

11261

1/2/70
3

MECANISMOS DE PENETRACION MICROBIANA POR
VIA RESPIRATORIA

EFFECTO DE LOS PRODUCTOS DE H. CAPSULATUM SOBRE LOS MACROFAGOS
ALVEOLARES

FALLA DE ORIGEN



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.

I N D I C E

	Pág.
Resumen	3
Parte I: Aspectos Teóricos sobre la interacción huésped-parásito a nivel pulmonar en histoplasmosis.	
Introducción	4
El pulmón como órgano de choque	6
El macrófago como agente defensivo	15
<u>H. capsulatum</u> como agente infectante	42
La interacción <u>H. capsulatum</u> -macrófago a nivel pulmonar	50
Bibliografía	60
Parte II: Effects of <u>Histoplasma capsulatum</u> products on the functional activity of alveolar macrophages.	
Abstract	83
Introduction	84
Material and Methods	85
Results	88
Discussion	96
References	101
Discusión y Prespectivas	105

R E S U M E N

Siendo la histoplasmosis una infección intracelular respiratoria que compromete a las células del sistema fagocítico mononuclear, su estudio abarca diversos aspectos desde el punto de vista inmunológico. Uno de éstos, y que hasta hoy no ha sido resuelto, es el mecanismo de penetración del hongo al ambiente interno cuando el individuo se encuentra en condiciones de inmunocompetencia. Para abordar el estudio de este proceso, en el presente trabajo se desarrolló una revisión teórica de los tres elementos que entran en juego en la interacción huésped-parásito durante el establecimiento de la enfermedad histoplasmósica, éstos son: el pulmón como órgano de choque y los alveolos como barrera, el macrófago alveolar como agente defensivo y el hongo Histoplasma capsulatum como agente agresor. Asimismo, se examinó el efecto de los productos de H. capsulatum sobre el macrófago alveolar, con el fin de explorar el posible papel del hongo en la inducción de modificaciones en la actividad funcional de esta célula. Para esto se estudió el efecto de diferentes cantidades de histoplasmina, el producto soluble de los cultivos de Histoplasma en monocapas de macrófagos alveolares de ratas Wistar. Se pudo determinar que este producto, a las dosis utilizadas, no posee un efecto citotóxico importante, es capaz de incrementar la adhesión y la endocitosis e inhibir la migración; no se observaron modificaciones significativas en la capacidad microbicida de esta célula. En base a estos resultados se discute la posibilidad de que estos fenómenos sean parte de los mecanismos de evasión de la defensa del huésped en los inicios de la infección respiratoria y que, además, estén involucrados en la penetración de este microorganismo.

I N T R O D U C C I O N

El tracto respiratorio, por sus características anatómicas y fisiológicas, es una vía importante de penetración antigénica. La superficie de intercambio gaseoso - cuyas dimensiones están alrededor de $70m^2$ - brinda la oportunidad a diversos agentes ambientales inhalables de introducirse al ambiente interno. De estos materiales, los que tienen entre 1 y 5μ de diámetro son capaces de tomar contacto con esta superficie con lo que, en circunstancias específicas, se iniciaría el proceso de penetración. La barrera que limita el paso de estos agentes es tenue y conspicua, sin embargo, las características de su dinámica de funcionamiento la hacen altamente eficiente como elemento defensivo. La penetración pasiva de los agentes extraños solo parece ocurrir ante ciertas fallas en el funcionamiento de esta barrera; ésta parece ser la única opción para la entrada de materiales inertes. En cambio, la penetración activa parece ser el privilegio de ciertos microorganismos, y tal vez de algunos materiales inorgánicos de alta toxicidad (i.e. sílice) (237).

