

ESTUDIO INMUNOHISTOPATOLÓGICO DEL BAZO DE RATONES DEPLECIONADOS DE LINFOCITOS T (CD4⁺ Y CD8⁺) E INFECTADOS POR *CHLAMYDOPHILA ABORTUS*

Immunohistopathologic study of the spleen of T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺)-depleted mice infected with *Chlamydomphila abortus*

C.M. Martínez*, A.J. Buendía, J. Sánchez

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30100-Murcia (España).

Autor de referencia: Carlos Manuel Martínez, Teléfono: 968-364704-Fax: 968-364147, Email: cmmarti@um.es

RESUMEN

Múltiples estudios han establecido los mecanismos de respuesta inmune innata frente a la infección por *Chlamydomphila abortus*. Sin embargo, poco se conoce en relación al papel que desempeña la inmunidad específica en la respuesta primaria frente a la infección clamidial. El objetivo de este estudio ha sido valorar las lesiones histopatológicas que provoca la infección por *C. abortus* en el bazo, utilizando un modelo de infección intraperitoneal por *C. abortus* en ratones deplecionados de linfocitos T CD4⁺ y/o T CD8⁺. Los animales deplecionados de linfocitos T CD8⁺ mostraron una mortalidad del 100% al día 12 post infección, mientras que los deplecionados de T CD4⁺ y los doble deplecionados no mostraron mortalidad y la morbilidad fue escasa en comparación con el grupo control no deplecionado. Los animales no deplecionados y deplecionados de linfocitos T CD8⁺ mostraron una desorganización del parénquima esplénico al día 6 p.i., aunque la cantidad de antígeno clamidial detectada fue similar en todos los grupos. Los animales deplecionados de linfocitos T CD8⁺, mostraron un nivel de apoptosis significativamente superior en comparación el resto de grupos. Estos resultados sugieren que la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ es esencial para la resolución de la infección clamidial y que su falta produce una exacerbación de la respuesta inmune Th1 promovida por los linfocitos T CD4⁺, con lo que podrían ejercer una función reguladora de la respuesta adquirida frente a la primoinfección por *C. abortus*.

Palabras clave: Ratón, *Chlamydomphila*, Depleción, Linfocitos, Bazo, Histopatología.

ABSTRACT

Several studies have established the innate immune response mechanisms against *Chlamydomphila abortus* infection, but little is known about the role of the cellular immunity in *C. abortus* primary infection. The pur-

pose of this work was to study the histopathological changes caused by *C. abortus* infection in the spleen in a murine intraperitoneal infection model in mice depleted of CD4⁺ T and/or CD8⁺ T cells. CD8⁺ T depleted mice showed 100% mortality rates at day 12 post infection (p.i.). In contrast, CD4⁺ T and CD4⁺ T /CD8⁺ T depleted mice showed no mortality rates at day 12 p.i. and morbidity was lower than that in non depleted control group. CD8⁺ T depleted mice and non depleted control mice showed a splenic parenchymal disorganization at day 6 p.i., and immunohistochemical *C. abortus* antigen detection revealed that all groups showed similar antigen distribution. CD8⁺ T depleted mice showed significant high rates of apoptosis. This results suggest that CD8⁺ T cells are essential for resolution of clamidial infection. The lack of this subpopulation leads to an exacerbate Th1 immune response caused by CD4⁺ T cells. CD8⁺ T cells could act as an immune regulatory subpopulation against *C. abortus* primary infection.

Key words: Mice, *Chlamydomphila*, Depletion, Lymphocytes, Spleen, Histopathology.

INTRODUCCIÓN

Chlamydomphila abortus (formalmente denominada como serotipo 1 de *Chlamydia psittaci*), es una bacteria intracelular obligada Gram negativa (Everett *et al.*, 1999) responsable del aborto enzoótico de los pequeños rumiantes. En muchos países europeos esta enfermedad es una causa importante de abortos en las cabañas ganaderas de ovino (Buxton y Henderson, 1999; Kampinga *et al.*, 2000) provocando graves pérdidas económicas debido a la pérdida del cordeiro y de la producción láctea del animal que ha abortado. Es también un agente zoonótico que puede provocar abortos a mujeres embarazadas que entran en contacto con animales infectados (Buxton, 1986; Longbottom y Coulter, 2003).

Clásicamente los modelos murinos se han utilizado para el estudio de los mecanismos inmunitarios implicados en la respuesta frente a la infección por este patógeno, (revisado de Kerr *et al.* 2005), al provocar en el ratón abortos a término con un cuadro patogénico y lesional similar al observado en el hospedador natural (Buendía *et al.*, 1998).

Aunque la respuesta inmune innata es importante para el control de la infección clamidial (Buxton *et al.*, 1990; Buendía *et al.*, 1998; 2004; Montes de Oca *et al.*, 2000), la resolución completa de la misma requiere la intervención de la respuesta inmune adquirida mediada por linfocitos T (Ramsey *et al.*, 1988; McCafferty, 1990), y por gamma interferón (γ -IFN), cito-

quina de efecto clamidiostático que contribuye al desencadenamiento de la respuesta Th1 (McCafferty *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1996; Perry *et al.*, 1997; Del Río *et al.*, 2001). Sin embargo, la importancia relativa de cada subpoblación de linfocitos T depende de la especie de la familia *Chlamydiaceae*. De esta manera, se ha demostrado la importancia de la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ en la resolución de la infección por *C. trachomatis* (Morrison *et al.*, 1995; Kelly y Rank, 1997; Morrison *et al.*, 2000), mientras que la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ es esencial para la resolución de las infecciones por *C. pneumoniae* (Penttila *et al.*, 1999; Rotenberg *et al.*, 1999) y por *C. abortus* (Buzonigatel *et al.*, 1992; Martínez *et al.*, 2006), especie en la que esta subpoblación linfocitaria desarrollaría una función reguladora de la respuesta promovida por los linfocitos T CD4⁺ (Martínez *et al.*, 2006).

