

VACUNACION CON LEISHMANIA HERTIGI CONTRA LA INFECCION POSTERIOR CON LEISHMANIA MEXICANA Y LEISHMANIA BRAZILIENSIS EN HAMSTERS

Elka I. TERRIENTES (1) y Rodrigo ZELEDÓN (2)

RESUMEN

Una vacuna de promastigotos vivos de *L. hertigi* adicionada de coadyuvante completo de Freund sólo produjo una protección parcial en hamsters contra la infección por *L. mexicana* o *L. braziliensis* al retrasar, por períodos variables, la aparición de las lesiones. El retraso fue mayor cuando se usaron 3 dosis de la vacuna en vez de una y más marcado contra *L. mexicana* que contra *L. braziliensis*. Un extracto de *L. hertigi* mezclado con coadyuvante incompleto sí fue capaz de producir protección total contra *L. mexicana* y una sola dosis fue más eficaz que tres. El mismo material antigénico sólo ocasionó un retraso en la aparición de las lesiones cuando la infección se produjo con *L. braziliensis*. Las pruebas de inmunodifusión e inmunoelectroforesis mostraron al menos una banda en común entre *L. hertigi* y los dos parásitos humanos, que aparecen como no correspondientes.

INTRODUCCION

Existen algunas experiencias, tanto en humanos como en animales, tendientes a obtener una vacunación eficaz contra la leishmaniasis cutánea americana¹³. Sin embargo, hasta el momento, los resultados no han sido completamente satisfactorios. Esto es en parte debido a una compleja y variable estructura antigénica del parásito¹⁰ y a su forma de evadir la respuesta inmunológica⁹.

Entre los ensayos de vacunación utilizando animales podemos mencionar los trabajos de LAINSON & BRAY⁵ en monos Rhesus (*Macaca mulatta*). Observaron que *L. mexicana* y *L. braziliensis* protegen específicamente y que *L. mexicana* protege contra la infección posterior con *L. braziliensis* aunque con ésta última no sucede lo contrario. Experimentos posteriores⁷ utilizando amastigotos para vacunar monos americanos (*Cebus apella apella*) demostraron que ni *L. m. mexicana* ni *L. m. amazonensis* protegen contra la infección por parásitos del complejo "braziliensis", mien-

tras que subespecies de *L. braziliensis* producen fuerte resistencia contra *L. m. amazonensis*; es decir exactamente lo contrario de lo que sucedió con los monos asiáticos. BRYCE-SOON et al.² inmunizaron cobayos con una mezcla de extracto antigénico soluble e insoluble de *L. enriettii* y obtuvieron protección frente a una infección posterior con la misma especie. Sin embargo, después de inmunizar cobayos con extractos de *L. donovani*, *L. mexicana*, y *L. braziliensis* no obtuvieron protección alguna contra *L. enriettii*. PRESTON & DUMONDE¹² lograron desarrollar en cobayos una fuerte resistencia a una infección con *L. enriettii* utilizando para vacunarlos un antígeno ribosomal de la misma especie. HERRER⁴ inyectó *L. braziliensis* en hamsters inoculándolos previamente con promastigotos de *L. hertigi* y no encontró protección alguna.

SCHNEIDER¹⁴, realizó estudios de inmunodifusión con seis cepas de *L. hertigi* y las comparó con cepas humanas de *L. braziliensis*

(1) Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá
(2) Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), Tres Ríos, Costa Rica y Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica

y de *L. mexicana*. Encontró que las dos primeras daban una débil reacción cruzada mientras que *L. mexicana* presentó más bandas en común.

La *L. hertigi* del puerco espín mantiene una buena relación huésped parásito, ya que produce una infección inaparente de larga duración^{4,16}. Esta especie produce una intradermorreacción de Montenegro positiva, comparable a la que producen los antígenos preparados con especies humanas, en personas infectadas con *L. braziliensis* (Zeledón, datos no publicados).