Los procesos infecciosos respiratorios se inician con la penetración del agente microbiano a través de las barreras defensivas, ya sea de las vías respiratorias o de la superficie de intercambio gaseoso, los alveolos. A este nivel la fisiología defensiva procura la eliminación de microorganismos antes de su penetración. Sin embargo, la invasividad y la toxicidad, componentes de la virulencia de los microorganismos en cuestión, son factores que abren paso lesionando a las células defensivas y a las de la barrera anatómica (neumocitos tipo I y II), modificando así la estructura y arquitectura alveolar, lo que permite la instalación de éstos en el medio ambiente interno. El destino de estos agresores dependerá, por un lado, de su capacidad de proliferación y adaptación al medio interno y, por otro lado, de la capacidad del or

ganismo huésped para montar una respuesta inmune eficiente. El producto de esta interacción determinará la evolución hacia la infección-enfermedad o hacia la inmunización-infección subclínica; condición esta última que caracteriza al estado de salud "normal".

Sin embargo, existen microbios cuyo mecanismo de penetración - infección, por vía respiratoria, es incierto ya que no se les ha encontrado una actividad toxicogénica o invasiva. En estos casos la virulencia más bien parece estar dada por su resistencia a los mecanismos de eliminación inmunológica, lo que condiciona un estado de persistente inmuoestimulación que genera daño tisular por hipersensibilidad, causa de patogénesis. Entre estos agentes se encuentran Mycobacterium tuberculosis, Histoplasma capsulatum y otros. Interesantemente, éstos son parásitos intracelulares e infectan a los macrófagos, que son las células encargadas de la defensa a ese nivel.

En este trabajo se examinan los factores que participan en los mecanismos de penetración de H. capsulatum. En la primera parte se hace una revisión de los tres componentes que intervienen en el proceso; éstos son: a) el órgano de choque, o sea, las características anatómico fisiológicas de las vías respiratorias y de los alveolos en su aspecto de barrera; b) la defensa celular, el macrófago, haciendo énfasis en el macrófago alveolar; y c) el agresor, H. capsulatum, y sus características durante la infección. En esta sección también se incluye una revisión crítica de la interacción entre estos elementos como parte de la fenomenología causal del inicio de la infección. En la segunda parte se examina, en un trabajo experimental, la actividad de los productos de H. capsulatum sobre el macrófago alveolar, estudiando la posibilidad de que el hongo ejerza algún efecto sobre la actividad funcional de esta célula fagocítica.

EL PULMON COMO ORGANO DE CHOQUE

El pulmón tiene como función principal mantener el adecuado intercambio gaseoso a nivel alveolar. El resultado de este proceso es el transporte eficiente de oxígeno (O_2) y bioxido de carbono (CO_2) a través del torrente circulatorio, de tal manera que pueda llevarse a cabo el mantenimiento de una adecuada presión parcial tanto de O_2 como de CO_2 en la sangre, lo que permite el aprovechamiento de estos gases a nivel tisular. Dicho de otra manera, el pulmón es el órgano encargado de mantener la suficiencia respiratoria, la cual constituye uno de los mecanismos implicados en el mantenimiento de la homeostasis del organismo.

Por otro lado, el pulmón, además de estar expuesto a los agresores externos que arriban por inhalación, es el órgano que recibe todo el flujo sanguíneo cardíaco -gasto cardíaco- por lo que se establece la máxima oportunidad para que los agentes circulantes de naturaleza inmunológica (antígenos o complejos inmunes) alcancen el lecho capilar pulmonar, constituyendo, además, mecanismos de agresión (endógena) continua.

El tracto respiratorio cuenta con más de 40 tipos diferentes de células, lo que da una idea de la gran heterogeneidad de sus funciones y la gran actividad metabólica a ese nivel (1).

Siendo el pulmón un órgano que en cierta forma se encuentra en contacto directo con el medio ambiente, cuenta con mecanismos dirigidos a prevenir la entrada al medio interno de agentes infectantes o partículas extrañas que de una u otra manera pudieran ser causa de enfermedad. Dentro de los procesos de defensa pulmonar podemos distinguir dos grupos: 1) Los mecanismos inespecíficos de defensa (arrastre mecánico, atrapamiento, y otros); y 2) Los mecanis-

mos de defensa inmunológicos, con la participación de las inmunoglobulinas en las secreciones, los macrófagos, células linfoides, etc. (238).