Múltiples estudios han utilizado el hígado y bazo para el estudio de las lesiones histopatológicas provocadas *C. abortus* en modelos murinos de infección intraperitoneal al ser órganos diana para el desarrollo de la infección (Buendía *et al.*, 1998; 1999). Aunque Martínez *et al.* (2006) estudiaron las variaciones en la evolución de la infección por *C. abortus* mediante la depleción de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, realizaron dicho estudio evaluando las lesiones hepáticas en los animales deplecionados. Sin embargo, no hay estudios previos relativos a la evaluación de las lesiones

inmunohistopatológicas esplénicas provocadas por la infección por *C. abortus* en animales deplecionados.

El objetivo de este trabajo es el estudio de las lesiones inmunohistopatológicas en la evolución de la infección clamidial en un modelo murino de depleción de linfocitos T CD4⁺ y/o T CD8⁺ frente a la primoinfección por *C. abortus* en el bazo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

En este estudio se utilizaron ratones hembra C57BL/6 (H-2^b) considerada como la línea de ratones mas resistente frente a la infección clamidial (Del Río *et al.*, 2001). Los animales, de 8 semanas de edad, fueron adquiridos de Harlan UK Limited (Blackthorn, UK) libres de virus y patógenos comunes de acuerdo a los exámenes realizados por los proveedores.

El experimento se realizó atendiendo dos parámetros: estudio del efecto de la depleción de linfocitos T CD4⁺ y/o T CD8⁺ en la evolución de la infección por *C. abortus* mediante el análisis de la morbilidad y la mortalidad, y análisis de las lesiones provocadas por el patógeno mediante el estudio inmunohistopatológico de los bazos de los animales estudiados.

Para realizar el experimento se utilizaron 112 ratones que fueron divididos en 4 grupos de 28 ratones/grupo. Tres grupos fueron deplecionados mediante la inoculación de anticuerpos monoclonales (AcMo), respectivamente, frente a linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺ y un grupo sometido a una doble depleción de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺. El último grupo se utilizó como control no deplecionado de infección.

Para establecer las variaciones en la morbilidad y mortalidad que la depleción de las diferentes subpoblaciones de linfocitos pudiera provocar, se utilizaron 32 ratones (8 animales de cada grupo), siendo pesados diariamente para establecer la pérdida de peso (morbilidad),

y manteniéndolos en observación para evaluar el porcentaje de mortalidad de los diferentes grupos hasta el día 18 post infección (p.i.), momento en el que se sacrificaron los supervivientes.

Para el análisis inmunohistopatológico de los bazos, se utilizaron 80 ratones (20 animales de cada grupo), que fueron sacrificados en subgrupos de 4 animales los días 3, 6, 10, 14 y 18 p.i.

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia.

Microorganismo e infección

Los animales fueron infectados utilizando la cepa AB7 de *C. abortus*, aislada a partir de un aborto ovino (Salinas *et al.*, 1995). La bacteria fue cultivada en embrión de pollo y valorada mediante el recuento de Unidades Formadoras de Inclusión (UFIs) en células McCoy siguiendo el procedimiento descrito por Buendía *et al.* (1999), siendo posteriormente alicuotada y conservada a -80°C hasta el momento de su uso.

Los ratones fueron infectados mediante inoculación intraperitoneal de 10⁶ UFIs de *C. abortus* en 0,2ml de solución 0,1M de tampón fostato salino (PBS), pH 7,2.

Depleción in vivo de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺

Los AcMo utilizados para la depleción *in vivo* de los animales, fueron obtenidos a partir de células de hibridoma de los clones GK 1.5 (anti-CD4) y 2.43 (anti-CD8), adquiridos de la American Type Culture Collection a partir del líquido ascítico de ratones homocigóticos (Harlan) estimulados con pristano a los que se les inyectó 10⁷ células de hibridoma. Los anticuerpos fueron concentrados por precipitación con sulfato de amonio a saturación seguido de una diálisis y filtración utilizando un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro. Pos-

teriormente, los anticuerpos fueron purificados por cromatografía con una columna de proteína G (Sigma, Madrid, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración proteica fue estimada mediante el método de Lowry modificado utilizando el procedimiento del ácido 1-bicínconínico y sulfato de cobre (Sigma). Para los experimentos de depleción *in vivo* se utilizó una IgG2a de rata (Sigma) como control de isotipo.

Para la depleción *in vivo* de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ se inyectó vía intraperitoneal 0,5 mg del AcMo anti-CD4 y/o anti-CD8 diluidos en 0,2 ml de PBS durante 3 días consecutivos, administrando las siguientes dosis una vez cada 3 días. La infección se realizó al 5º día de comenzar la depleción. La eficacia de la misma fue evaluada en el momento del sacrificio mediante citometría de flujo de esplenocitos en suspensión, siguiendo el método descrito por Montes de Oca *et al.* (2000), utilizando un AcMo anti-CD4 (clon CT-CD4) y un AcMo anti-CD8 (clon CT-CD8) ambos obtenidos de Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA).

Toma de muestras y procesado

Los animales fueron sacrificados por inhalación de CO₂ en atmósfera saturada, agente inhalatorio recomendado para el sacrificio humanitario de roedores, de acuerdo al Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre.

Se fijó la porción craneal de bazo en formalina al 10% tamponada en PBS para su estudio inmunohistopatológico y determinación del grado de apoptosis celular, mientras que la porción caudal se utilizó para la obtención de esplenocitos en suspensión, para evaluar la eficacia de la depleción en los distintos modelos mediante análisis por citometría de flujo.

Inmunohistopatología

Las muestras de bazo de los animales sacrificados fueron fijadas en formalina tamponada

al 10% en PBS durante 48 horas. Las muestras ya fijadas fueron deshidratadas e incluidas en parafina a 56°C, cortándose secciones de 4 µm de las muestras incluidas.