Este trabajo tiene por objeto buscar la inducción de inmunidad protectora mediante el uso de *L. hertigi* en hamsters que fueron luego inoculados con *L. mexicana* y *L. braziliensis*.

MATERIAL Y METODOS

1) Cepas de Leishmania

L. hertigi (cm-170) proveniente de un cultivo en medio de Senekjie con 80 a 100 subcultivos y aislada de un puerco espín de Costa Rica¹⁶; *L. braziliensis* (HSJD-23) aislada del tabique nasal de un caso mucoso humano, inoculada en hamsters, reaislada en el mismo medio y usada con 2 a 4 subcultivos; *L. mexicana*

mexicana (OCR) de caso humano, reaislada de hamster y usada con 4 a 6 subcultivos.

2) Diseño Experimental

Se utilizaron 96 hamsters adultos jóvenes, en ocho grupos de 12 cada uno. Para cada experimento se hicieron cuatro subgrupos de tres animales cada uno.

A) Vacunación con promastigotos vivos de *L. hertigi*

Se utilizaron cultivos de 7 a 9 días en medio de Senekjie, lavados y centrifugados tres veces por 15 minutos, en solución salina al 0.85% a 800 x g y resuspendidos en la misma hasta lograr la concentración requerida de promastigotos utilizando una cámara de Neubauer para contarlos.

Se procedió a la vacunación de acuerdo con el Experimento 1 (Cuadro I). El inóculo y el coadyuvante se inyectaron separadamente en el mismo sitio, siempre por vía subcutánea nasal al menos que se especifique otra cosa. Para el Experimento 2 se procedió igual, excepto que la vacuna contenía $10^8 \times 10^6$ flagelados por animal y el inóculo de *L. braziliensis*, 12×10^6 . Para los experimentos 3 y 4 se procedió de acuerdo con el Cuadro II.

C U A D R O I

Procedimiento en la vacunación con una dosis de vacuna con promastigotos vivos de *L. hertigi* e inoculación posterior de *L. mexicana*
Experimento 1

Subgrupos:	A 1	A 2	A 3	A 4
Día 0:	50 X 10^6 promastigotos de <i>L. hertigi</i> en 0.5 ml Sol. salina Coadyuvante completo de Freund 0.2 ml	50 X 10^6 promastigotos de <i>L. hertigi</i> en 0.5 ml Sol. salina Solución salina 0.2 ml	Sol. salina 0.5 ml Coadyuvante completo de Freund 0.2 ml	Sol. salina 0.5 ml Sol. salina 0.2 ml
Día 35:	Inoculación de 15×10^6 promastigotos de <i>L. mexicana</i> a todos los hamsters en el mismo sitio.			

B) Vacunación con extracto de *L. hertigi*

Se utilizó una suspensión lavada de 200×10^6 flagelados/ml ($74 \mu\text{g}$ Nitrógeno/ml). La ruptura de las células se efectuó por períodos alternos de congelación a -70°C y descongelación súbita a 37°C por diez veces. Se determi-

no la concentración de nitrógeno por el método de LANG⁸.

Se procedió a la vacunación de acuerdo con los Cuadros III y IV.

Los hamsters se observaron semanalmente para la aparición de signos de la enfermedad (nódulos o lesiones tumorales). Se tomaron medidas de largo y ancho de las lesiones en

C U A D R O II

Procedimiento en la vacunación con tres dosis de vacuna con promastigotos vivos de *L. hertigi* e inoculación posterior con *L. mexicana*
Experimentos 3 y 4

