4 1/2 meses, (células de base totales)	-	1x	-	-	1x	-	-	1x	-	-	-	-
VIII	4 1/2 meses, control de infección	1x	-	-	1x	-	-	1x	-	-	-	-	-
IX	1 mes, control de infección	1x	2x	1x	1x	2x	1x	1x	2x	1x	-	-	-
X	4 1/2 meses, control de transferencia no infectado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XI	1 mes, control de irradiación no infectado	3x			3x			3x			5(5)		

Véase la leyenda en el cuadro No. 4. En este caso la dosis infectante fue subletal para ratones de 1 mes (4 X 10⁷ levaduras/ml.)

CUADRO No. 6.- TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CELULAS ADHERENTES Y NO ADHERENTES DE BAZO CON 48 HRS. DE INCUBACION Y DE CELULAS TRATADAS CON SUERO ANTI-CELULAS ADHERENTES Y ANTI-THETA, EN RELACION CON LA RESISTENCIA A LA INFECCION HISTOPLASMOZA.

EXPERIMENTO No. 3

GRUPO	EDAD DE LOS DONADORES (población celular de bazo)	RATONES RECEPTORES		
		NUMERO DE MUERTES EN DIAS		
		10 días	20 días	30 días
I	1 MES (células adherentes)	0(5)	0(5)	2(5)
II	1 MES (células no adherentes)	0(5)	3(5)	0(5)
III	1 MES (células totales)	0(5)	0(5)	3(5)
IV	1 MES (células con 600 rads.)	0(5)	0(5)	2(5)
V	1 MES (células no adherentes más suero anti-células adheren- tes)	0(5)	5(5)	
VI	1 MES (células totales más suero anti-theta)	0(5)	3(5)	0(5)
VII	4 1/2 MESES (células totales)	0(5)	0(5)	1(5)
VIII	4 1/2 MESES Control de infección	0(5)	0(5)	0(5)
IX	1 MES Control de infección	0(5)	0(5)	3(5)
X	4 1/2 MESES Control de transferencia no infectado	0(5)	0(5)	0(5)
XI	1 MES Control de irradiación no infectado.	5(5)	-	-

Todos los animales receptores fueron machos adultos singulares Balb/c de 4 1/2 meses de edad. Dosis de células donadoras: 6.5×10^6 células adherentes/0.2 ml SRS; 1×10^7 células no adherentes e irradiadas/0.2 ml SRS; 5×10^7 células totales de 1 mes/0.2 ml SRS; 1×10^7 células tratadas con anticueros/0.2 ml SRS y 1×10^7 células totales de 4 1/2 meses /0.2 ml SRS. La infección se realizó el 7o. día después de la transferencia de células. Se utilizó la fase leucodiforme de la cepa 5037 de *H. gangliarum*, con una dosis letal 50 (ML50) para ratones de 1 mes de edad (2.52×10^5 ccis/ml). Los ratones se observaron diariamente.

() Los paréntesis representan el número total de cada grupo de animales.

CUADRO No. 7.- DETECCIÓN DE SIGNOS EN LOS RATONES BALB/C INFECTADOS CON HISTOPLASMA CAPSULATUM

EXPERIMENTO No. 3

GRUPO	EDAD DE LOS DONADORES (Población Celular)	Pérdida de Peso días			Inmovilidad días			Pelos Erizados días			Muerte días			
		10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	
I	1 mes,	(células adherentes)	1x	2x	3x	2x	2x	3x	1x	2x	3x	-	-	2(5)
II	1 mes,	(células no adherentes)	-	2x	3x	-	2x	3x	-	2x	3x	-	3(5)	-
III	1 mes,	(células de baso totales)	1x	1x	3x	1x	2x	3x	1x	2x	3x	-	-	3(5)
IV	1 mes,	(células irradiadas- (800 rads)	1x	2x	3x	2x	2x	2x	3x	3x	3x	-	-	2(5)
V	1 mes,	(células no adherentes más suero anti-células adherentes)	-	2x	-	2x	-	3x	-	3x	-	-	5(5)	-
VI	1 mes,	(células de baso totales más suero anti-theta)	1x	2x	2x	-	2x	3x	1x	3x	3x	-	3(5)	-
VII	4 1/2 meses,	(células de baso total)	1x	1x	2x	1x	2x	3x	1x	2x	2x	-	-	1(5)
VIII	4 1/2 meses,	control de infección	-	-	-	-	-	-	1x	1x	1x	-	-	-
IX	1 mes,	control de infección	-	1x	3x	-	1x	2x	1x	2x	3x	-	-	3(5)
X	4 1/2 meses,	control de transferencia no infectado.	-	-	2x	-	-	2x	-	1x	2x	-	-	-
XI	1 mes,	control de irradiación no infectado.	3x	-	-	2x	-	-	3x	-	-	5(5)	-	-

Véase la leyenda en el cuadro No. 4. Se utilizó una Dosis Letal 50 (DL50) para ratones de 1 mes de edad (2.52×10^8 levaduras/ml.)