Diferentes poblaciones celulares participan de manera importante en los mecanismos de defensa del tracto respiratorio; entre éstas se encuentran:

A. Células secretoras:- En el epitelio que reviste el tracto respiratorio encontramos dos tipos de células cuya función principal es la secreción de sustancias, tal es el caso de a) las células caliciformes o células mucosas y b) las células serosas. Estas dos intervienen en la secreción de moco, el cual es una mezcla de agua, glicoproteínas, inmunoglobulinas, lípidos y sales (2). Las células caliciformes cuentan con una gran cantidad de gránulos secretorios en el citoplasma, ribosomas libres, un aparato de Golgi bien desarrollado, retículo endoplásmico rugoso y microvellosidades que la definen como una célula activamente secretora (1). El epitelio que reviste el tracto respiratorio se encuentra constantemente en contacto con gases irritantes, humo de tabaco, partículas inorgánicas y agentes microbianos; todos éstos son estímulos que conducen al incremento en la secreción de moco, el cual está en relación con un aumento concomitante en el número de células mucosas que se encuentran a lo largo del epitelio de las vías respiratorias (2,3,4). Las células serosas son más abundantes en la tráquea y en las vías aéreas de gran calibre (bronquios principales). Presentan las siguientes características: un citoplasma abundante y denso, retículo endoplásmico rugoso ampliamente distribuido en el citoplasma, microvellosidades y una gran cantidad de gránulos secretorios que se caracterizan por ser más pequeños que los de las células mucosas (5,6) los gránulos que contienen las secreciones serosas son opacos a los electrones, lo que sugiere la baja viscosidad de su contenido o al menos densidad inferior a la de la secreción de las células mucosas (7). Las secre-

ciones serosas contienen proteínas neutras, lisozima y componente de transferencia de la IgA (3), además de glicoproteínas ácidas (8). Las células serosas tienen como función disminuir la viscosidad de las secreciones de las regiones periciliares en el epitelio bronquial y existen evidencias sobre su transformación a células mucosas en ratas expuestas al humo del tabaco (5,9). Su papel defensivo sería entonces: a) mecánico, al constituir una barrera, además del lavado y arrastre de partículas en los líquidos de secreción; b) inmunológico, al contener IgA específica para los microorganismos que alcanzan estas vías y c) por la presencia de carbohidratos inhibidores de la adhesión de microbios, presentes en las secreciones (12).

B. Glándulas mucosas.- Estas son la fuente principal de secreción mucosa en el árbol respiratorio, y al igual que los dos tipos anteriores de células, se localizan en las paredes de las vías respiratorias principales (10); sin embargo, existen otros tipos de células glandulares que pueden intervenir en la hidratación y concentración de iones en las secreciones mucosas (11). Las glándulas mucosas se encuentran bajo control parasimpático (vago) estricto, lo que las diferencia de las células mucosas cuya secreción de moco es inducida por estímulos irritativos y no nerviosos.

Algunos estudios realizados con el fin de llegar a conocer la causa directa de la alteración en la secreción de moco y en el transporte de iones en la mucosa de las vías respiratorias, indican que diversas sustancias tales como: histamina, prostaglandinas, péptidos intestinales vasoactivos, GMPc, AMPc y los iones de calcio, son capaces de influir en la cantidad de moco producido por las diferentes células secretoras (3,4,12). Más aún, se sabe que estos mediadores suelen ser liberados en respuesta a un estímulo antigénico y por lo tanto su presencia se asocia con enfermedades, en este caso, respiratorias(13),

por lo que la liberación de estas sustancias durante la infección respiratoria se ha tomado como uno de los mecanismos implicados en la defensa inespecífica del tracto respiratorio, ya que el aumento en las secreciones mucosas implica una mayor capacidad de atrapamiento de microorganismos y agentes extraños durante los procesos de agresión pulmonar.