Subgrupos:	C1 — D1	C2 — D2	C3 — D3	C4 — D4
Día 0:	Subcutáneo nasal 25 X 10 ⁶ promastigotos de <i>L. hertigi</i> en 0.15 ml Coadyuvante completo de Freund 0.1 ml	Idem Solución salina 0.1 ml	Subcutáneo nasal 0.15 ml de solución salina Coadyuvante completo de Freund 0.1 ml	Idem Solución salina 0.1 ml
Día 7:	Subcutáneo nasal 25 X 10 ⁶ promastigotos de <i>L. hertigi</i> en 0.15 ml Coadyuvante completo Freund 0.1 ml en la planta de la mano derecha	Idem Solución salina 0.1 ml en la planta de la mano derecha	Subcutáneo nasal 0.15 ml de solución salina Coadyuvante completo de Freund 0.1 ml en la planta de la mano derecha	Idem Solución salina 0.1 ml en la planta de la mano derecha
Día 14:	Subcutáneo nasal 50 X 10 ⁶ promastigotos de <i>L. hertigi</i> en 0.2 ml Coadyuvante completo de Freund 0.1 ml en la planta de la mano izquierda	Idem Solución salina 0.1 ml en la planta de la mano izquierda	0.2 ml de solución salina Coadyuvante completo de Freund 0.1 ml en la planta de la mano izquierda	Idem Solución salina 0.1 ml en la planta de la mano izquierda
Día 49:	Subgrupos C: Inoculación de 14 X 10 ⁶ promastigotos de <i>L. mexicana</i> a todos los hamsters Subgrupos D: Inoculación de 12 X 10 ⁶ promastigotos de <i>L. braziliensis</i> a todos los hamsters			

C U A D R O III

Procedimiento en vacunación con una dosis de extracto de *L. hertigi*, e inoculación posterior con *L. mexicana* y *L. braziliensis*
Experimentos 5 y 6

Subgrupos:	E1 — F1	E2 — F2	E3 — F3	E4 — F4
Día 0:	Emulsión de 0.3 ml de extracto de <i>L. hertigi</i> (22.2 µg N/ml) en 0.3 ml de coadyuvante incompleto de Freund	0.3 ml de extracto de <i>L. hertigi</i> (22.2 µg N/ml) en 0.3 ml de solución salina	Emulsión de 0.3 ml de solución salina y 0.3 ml de coadyuvante incompleto de Freund	Solución salina 0.6 ml
Día 35:	Subgrupos E: Inoculación de 13 X 10 ⁶ promastigotos de <i>L. mexicana</i> a todos los hamsters Subgrupos F: Inoculación de 12 X 10 ⁶ promastigotos de <i>L. braziliensis</i> a todos los hamsters			

milímetros utilizando un calibrador con vernier.

Antes de empezar un experimento y antes de darlo por terminado se hizo la prueba intradérmica de Montenegro, con 0.1 ml de una suspensión de promastigotos de *L. hertigi* con 14 µg N/ml y 0.5% de fenol.

C) Determinación de antígenos comunes

Para extraer los antígenos y preparar los antisueros en conejos se siguió el método de BRAY & LAINSON¹.

Para el método de Ouchterlony se usaron 7 ml de agarosa al 0.75% en solución salina tamponada con fosfatos 0.15 M (pH 7.2) con azida de sodio (1/5000) en láminas de vidrio de 7.5 x 3.9 cm, que tenían una base de agar al 0.5%. Los antígenos se usaron a una concentración de 10 mg/ml (74 µg N/ml) para *L. hertigi*, 20 mg/ml (156 µg N/ml) para *L. braziliensis* y 20 mg/ml (168 µg N/ml) para *L. mexicana*. Los antisueros se usaron sin diluir. Se dejaron reaccionar por 48 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

C U A D R O IV

Procedimiento en la vacunación con tres dosis de extracto de *L. hertigi* e inoculación posterior con *L. mexicana* y *L. braziliensis*
Experimentos 7 y 8

Subgrupos:	G1 — H1	G2 — H2	G3 — H3	G4 — H4
Día 0:	Emulsión de 0.1 ml de extracto de <i>L. hertigi</i> (7.4 µg N/ml) en 0.1 ml de coadyuvante incompleto de Freund	0.1 ml de extracto de <i>L. hertigi</i> (7.4 µg N/ml) en 0.1 ml de solución salina	Emulsión de 0.1 ml de solución salina y 0.1 ml de coadyuvante incompleto de Freund	Solución salina 0.2 ml
Día 7:	Idem	Idem	Idem	Idem
Día 14:	Idem	Idem	Idem	Idem
Día 49:	Subgrupos G: Inoculación de 13 X 10 ⁹ promastigotos de <i>L. mexicana</i> a todos los hamsters Subgrupos H: Inoculación de 13 X 10 ⁶ promastigotos de <i>L. braziliensis</i> a todos los hamsters			