Las secciones fueron teñidas con la técnica de hematoxilina-eosina (H-E) para examen histopatológico. Paralelamente se realizó una técnica inmunohistoquímica para comprobar la presencia de antígeno clamidial en secciones por parafina, descrita previamente por Buendía *et al.* (1999), utilizando un anticuerpo policlonal (AcPo) frente a *C. abortus* (Abcam, Paris, Francia).

La apoptosis celular se puso de manifiesto mediante la técnica TUNEL (DeadEnd™ colorimetric TUNEL system (Promega Corporation, Madison, WI, USA)) en las secciones de bazo de 4 animales de cada grupo infectados al día 6 p.i., evaluando su incidencia en cada bazo determinando el número de células positivas presentes en 20 campos de 17000 µm². Realizado el conteo, se calculó la media para cada ratón. Para evaluar el grado de significación entre los diferentes grupos se realizó un test de análisis de varianza (ANOVA).

Los experimentos fueron repetidos dos veces para asegurar la repetibilidad de los resultados.

RESULTADOS

Eficacia de la depleción de las subpoblaciones linfoides

Se confirmó que los bazos de los animales deplecionados de las subpoblaciones linfocitarias tenían menos del 10% de linfocitos TCD4⁺ y/o T CD8⁺ en comparación con el grupo control.

Efecto de la depleción de las subpoblaciones linfocitarias en la evolución de la infección por *C. abortus*

Mortalidad

La infección por *C. abortus* en los grupos: no deplecionado, deplecionado de linfocitos T

CD4⁺ y sometidos a doble depleción no provocó mortalidad durante toda la experiencia. Sin embargo, el grupo de ratones deplecionados de linfocitos T CD8⁺ comenzó a registrar cifras de mortalidad a partir del día 6 p.i., llegando a un 100% de muertes en el grupo al día 12 p.i.

Morbilidad

La sintomatología que presentó a partir del día 1 p.i. el grupo de ratones infectados con *C. abortus* y no deplecionados, se caracterizó por un síndrome febril con apatía, letargia, pelo erizado, conjuntivitis y pérdida de peso, siendo utilizado este parámetro como factor cuantitativo de la morbilidad (Fig. 1).

El grupo control sufrió una progresiva pérdida de peso hasta el día 7 p.i., momento en el

cual comenzaron a remitir los síntomas, logrando una recuperación completa del peso corporal al día 10-11 p.i. El grupo de ratones deplecionados de linfocitos T CD4⁺ experimentó una pérdida de peso similar a la de los animales del grupo control hasta el día 5 p.i., momento en que comenzaron a remitir los síntomas y ganar peso hasta la completa recuperación al día 9-10 p.i. El grupo de ratones deplecionados de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ experimentó un inicio de la sintomatología y pérdida de peso similar al grupo de animales deplecionados de linfocitos T CD4⁺ hasta el día 7 p.i., momento en que estos animales no experimentaron pérdida de peso, aunque tampoco lograron recuperar su peso original durante toda la experiencia.

El grupo de ratones deplecionados de linfocitos T CD8⁺ mostró una pérdida de peso más

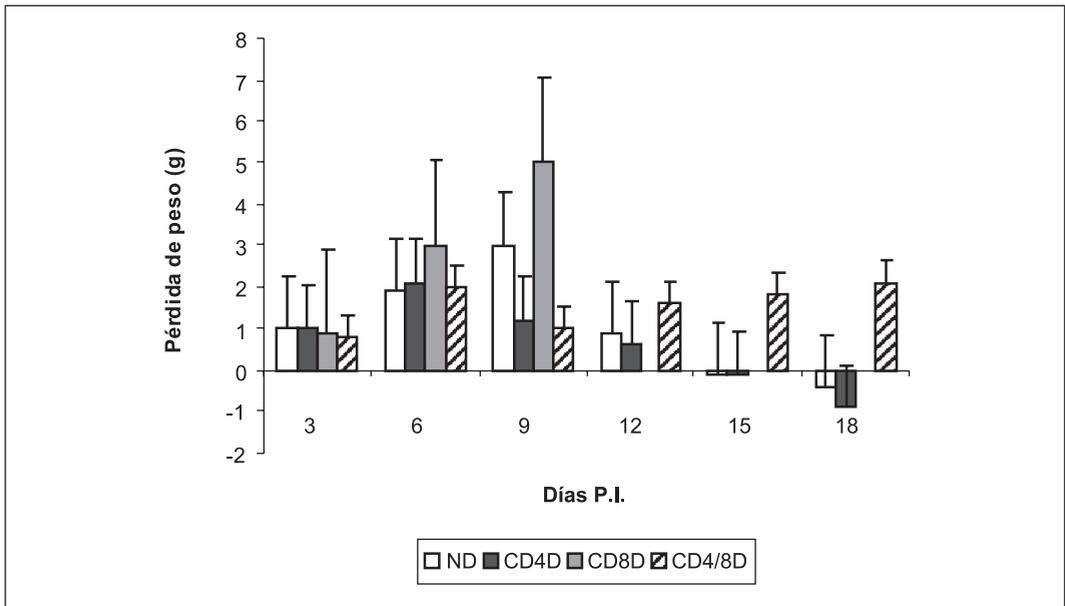


Figura 1. Evolución de la pérdida de peso de los distintos grupos de animales frente a la infección por *C. abortus*. Los cambios en el peso corporal fueron registrados diariamente en los grupos de animales control no deplecionados (ND), deplecionados de linfocitos T CD4⁺ (CD4D), T CD8⁺ (CD8D) y sometidos a doble depleción CD4/CD8 (CD4/8D). Datos expresados como la media de las pérdidas de peso registradas por grupo (8 animales/grupo), con una desviación estándar para 8 ratones.