C. Células Ciliadas:- Estas se distribuyen a lo largo del epitelio de traquea y bronquios, formando complejas conexiones con las células adyacentes a través de desmosomas. Presentan las siguientes características en sus organelos: retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi bien desarrollados, gran cantidad de mitocondrias, un cuerpo basal cuya función es servir de "ancla" a cada uno de los cilios que se proyectan al exterior a través de su citoplasma; cada célula presenta aproximadamente 200 cilios en su superficie luminal (14). Su función está directamente relacionada con el transporte mucociliar, removiendo partículas extrañas, incluyendo virus y bacterias.

El transporte mucociliar es el resultado de los movimientos ondulantes de los filamentos microtubulares que constituyen a los cilios, siendo de gran importancia el movimiento contractil del cuerpo basal. Para que este fenómeno se lleve a cabo se requiere una gran cantidad de energía de hidrólisis, la cual es proporcionada por el ATP; éste está en directa proporción con la cantidad de mitocondrias en este tipo de células (15). El movimiento ciliar es, por naturaleza, coordinado y sigue la misma dirección con el fin de realizar el transporte eficiente de moco; la coordinación en el movimiento ciliar depende de la interacción mecánica de la secreción mucosa con los cilios, y se ha propuesto la existencia de un control neurohumoral dependiente de 5-hidroxitriptamina, a este nivel (16).

Además de las células secretoras y ciliadas antes mencionadas existen las

denominadas células de Clara las cuales forman parte del epitelio bronquiolar no ciliado. Estas células se encuentran a nivel de bronquiolos en el humano y han sido observadas a lo largo del epitelio traqueobronquial en el ratón. Son definidas como "células secretoras con una alta actividad metabólica", función que es apoyada por sus características de localización y organización ultraestructural, y por su gran contenido de enzimas oxidativas (1). Son células columnares, su núcleo está dispuesto en la zona central; su citoplasma basal contiene pocos lisosomas pero extensas cisternas paralelas de retículo endoplásmico rugoso rodeando mitocondrias; presenta un gran aparato Golgi en la región perinuclear; su citoplasma apical presenta retículo endoplásmico liso y rugoso, así como mitocondrias y gránulo membranosos. Las características de sus mitocondrias y de los gránulos membranosos varían según la especie (1,17). Se cree que los gránulos de estas células contienen en su interior glucógeno, lípidos y proteínas, en especial proteínas neutras (8). Aunque su participación en la secreción no ha sido completamente entendida (17,18), se cree que los compuestos presentes en estos gránulos son componentes del fluido periciliar a nivel del bronquilo, y la inducción de la secreción de éstas pudiera ser dependiente de la acción de agentes colinérgicos y beta-adrenérgicos (14).

Otros constituyentes importantes son las células pulmonares endócrinas, también llamadas células "K" por su gran parecido con las células Kulchitsky del intestino. Estas células presentan mayor cantidad de retículo endoplásmico liso que rugoso, ribosomas libres y gránulos característicamente opacos a los electrones en su citoplasma (6) los cuales contienen glicoproteínas (19). Suelen encontrarse a nivel de los bronquios principales y bronquiolos, ya sea en acúmulos o con mayor frecuencia solas. Su función secretora específica aún se desconoce.

D. Células del alveolo:

Se conocen cinco tipos celulares principales los cuales se enlistan con sus proporciones porcentuales en la siguiente tabla(1):

1) Células tipo I	8.3%
2) Células tipo II	15.9%
3) Células endoteliales	30.2%
4) Células intersticiales	36.1%
5) Macrófagos	9.4%

A continuación se analizan las células de mayor importancia para el funcionamiento en la defensa pulmonar.