Para el método de inmunolectroforesis se usaron láminas de vidrio de 2.5 x 7.5 cm con 7 ml de agarosa en forma similar a las anteriores. Se usó solución tampón de barbituratos de fuerza iónica 0.05 y pH 8.2. La electroforesis de cada antígeno se dejó correr por 2 horas y 30 minutos con una intensidad de corriente de 8 miliamperios por lámina, según el método de CROWLE³. Una vez finalizada la electroforesis se adicionó el antisuero correspondiente y se dejó reaccionar por dos días en cámara húmeda.

Las láminas se lavaron por dos días en salina tamponada y una noche en agua destilada. Se tiñeron 5 minutos en "Amido Black" y se aclararon con ácido acético al 5%.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos con promastigotos vivos de *L. hertigi* contra la infección con *L. mexicana* sólo mostraron un retraso de 12 semanas en la aparición de las lesiones cuando los hamsters recibieron la vacuna con coadyuvante. También hubo un retraso, aunque menor (8 semanas), cuando recibieron sólo coadyuvante. En los hamsters que recibieron tres dosis de vacuna más coadyuvante las lesiones fueron menores que en los que recibieron una dosis.

Cuando se usaron promastigotos vivos de *L. hertigi* contra la infección posterior con *L. braziliensis*, el retraso fue aún menor (6 semanas) sin mucha diferencia entre los animales con vacuna y coadyuvante y los controles con sólo coadyuvante.

El uso de una dosis de extracto de *L. hertigi* y coadyuvante incompleto de Freund, contra la infección posterior con *L. mexicana* produjo una protección completa en los hamsters al no presentar lesiones ni parásitos demostrables por cultivos, frotis o cortes de tejidos, después de ser observados por 24 semanas. Ni el extracto ni el coadyuvante por separado indujeron esta protección, aunque el coadyuvante solo, produjo un retraso (de unas 10 semanas) en el abultamiento de la lesión.

Cuando se usaron tres dosis de extracto de *L. hertigi* y coadyuvante incompleto de Freund se obtuvo una protección parcial, ya que se observó una pequeña área depilada y engrosada en el dorso de la nariz con un retraso de 18 semanas. En este caso, se observaron amastigotos en los frotis y cortes histológicos así como promastigotos en el cultivo. El coadyuvante solo, si bien produjo un retraso de 10 semanas en el abultamiento de las lesiones, las mismas fueron claramente mayores y levantadas.

El extracto de *L. hertigi* junto con coadyuvante incompleto contra la inoculación posterior con *L. braziliensis* sólo produjo un retraso en la manifestación de las lesiones pero luego no hubo mucha diferencia en el tamaño con los animales controles. En cuatro animales de experimentos diferentes se observaron metástasis en las patas y/o rabo. Dos de ellos inoculados con *L. mexicana* y los otros dos con *L. braziliensis*, correspondiendo en este último caso a animales que recibieron tres inyecciones de coadyuvante completo.

Todas las pruebas intradérmicas de Montenegro fueron positivas en todos los grupos, 20 semanas después de efectuada la infección aún en el grupo en el que las lesiones nunca se manifestaron.

En las pruebas de inmunodifusión se observó un arco en común entre *L. hertigi* y *L. braziliensis*, cuando se usó antisuero contra *L. hertigi*, asimismo entre *L. mexicana* y *L. hertigi* cuando se usó un antisuero contra *L. mexicana*. Esas bandas en común son diferentes para cada caso, tanto por inmunodifusión como por inmunoelectroforesis.