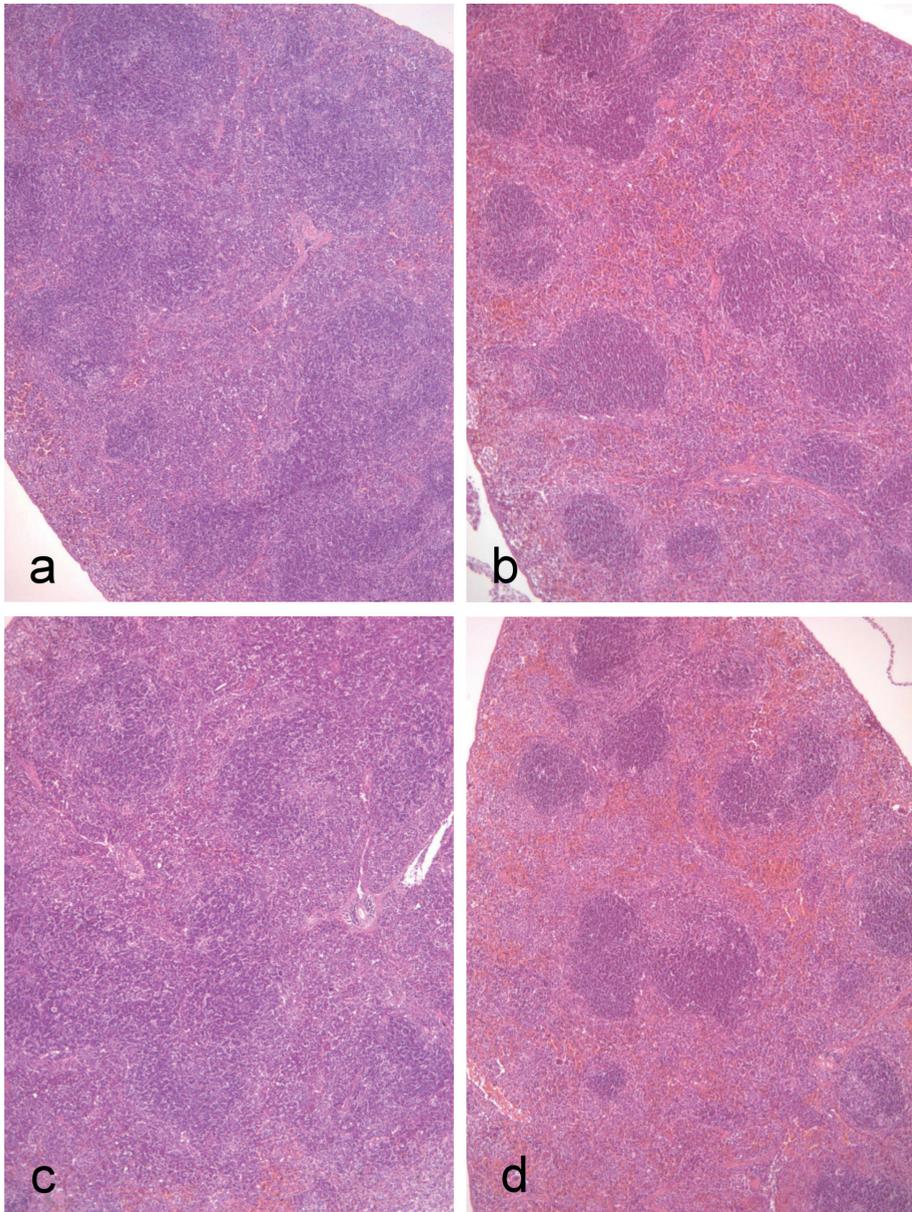


Figura 2. Cuadro lesional de secciones de bazo de ratones infectados con *C. abortus* y sacrificados a los 6 días p.i. Ratones control no deplecionados (a), ratones deplecionados de linfocitos T CD4⁺ (b), ratones deplecionados de linfocitos T CD8⁺ (c) y ratones sometidos a una doble depleción de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ (d). Los grupos de ratones control no deplecionados (a) y deplecionados de linfocitos T CD8⁺ (c) mostraron una evidente desorganización de la arquitectura esplénica, mientras que en el grupo deplecionado de linfocitos T CD4⁺ (b) y el grupo sometido a doble depleción (d) se mantuvo la arquitectura del órgano. a, b, c y d H-E x50.