Célula de tipo II: Esta clase de células son cuboidales y se localizan en el septum alveolar; presentan una superficie cubierta por microvellosidades y sus organelos están en proporción con su función metabólica y secretora. Estas células mantienen la estabilidad alveolar lo cual tiene como resultado la función respiratoria normal; son responsables de la secreción de surfactante ya que sintetizan fosfolípidos y las proteínas constituyentes de éste. Además, son consideradas células progenitoras del epitelio alveolar, ya que tienden a proliferar y diferenciarse a células del tipo I tanto en situaciones de normalidad como durante los procesos de daño alveolar (1, 20 21). Finalmente, intervienen en la defensa pulmonar contra agentes oxidantes, en el metabolismo de sustancias xenobióticas y participan en el transporte de fluidos y electrolitos.

Células endoteliales: constituyen el lecho capilar pulmonar y abarcan una superficie en el humano de 70m² aproximadamente, forman la llamada barrera física entre el alveolo y la sangre capilar pulmonar. Su función es el transporte de agua, gases y solutos, así como también el procesamiento, en forma selectiva, de: prostaglandinas, nucleótidos de adenina, péptidos y drogas, por lo que in-

fluyen en la actividad de otros órganos al regular la entrada de estos compuestos al torrente circulatorio (14). Tienen la apariencia de una delgada membrana intimamente relacionada con la pared alveolar, y está formada por una capa de células adheridas a través de uniones intercelulares; contienen una gran cantidad de vesículas pinocíticas, aparato de Golgi bien desarrollado y ribosomas libres; se aprecia gran cantidad de depresiones en su citoplasma, las cuales tendrán la función de aumentar el área de contacto con la sangre (14).

.. Su interacción con el resto del organismo a través de la captación o producción de diferentes factores, da una idea de su función en la regulación de la homeostasis (1). Así, son capaces de captar, retener y procesar diversas sustancias provenientes del torrente sanguíneo como la serotonina, norepinefrina, prostaglandinas E y F, nucleótidos de adenina, angiotensina I, bradicinina, adenosina, hormonas y drogas. A su vez, liberan en el torrente sanguíneo: adenosina, angiotensina II, prostaglandinas, lípidos, metabolitos y drogas previamente acumuladas. En cambio, no son afectados por el endotelio: epinefrina; angiotensina II y prostaglandinas A e I₂ (14).

Hasta aquí se han revisado las principales clases celulares que, de una u otra manera intervienen en los mecanismos de defensa inespecífica en las vías respiratorias, ya sea mediante la secreción de moco y propulsión de éste al exterior a través del movimiento mucociliar con el fin de atrapar partículas y microorganismos extraños que penetran en el tracto respiratorio durante la inhalación de aire, o bien, mediante mecanismos metabólicos que intervienen en la defensa pulmonar contra agentes oxidantes y sustancias xenobióticas.

Además de esta barrera, el pulmón cuenta con un sistema defensivo de naturaleza inmunológica. Este se encuentra constituido por el sistema linfo-reticular pulmonar, que incluye al macrófago alveolar. Esta célula será analizada más

adelante ya que constituye el principal sistema defensivo tanto específico como inespecífico y su funcionamiento será revisado en la siguiente sección.

El sistema linfo-reticular se encuentra ampliamente distribuido, de tal manera que existen nódulos linfáticos a nivel del hilio pulmonar, además de nódulos no encapsulados de tejido linfoide localizados a lo largo del trayecto de los vasos linfáticos adyacentes a la pleura y cerca de los grandes vasos sanguíneos. De singular interés son los nódulos linfáticos presentes en la pared bronquial, ya que éstos se localizan en la lámina propia y asociados a las células de la luz del tracto bronquial (22, 23). Estos agregados linfoides contienen poblaciones celulares similares a las de los folículos de otros órganos de la misma naturaleza; incluyen: histiocitos, células reticulares, linfocitos en diferentes estados de diferenciación y células plasmáticas (23, 24). Estos linfocitos y células plasmáticas contienen inmunoglobulinas de las diversas clases (IgA, IgM, IgG, IgD, IgE) las cuales han sido identificadas en la pared bronquial en el humano (25, 26).