DISCUSION

La respuesta a la inmunización en nuestros experimentos, demostró que un extracto de promastigotos de *L. hertigi* fue eficaz cuando se usó con coadyuvante incompleto de Freund y el organismo infectante fue *L. mexicana*. Este fue el único caso en que la protección fue completa, ya que no hubo lesión aparente ni presencia de parásitos. El extracto sin coadyuvante pasa sin dejar huella porque no permanece y no da tiempo para que se desarrolle la respuesta inmune. PRESTON & DUMONDE¹³ sugieren que los parásitos infectantes son destruidos por la interacción de linfocitos y macrófagos mientras que el anticuerpo tiene un papel cooperativo en el animal inmune. BRYCESON et al.² obtuvieron una protección total en cobayos cuando inyectaron en las patas de las patas una mezcla de extracto soluble e insoluble de *L. enriettii* y coadyuvante incompleto de Freund y una protección parcial, una pequeña úlcera a las seis semanas que curó espontáneamente, con extracto soluble e insoluble de *L. enriettii* y coadyuvante incompleto de Freund.

En nuestros experimentos se observó una protección parcial manifestada por una lesión menor o discreta inducida por tres dosis de extracto y coadyuvante incompleto, frente a una infección posterior con *L. mexicana*. En este caso el desarrollo de la respuesta humoral pudo ocurrir primero con la subsecuente depresión parcial de la respuesta celular. Con promastigotos vivos de *L. hertigi* los resultados fueron diferentes. En los experimentos realizados tratando de inmunizar con una y tres dosis de promastigotos vivos y coadyuvante completo de Freund, contra una infección pos-

terior con *L. mexicana*, no se obtuvo gran diferencia. Las lesiones sufrieron apenas un retraso similar en ambos casos, así como también cuando se usó el coadyuvante solo, lo cual puede ser atribuido al efecto inespecífico de éste por sí mismo.

En los experimentos en que se utilizó *L. braziliensis* para producir una infección no hubo diferencias importantes en el uso de una o de tres dosis de vacuna, ya fuera con promastigotos vivos o con extracto.

El hecho de que en nuestros experimentos los hamsters infectados con *L. braziliensis* presentaran lesiones metastásicas comprobadas parasitológicamente, podría ser explicado como un efecto producido por el coadyuvante completo de Freund, probablemente porque deprimió la respuesta del huésped, quizás por exceso de dosis¹¹. La falta de diseminación de los miembros del complejo "braziliensis" con la consecuente producción de metástasis en contraste con los del complejo "mexicana", es un hecho generalmente aceptado^{6,15}.

El hecho de que la prueba intradérmica de Montenegro fuera positiva también en el grupo en que se obtuvo una protección completa señala que algunos parásitos de *L. mexicana* logran sensibilizar linfocitos específicos capaces de producir una reacción de hipersensibilidad retardada.

Los resultados obtenidos por inmunodifusión demuestran la presencia de una banda en común entre *L. hertigi* y *L. mexicana* aunque también existe otra banda en común, que se muestra diferente, entre *L. hertigi* y *L. braziliensis*. SCHNEIDER¹⁴ encontró por inmunodifusión que *L. hertigi* presenta mayor relación y reacciones más intensas con *L. mexicana* que con *L. braziliensis*. HERRER⁴ no obtuvo protección con *L. hertigi* contra *L. braziliensis* y consideró que se debía a una ausencia de relación inmunológica entre ellas. No obstante, una relación inmunológica demostrada *in vitro* o aún *in vivo*, como la prueba cruzada de Montenegro, no nos indica que los antígenos comunes en juego son los mismos que intervienen en el proceso inmunitario que rechaza la infección.

Nuestro trabajo confirma la necesidad de realizar más estudios inmunológicos y parasitológicos en la búsqueda de una vacuna eficaz

contra la leishmaniasis. El hecho de que en nuestro Continente las diferentes cepas o subespecies muestran variadas características, dificulta más aún este propósito.