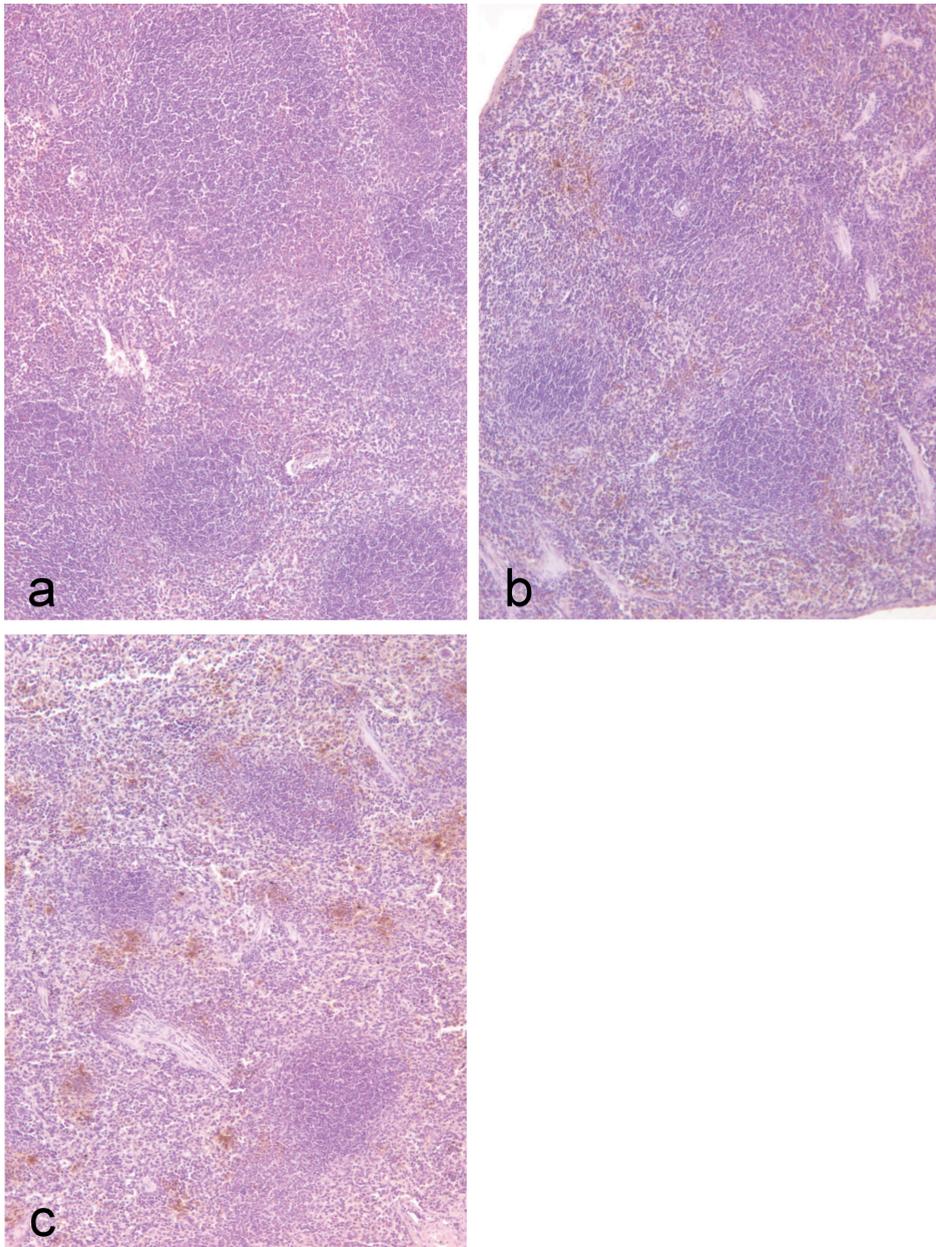


Figura 3. Presencia de antígeno clamidial en secciones de bazo de animales infectados con *C. abortus* y sacrificados a los 18 días p.i. Ratones control no deplecionados (a), deplecionados de linfocitos T CD4⁺ (b) y animales sometidos a una doble depleción de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ (c). Los animales deplecionados (b y c) presentaron mayor cantidad de antígeno clamidial en comparación con el grupo control no deplecionado (a) localizado en el área marginal de la pulpa roja. a, b y c AcPo anti-*C. abortus*. ABC-hematoxilina x100.

manifiesta del día 3 al día 7 p.i., momento que coincide con el comienzo de las muertes de los animales de este grupo.

Inmunohistopatología

El análisis histopatológico de los bazos con la tinción de H-E, no reveló cambios histopatológicos evidentes a los 3 días p.i. en los animales control no deplecionados ni en los deplecionados, detectándose pequeños acúmulos de PMNs en las proximidades de las vainas linfoides periarteriolas y áreas próximas a la cápsula esplénica. La inmunohistoquímica frente a antígeno de *C. abortus* mostró células inmuno-activas, principalmente PMNs y macrófagos, en el área marginal y en la pulpa roja.

Al día 6 p.i., los bazos de los animales no deplecionados (Fig. 2a) presentaron una evidente alteración de la arquitectura del parénquima

esplénico, con una pérdida de definición entre pulpa roja y pulpa blanca. Esta pérdida de definición se debió a la presencia de un infiltrado difuso de PMNs y macrófagos en la pulpa roja, mientras que los grupos deplecionados de linfocitos T CD4⁺ (Fig. 2b) y el sometido a doble depleción (Fig. 2c) no presentaron esa desorganización. Los animales deplecionados de linfocitos T CD8⁺ (Fig. 2d), presentaron lesiones histopatológicas similares a las del grupo control no deplecionado.

La inmunohistoquímica confirmó la presencia de antígeno clamidial en todos los grupos, localizándose en la pulpa roja y área marginal, y no se observaron diferencias ni en la cantidad ni en la distribución del antígeno.

Con la tinción de H-E los bazos de los animales sacrificados a los 10 y 14 días p.i. no presentaron lesiones histopatológicas evidentes, pero se localizó antígeno clamidial en las áreas

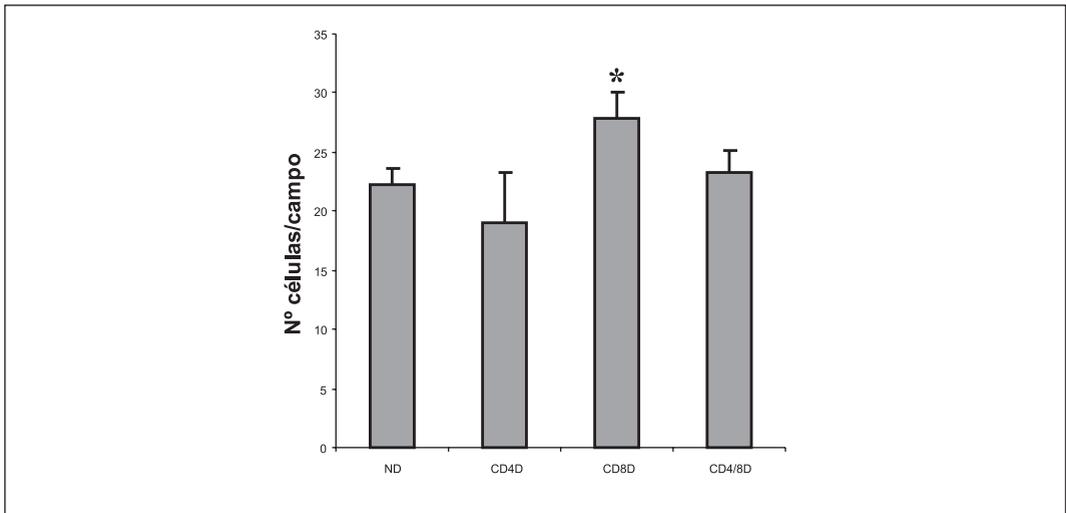


Figura 4. Número de células apoptóticas presentes en el parénquima en secciones de bazo al día 6 p.i. de los distintos grupos de animales. Se observó que el grupo de animales deplecionados de linfocitos T CD8⁺ (CD8D) presentó un elevado número de células apoptóticas en comparación con los grupos control no deplecionado (ND) y deplecionado de linfocitos T CD4⁺ (CD4D), mientras que el grupo sometido a doble depleción (CD4/8D) mostró un leve incremento en comparación con el grupo control. Los resultados muestran la media del número de células positivas registradas en los bazos de cada grupo (4 animales/grupo), con una media y desviación estándar para 4 ratones. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre el grupo control y el grupo deplecionado.