Además de lo anterior, cabe hacer énfasis en el papel del macrófago como parte importante de este sistema, recordando su intervención en la defensa contra partículas y microorganismos inhalados que toman contacto con la pared alveolar, así como el papel del macrófago que migra de estos nódulos a la luz del tracto bronquial.

Analizados los mecanismos involucrados en la defensa pulmonar antes descritos, se puede apreciar, que la respuesta local ante agentes infectantes se encuentra en gran parte a cargo de los mecanismos de defensa inespecíficos del pulmón. Sin embargo, la respuesta a nivel pulmonar también involucra mecanismos inmunológicos de gran relevancia. Estos mecanismos operan coordinadamente y ante una agresión difusa en la que los antígenos han llegado al intersticio se

induce una respuesta generalizada del tejido linfoide asociado a bronquios, así como de los agregados linfoides adyacentes a los bronquiolos y a los vasos pulmonares (23). Como se mencionó anteriormente, este tejido cuenta con linfocitos T y B, así como macrófagos, por lo que es evidente que estos tipos celulares juegan un papel importante en la respuesta inmunológica a nivel pulmonar (30, 31).

EL MACROFAGO COMO AGENTE DEFENSIVO

El sistema fagocítico mononuclear es una parte importante del sistema inmunitario, ya que se encuentra directamente involucrado en los mecanismos de defensa de la respuesta inmune, tanto celular como humoral. Este sistema está constituido por una gran variedad de tipos celulares (fagocitos mononucleares) los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo. Las células fagocíticas mononucleares, son heterogeneas en cuanto a su morfología y función. Sus características dependen del órgano al cual se encuentran asociados (bazo, hígado, ganglios linfáticos, pulmón, peritoneo, etc.). Sin embargo, estas células presentan características comunes tales como la presencia de un aparato de Golgi bien desarrollado, una gran cantidad de lisosomas ampliamente distribuidos en su citoplasma, un núcleo en forma oval y generalmente excéntrico, entre otras (239, 240).

Las células fagocíticas mononucleares (FMN) se originan en la médula ósea a partir de células precursoras que se renuevan a sí mismas en un proceso que involucra la generación de células hijas con características genéticas y morfológicas idénticas a las de la célula que les dió origen (32, 33). Concomitantemente, estas células presentan cambios dependiendo de la diferenciación y maduración. Durante la diferenciación las células en cuestión presentan variaciones en su expresión genómica que determinaran una restricción en su potencialidad, lo que permite dar origen solamente a una o dos líneas celulares a la vez (34,35). De ese modo, la maduración de estas células involucra la expresión acumulada de los cambios genómicos que ocurrieron durante el fenómeno de diferenciación.

La célula precursora formadora de colonias esplénicas es la primera célula funcionalmente reconocida que se encarga de generar las diferentes líneas celu-

lares hematopoyéticas (eritrocitos, granulocitos, macrófagos, eosinófilos y megacariocitos (36, 37), además de dar origen a los linfocitos T y B (38, 39, 40), por lo que se les ha reconocido un carácter pluripotencial. Estas células al diferenciarse constituyen colonias celulares con potencialidades mixtas, éstas, producen células formadoras de colonias con características genéticas diferentes para poder dar lugar a la generación de las distintas líneas hematopoyéticas antes mencionadas (36,37).

-- Las células resultantes de esta diferenciación, se activan en respuesta a un grupo de glicoproteínas llamadas factores estimuladores de colonias (FSC) que tienen la función de amplificar la maduración de las clonas (41). Estos factores se encuentran distribuidos ubicuamente y han sido aislados de la mayoría de los tejidos (células de riñón, glándulas salivales, células de bazo, etc.). También han sido localizados en la sangre de sujetos y animales que presentan una respuesta contra un agente infectante (42,43,44).