SUMMARY

Vaccination of hamsters with *Leishmania hertigi* against subsequent infection by *L. mexicana* and *L. braziliensis*

A vaccine of live *Leishmania hertigi* promastigotes, with Freund's complete adjuvant, produced only partial immunity in hamsters inoculated with *L. mexicana* and *L. braziliensis* (retardation in the appearance of the lesions). On the other hand, an extract of *L. hertigi* with incomplete adjuvant produced total immunity against *L. mexicana* and one dose was more affective than three; there was only a retardation in the appearance of the lesions in the case of *L. braziliensis*. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis showed that there was at least one common band between *L. hertigi* and the two human parasites.

REFERENCIAS

1. BRAY, R. S. & LAINSON, R. — The immunology and serology of leishmaniasis IV. Results of Ouchterlony double diffusion tests. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60: 605-609, 1966.
2. BRYCESON, A. D. M.; BRAY, R. S.; VOLFSTEN-CROFF, R. A. & DUMONDE, D. C. — Immunity in cutaneous leishmaniasis of the guinea pig. *Clin. Exp. Immunol.* 7: 301-341, 1970.
3. CROWLE, A. J. — Immunoelectrophoresis. In: *Immunodiffusion*. New York, Academic Press, 1961, p. 86-93.
4. HERRER, A. — *Leishmania hertigi* sp.n., from the tropical porcupine, *Coendou rothschildi* Thomas. *J. Parasitol.* 57: 626-629, 1971.
5. LAINSON, R. & BRAY, R. S. — Studies on the immunology and serology of leishmaniasis. II Cross-immunity experiments among different forms of American cutaneous leishmaniasis in monkeys. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60: 526-531, 1966.
6. LAINSON, R. & SHAW, J. J. — Las leishmaniasis y la leishmaniasis del nuevo mundo con particular referencia al Brasil. *Bol. Ofic. San. Panam.* 76: 93-114, 1974.
7. LAINSON, R. & SHAW, J. J. — Leishmaniasis in Brazil. XIII Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with *Leishmania mexicana mexicana*, *L. m. amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. b. guyanensis*, and *L. b. panamensis*. *J. Trop. Med. Hyg.* 80: 29-35, 1977.
8. LANG, C. A. — Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological materials. *Anal. Chem.* 30: 1692-1694, 1958.
9. MANUEL, J.; BEHIN, R.; BIROM, N. & DOYLE, J. J. — Survival and death of *Leishmania* in macrophages. In: *Parasites in the Immunized Host: mechanism of survival* p. 225-238. Ciba Foundation Symposium 25. Elsevier, Excerpta Medica, North Holland, 1974.
10. NEAL, R. A.; GARHAM, P. C. C. & COHEN, S. — Immunization against protozoal diseases. *Brit. Med. Bull.* 25: 194-201, 1969.
11. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD — Coadyuvantes inmunológicos. Informe de un Grupo Científico de la OMS, Serie de Inf. Tecn. 595, 43 pp., 1976.
12. PRESTON, P. M. & DUMONDE, D. C. — Immunogenicity of a ribosomal antigen of *Leishmania enriettii*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 18-19, 1971.
13. PRESTON, P. M. & DUMONDE, D. C. — Immunology of Clinical and Experimental Leishmaniasis. In: *Immunology of Parasitic Infections*. New York, 1976, 167-202.
14. SCHNEIDER, C. R. — Immunodiffusion studies on skin-inhabiting *Leishmania* from the tropical porcupine *Coendou rothschildi* Thomas. *J. Parasitol.* 54: 638-639, 1968.
15. SCHNUR, L. J. — The dissemination of American slow and fast Leishmaniasis in Syrian hamsters. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70: 277-278, 1976.
16. ZELEDÓN, R.; PONCE, C. & PONCE, E. de — Finding of *Leishmania hertigi* in the Costa Rican porcupine. *J. Parasitol.* 63: 116-117, 1977.

Recebido para publicação em 19/11/1979.