marginales de la pulpa roja en todos los grupos, aunque en mayor cantidad en los animales deplecionados en comparación con el grupo control.

De la misma forma, los animales sacrificados al día 18 p.i. no registraron lesiones histopatológicas evidentes, presentando muy poca cantidad de antígeno en el área marginal en los grupos control no deplecionado (Fig. 3a) y deplecionado de linfocitos T CD4⁺ (Fig. 3b). Los bazos del grupo de animales sometido a doble depleción presentaron cantidades moderadas de antígeno con la misma localización (Fig. 3c).

Análisis de la apoptosis celular

Paralelamente, se analizó en qué medida la depleción de linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺ o ambas subpoblaciones provocaba cambios en el grado de apoptosis celular, un mecanismo de defensa frente a la infección por patógenos intracelulares. Para evaluar estos cambios en los distintos grupos deplecionados, se utilizó la técnica TUNEL al día 6 p.i., día previo al inicio de las muertes en el grupo de ratones deplecionados de linfocitos T CD8⁺.

Los animales deplecionados de linfocitos T CD8⁺ registraron un aumento significativo en el número de apoptosis celulares en comparación con el resto de grupos (Fig. 4), localizándose estas principalmente en la zona marginal y pulpa roja. El grado de apoptosis registrado en los animales deplecionados de linfocitos T CD4⁺ fue inferior en comparación con el resto de grupos, mostrando los animales sometidos a doble depleción un leve incremento de apoptosis en comparación con el grupo no deplecionado.

DISCUSIÓN

En este trabajo se han analizado las lesiones inmunohistopatológicas que presenta el parénquima esplénico en un modelo murino no gestante de depleción de linfocitos T frente a la infección por *C. abortus*, utilizando ratones de la línea C57BL/6.

La similitud del cuadro inmunohistopatológico observado en los cuatro grupos de animales al día 3 p.i., sugiere que el control temprano de la infección clamidial es dependiente de la respuesta inmune innata, como previamente describieron Buendía *et al.* (1998; 1999; 2004).

Sin embargo al día 6 p.i. el curso de la infección y el cuadro histopatológico variaron en función de la subpoblación linfoide deplecionada.

La baja morbilidad y la ausencia de mortalidad observadas en el grupo de animales deplecionados de linfocitos T CD4⁺ sugiere que la infección cursó de un modo menos severo en este grupo, logrando la resolución de la infección al día 18 p.i. La ausencia de alteraciones en la arquitectura del parénquima esplénico, así como el bajo número de apoptosis detectado avalan esta afirmación. Estos resultados sugieren que la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ no es esencial para la resolución de la infección clamidial, si bien su falta provocaría un ligero retraso en la resolución de la misma, como demuestra la presencia de mayor cantidad de antígeno clamidial en los bazos de estos animales en comparación con el grupo no deplecionado los días 10 y 14 p.i. Este resultado contrasta con los obtenidos en modelos murinos de infección por *C. trachomatis* (Kelly y Rank, 1997; Morrison *et al.*, 2000), en los que esta subpoblación es esencial para la resolución del cuadro infeccioso.

Sin embargo la depleción de linfocitos T CD8⁺ cursó de un modo más severo, como muestra la elevada morbilidad y el 100% de mortalidad registrados. Aun cuando se observó un grado de desorganización del parénquima esplénico similar al del grupo control, en este grupo se detectó un incremento significativo en el grado de apoptosis celular que podría ser debido al efecto de una multiplicación incontrolada del microorganismo. Ojcius *et al.* (1998), mediante estudios *in vitro*, describieron la capacidad de *C. psittaci* para inducir apoptosis de las células infectadas. No obstante, no parece

probable que el alto grado de apoptosis detectado sea debido exclusivamente a la excesiva multiplicación de la bacteria puesto que todos los grupos presentaron una cantidad similar de antígeno clamidial al día 6 p.i. con la misma localización. En conjunto, los resultados obtenidos en este grupo indican que la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ es esencial para la resolución de la primoinfección, y que su falta, provoca un agravamiento general del cuadro clínico y lesional que padecen los animales. La importancia de esta subpoblación para la resolución de infecciones clamidiales ha sido descrito para varias especies del género *Chlamydomphila*, tanto en un modelo de infección secundaria por *C. abortus* (Buzoni-Gatel *et al.*, 1992), como en modelos murinos de infección provocados por *C. pneumoniae* (Yang *et al.*, 1996; Penttila *et al.*, 1999).

Hipotéticamente, debería esperarse un agravamiento del cuadro clínico y lesional en los animales sometidos a una doble depleción de linfocitos T CD4 y T CD8. Sin embargo en este grupo de animales la infección cursó de un modo poco severo, como lo demuestra la ausencia de mortalidad, aunque no lograron recuperar su peso corporal durante toda la experiencia. Los hechos más llamativos lo constituyen la ausencia de desorganización del parénquima esplénico y unos niveles similares de apoptosis en comparación con el grupo control, aunque la inmunohistoquímica reveló moderadas cantidades de antígeno clamidial en el área marginal de la pulpa roja. La cantidad de antígeno encontrada y la falta de recuperación de peso corporal de los animales durante toda la experiencia sugieren que la falta de las subpoblaciones de linfocitos T, necesarias para la resolución clamidial, induce a una cronificación de la infección. Otros modelos de depleción también observaron este resultado utilizando diferentes especies de *Chlamydia*. McCafferty *et al.*, (1994) observaron elevados niveles de aislamiento al día 5 p.i. en ratones atímicos infectados con *C. psittaci* en comparación con un grupo control

de ratones tímicos, y Rottenberg *et al.*, (1999) observaron que ratones deplecionados de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ e infectados con *C. pneumoniae* presentaban aislamiento positivo al día 60 post infección.