CUADRO No. 8.- TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CELULAS ADHERENTES Y NO ADHERENTES DE BAZO CON 48 HRS. DE INCUBACION Y DE CELULAS TRATADAS CON SUERO-ANTI-CELULAS ADHERENTES Y ANTI-THETA EN RELACION CON LA RESISTENCIA A LA INFECCION HISTOPLASMOSA.

EXPERIMENTO No. 4

GRUPO	EDAD DE LOS DONADORES (Población celular de bazo)	RATONES RECEPTORES		
		NUMERO DE MUERTES EN DIAS		
		10 días	20 días	30 días
I	1 MES (células adherentes)	0(5)	3(5)	0(5)
II	1 MES (células no adherentes)	8(8)	-	-
III	1 MES (células totales 5×10^7 cels)	4(6)	0(6)	0(6)
IV	1 MES (células totales 1×10^7 cels)	0(5)	3(5)	0(5)
V	1 MES (células no adherentes más suero anti-células adherentes)	0(5)	0(5)	3(5)
VI	1 MES (células totales más suero anti-theta)	0(5)	0(5)	2(5)
VII	4 1/2 MESES (células totales)	0(6)	0(6)	0(6)
VIII	4 1/2 MESES Control infección	0(7)	1(7)	0(7)
IX	1 MES Control infección	0(6)	0(6)	0(6)
X	4 1/2 MESES Control transferencia no infectado	0(8)	0(8)	0(8)

Todos los animales receptores fueron machos adultos singénicos Balb/c de 4 1/2 meses de edad. Dosis de células donadoras: 4.32×10^6 células adherentes/0.2 ml SBS; 1×10^7 y 5×10^7 células de bazo total/0.2 ml SBS; 5.12×10^6 células no adherentes + suero anti-células adherentes/0.2 ml SBS; 1×10^7 células de bazo total más suero anti-theta/0.2 ml SBS; 1×10^7 células de bazo total de 4 1/2 meses/0.2 ml de SBS. La infección se realizó el 7o. día después de la transferencia de células. Se utilizó la fase levaduriforme de la cepa 5057 de *H. capoulatum* con una dosis subletal para ratones de 1 mes de edad (3.78×10^6 células/ml).

() Los paréntesis representan el # total de cada grupo de animales.

CUADRO No. 9.- INFECCION DE SIGNOS EN LOS RATONES BALB/C INFECTADOS CON HISTOPLASMA CAPSULATUM

EXPERIMENTO No. 4

GRUPO	EDAD DE LOS DONADORES (Población Celular)	Pérdida de Peso días			Inmovilidad días			Pelos Erizados días			Muerte días			
		10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	
I	1 mes,	(células adherentes)	-	1x	3x	-	2x	3x	1x	3x	3x	-	3(5)	-
II	1 mes,	(células no adherentes)	1x			2x		2x				8(8)		
III	1 mes,	(células de base total) (5 X 10 ⁷ cels.)	1x	2x	3x	1x	2x	3x	1x	2x	3x	4(6)	-	-
IV	1 mes,	(células de base total) (1 X 10 ⁷ cels.)	1x	-	2x	1x	-	2x	2x	1x	2x	-	3(5)	-
V	1 mes,	(células no adherentes más suero anti-células adherentes)	1x	3x	3x	1x	3x	3x	1x	3x	3x	-	-	3(5)
VI	1 mes,	(células de base total más suero anti-theta)	1x	-	2x	-	-	2x	1x	-	2x	-	-	2(5)
VII	4 1/2 meses,	(células totales de base)	1x	2x	2x	1x	2x	2x	2x	2x	2x	-	-	-
VIII	4 1/2 meses,	Control de infección.	-	2x	3x	1x	2x	3x	1x	2x	3x	-	1(7)	-
IX	1 mes,	Control de infección.	1x	2x	3x	1x	2x	3x	1x	3x	3x	-	-	-
X	4 1/2 meses,	Control de transferencia no infectado.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Véase la leyenda en el Cuadro No. 4. Se utilizó una dosis infectante subletal para ratones de 1 mes de edad (3.78 X 10⁸ levaduras/ml.)