Comparando estos resultados con los obtenidos en los otros grupos se advierte que la severidad del cuadro clínico y lesional no se refleja en aquellos grupos de animales deplecionados de linfocitos T CD4⁺. Se podría, por tanto, sugerir que en ausencia de linfocitos T CD8⁺ se pudiese producir una exacerbación de la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ que provocase un agravamiento del cuadro inflamatorio que padecen los animales. Los estudios realizados por Liesenfeld *et al.*, (1996) y Gavrilescu y Denkers (2001), en un modelo de infección aguda por *Toxoplasma gondii*, establecieron que una excesiva respuesta provocada por los linfocitos T CD4⁺ se traducía en un incremento muy elevado de la síntesis de γ -IFN, una citoquina que, a pesar de ser esencial para la resolución de la infección clamidial por su poderoso efecto clamidiostático (Rottenberg *et al.*, 2002), múltiples estudios han establecido que a elevadas dosis puede tener efectos citotóxicos induciendo la apoptosis celular (Dijkman *et al.*, 1990; Morita *et al.*, 1995; Kano *et al.*, 1997). Martínez *et al.* (2006), establecieron en un modelo murino de infección por *C. abortus* que durante la respuesta inmune celular la síntesis de γ -IFN era en su mayoría CD4-dependiente, por lo que los daños histopatológicos observados en los animales deplecionados de linfocitos T CD8⁺ podrían estar provocados por una excesiva síntesis de esta citoquina producida por los linfocitos T CD4⁺.

Una interesante hipótesis establecería una función adicional de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ como elementos reguladores de la subpoblación de linfocitos T CD4⁺. Diversos estudios han establecido la presencia de poblaciones de linfocitos T CD8⁺ con funciones reguladoras de los linfocitos T CD4⁺ a través de varios mecanismos:

Interacción con las células APC a través del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (CMH-I), induciendo la inhibición de la síntesis de moléculas coestimuladoras de los linfocitos T CD4⁺ (Liu *et al.*, 1997).

Liberación de citoquinas, como IL-6 o la IL-10, impidiendo la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ (Filaci *et al.*, 2001; Gilliet *et al.*, 2002).

Induciendo la destrucción de linfocitos T CD4⁺, ya sea por un mecanismo de reconocimiento específico de cadenas TCR V β o péptidos derivados del CMH-Ib (Qa-1) (Jiang *et al.*, 1995), o bien por un mecanismo Fas/FasL dependiente (Noble *et al.*, 1998).

Nuestros resultados muestran que los linfocitos T CD8⁺ constituyen la subpoblación esencial para la resolución de la infección por *C. abortus*, y que además de la función citotóxica que desempeñan, podrían ejercer una función reguladora en la respuesta inmune frente a este patógeno. Son necesarios más estudios para desentrañar el mecanismo regulador de esta subpoblación linfoide para el control de la resolución clamidial, información muy valiosa de cara a la elaboración de vacunas efectivas frente a la infección natural.

BIBLIOGRAFÍA

- Buendía, A.J., Sánchez, J., Martínez, M.C., Cámara, P., Navarro, J.A., Rodolakis, A., Salinas, J. 1998. Kinetics of infection and effects on placental cell population in murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infect. Immun.* 66: 2128-2134.
- Buendía, A.J., Montes de Oca, R., Navarro, J.A., Sánchez, J., Cuello, F., Salinas, J. 1999. Role of polymorphonuclear neutrophils in a murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infect. Immun.* 67: 2110-2116.
- Buendía, A. J., Martínez, C. M., Ortega, N., Del Río, L., Caro, M. R., Gallego, M. C., Sánchez, J., Navarro, J. A., Cuello, F., Salinas, J. 2004. Natural killer (NK) cells play a critical role in the early innate immune response to *Chlamydomphila abortus* infection in mice. *J. Comp. Pathol.* 130: 48-57.
- Buxton, D. 1986. Potential danger to pregnant women of *Chlamydia psittaci* from sheep. *Vet. Rec.* 118: 510-511.
- Buxton, D., Barlow, R.M., Finlayson, J., Anderson, I.E., Mackellar, A. 1990. Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep. *J. Comp. Pathol.* 102: 221-237.
- Buxton D., Henderson, D. 1999. Infectious abortion in sheep. *In Practice* 21: 360-368.
- Buzoni-Gatel, D., Guilloteau, L., Bernard, F., Chardes, T., Rocca, A. 1992. Protection against *Chlamydia psittaci* in mice conferred by Lyt-2⁺ cells. *Immunology.* 77: 284-288.
- Del Río, L., Buendía, A.J., Sánchez, J., Gallego, M.C., Caro, M.R., Ortega, N., Seva, J., Pallarés, F.J., Cuello, F., Salinas, J. 2001. Endogenous IL-12 is not required for resolution of *Chlamydomphila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) Infection in mice. *Infect. Immun.* 69: 4808-4815.
- Dijkmans, R., Van Damme, J., Cornette, F., Heremans, H., Billiau, A. 1990. Bacterial lipopolysaccharide potentiates gamma interferon-induced cytotoxicity for normal mouse and rat fibroblasts. *Infect. Immun.* 58: 32-36.
- Everett, K.D.E., Bush, R.M., Andersen, A.A. 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae* with description of five new species, and standards for identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 415-440.
- Filaci, G., Bacilieri, S., Fravega, M., Monetti, M., Contini, P., Ghio, M., Setti, M., Puppo, F., Indiveri, F. 2001. Impairment of CD8⁺ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 166: 6452-6457.

- Gavrilescu, L.C., Denkers, E.Y. 2001. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 167: 902-909.
- Gilliet, M., Liu, Y.J. 2002. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195: 695-704.
- Jiang, H., Ware, R., Stall, A., Flaherty, L., Chess, L., Pernis, B. 1995. Murine CD8⁺ T cells that specifically delete autologous CD4⁺ T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule. *Immunity.* 2: 185-194.
- Kampinga G.A., Schröder, F.P., Visser, I.J., Anderson, J.M., Buxton, D., Moller, A.V. 2000. Lambing ewes as a source of severe psittacosis in a pregnant woman. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 144: 2500-2504.
- Kano, A., Watanabe, Y., Takeda, N., Aizawa, S., Akaike, T. 1997. Analysis of IFN-gamma-induced cell cycle arrest and cell death in hepatocytes. *J. Biochem.* 121: 677-683.
- Kelly, K.A., Rank, R.G. 1997. Identification of homing receptors that mediate the recruitment of CD4 T cells to the genital tract following intravaginal infection with *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 65: 5198-5208.
- Kerr, K., Entrican, G., McKeever, D., Longbottom, D. (2005). Immunopathology of *Chlamydia abortus* infection in sheep and mice. *Res. Vet. Sci.* 78:1-7.
- Liesenfeld, O., Kosek, J., Remington, J.S., Suzuki, Y. 1996. Association of CD4⁺ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 184: 597-607.
- Liu, Y., Wenger, R.H., Zhao, M., Nielsen, P.J. 1997. Distinct coestimulatory molecules are required for the induction of effector and memory cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 185: 251-262.
- Longbottom, D., Coulter, L.J. 2003. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J. Comp. Pathol.* 128: 217-244.
- Martínez, C.M., Buendía, A.J., Sánchez, J., Ortega, N., Caro, M.R., Gallego, M.C., Navarro, J.A., Cuello, F., Salinas, J. 2006. Relative importance of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the resolution of *Chlamydia abortus* primary infection in mice. *J. Comp. Path.* 134: 297-307.
- McCafferty, M.C. 1990. Immunity to *Chlamydia psittaci* with particular reference to sheep. *Vet. Microbiol.* 25: 87-99.
- McCafferty, M.C., Maley, S.W., Entrican, G., Buxton, D. 1994. The importance of interferon- γ in an early infection of *Chlamydia psittaci* in mice. *Immunology.* 81: 631-636.
- Montes de Oca, R., Buendía, A.J., Del Río, L., Sánchez, J., Salinas, J., Navarro, J.A. 2000. Polymorphonuclear neutrophils are necessary for the recruitment of CD8(+) T cells in the liver in a pregnant mouse model of *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. *Infect. Immun.* 68: 1746-1751.
- Morita, M., Watanabe, Y., Akaike, T. 1995. Protective effect of hepatocyte growth factor on interferon-gamma-induced cytotoxicity in mouse hepatocytes. *Hepatology.* 21: 1585-1593.
- Morrison, R. P., Feilzer, K., Tumas, D.B. 1995. Gene knockout mice establish a primary protective role for major histocompatibility complex class II-restricted responses in *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. *Infect. Immun.* 63: 4461-4468.
- Morrison, S.G., Su, H., Caldwell, H.D., Morrison, R.P. 2000. Immunity to murine *Chlamydia trachomatis* genital tract reinfection involves B cells and CD4⁺ T cells but not CD8⁺ T cells. *Infect. Immun.* 68: 6979-6987.
- Noble, A., Pestano, G.A., Cantor, H. 1998. Suppression of immune responses by CD8 cells. I. Superantigen-activated CD8

- cells induce unidirectional Fas-mediated apoptosis of antigen-activated CD4 cells. *J. Immunol.* 160: 559-565.
- Ojcius, D.M., Souque, P., Perfettini, J.L., Dautry-Varsat, A. 1998. Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia psittaci*. *J. Immunol.* 161: 4220-4226.
- Penttila, J.M., Anttila, M., Varkila, K., Puolakkainen, M., Sarvas, M., Makela, P.H., Rautonen N. 1999. Depletion of CD8+ cells abolishes memory in acquired immunity against *Chlamydia pneumoniae* in BALB/c mice. *Immunology.* 97: 490-496.
- Perry, L.L., Feilzer, K., Caldwell, H.D. 1997. Immunity to *Chlamydia trachomatis* is mediated by T helper 1 cells through IFN-gamma dependent and independent pathways. *J. Immunol.* 158: 3344-3352.
- Ramsey, K.H., Soderberg, R.S.F., Rank, R.G. 1988. Resolution of chlamydial genital infection in B-cell-deficient mice and immunity to reinfection. *Infect. Immun.* 56: 1320-1325.
- Rottenberg, M.E., Gigliotti Rothfuchs, A.C., Gigliotti, D., Svanholm, C., Bandholtz, L., Wigzell, H. 1999. Role of innate and adaptive immunity in the outcome of primary infection with *Chlamydia pneumoniae*, as analyzed in genetically modified mice. *J. Immunol.* 162: 2829-2836.
- Rottenberg M.E., Gigliotti Rothfuchs, A., Wigzell, H. 2002. The role of IFN-gamma in outcome of chlamydial infection. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 444-451.
- Salinas, J., Souriau, A., Cuello, F., Rodolakis, A. 1995. Antigenic diversity of ruminant *Chlamydia psittaci* strains demonstrated by the indirect microimmunofluorescence test with monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 43: 219-226.
- Yang, X., Hayglass, K.T., Brunham, R.C. 1996. Genetically determined differences in IL-10 and IFN- γ responses correlate with clearance of *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis infection. *J. Immunol.* 156: 4338-4344.