Se ha encontrado que los tipos celulares responsables de la producción y secreción de factores estimuladores pueden ser de diferente estirpe; tal es el caso de los fibroblastos, las células endoteliales, los monocitos y los macrófagos. Esto sugiere que la célula formadora de colonias es controlada, en parte, por productos liberados por su progenie madura (45,46).

Los FSC son necesarios para mantener viables y funcionales a las células formadoras de colonias ya que en su ausencia estas células mueren (45). Además, estos factores participan en la activación y facilitación de la función de las células maduras (macrófagos) (45).

Otro elemento importante para el desarrollo y maduración de las células del sistema fagocítico mononuclear es el estroma de la médula ósea en el que se lle-

va a cabo este proceso. Este se encuentra constituido por células adherentes de diferentes tipos (47,48), tal es el caso de las células reticulares largas, asociadas a macrófagos y a adipocitos. Estas células forman una compleja multicapa que contiene fagocitos mononucleares en diferentes estados de desarrollo. A través de este estroma medular difunden los diferentes factores necesarios para la diferenciación celular, por tanto, dicha capa constituye un elemento inductivo sobre el cual se desarrollan los diferentes tipos de células hematopoyéticas.

Durante la diferenciación y maduración, las células fagocíticas mononucleares pasan por diferentes estados: monoblastos, promonocitos, monocitos y macrófagos. Los monoblastos y los promonocitos se localizan en la médula ósea, estas células se dividen y originan a los monocitos (49,50,51). Los monocitos circulan como tales en el torrente sanguíneo y posteriormente abandonan este espacio. En los diferentes tejidos terminan su diferenciación hasta convertirse en macrófagos (49,50,51). Dependiendo del órgano en el cual terminan su diferenciación y las características que finalmente adquieren, estas células reciben diferentes nombres (cuadro 1).

C U A D R O 1

Constituyentes del Sistema Fagocítico Mononuclear.

ORGANO O TEJIDO	CELULA FAGOCITICA MONONUCLEAR
Tejido conectivo	Histiocito
Hígado	Célula de Kupffer
Pulmón (alveolo)	Macrófago alveolar
Pulmón (parénquima)	Macrófago tisular pulmonar
Bazo	Macrófagos fijos o libres
Hueso	Osteoclasto
Ganglio linfático	Macrófagos libres o fijos
Médula ósea	Macrófago fijo
Peritoneo	Macrófago peritoneal
Tejido nervioso	Célula de la microglia

Los mecanismos involucrados en la renovación de los macrófagos en los diversos tejidos son dos: por una parte, el arribo constante de monocitos a los tejidos y, por otra, la división local de los fagocitos mononucleares que hayan llegado recientemente (52). La necesidad de un mecanismo de renovación eficiente de macrófagos se debe a que estas células permanecen en los diferentes órganos tan solo 16 a 23 días (52).

De manera general las principales funciones Inmunológicas en las que participan las células del sistema fagocítico mononuclear son: a) la endocitosis y digestión de agentes patógenos, células anormales y partículas extrañas; b) la presentación antigénica y la liberación de factores de interacción con los linfocitos en la regulación de la respuesta inmune; y c) la migración a regiones donde se lleven a cabo procesos inflamatorios.

El macrófago, célula principal del sistema fagocítico mononuclear, fué considerado por Metchnikoff (1905) como parte importante de los sistemas de defensa del organismo por su capacidad fagocítica (53) sin embargo, fisiológicamente el macrófago presenta diferentes actividades dentro de las que se pueden incluir: 1) Producción y liberación de factores humorales que activan diferentes mecanismos de defensa del organismo tales como el complemento (54), pirógenos (55), interferón (56,57), y factores quimiotácticos para neutrófilos (58); 2) Interacción física con linfocitos inmunocompetentes durante la respuesta inmune humoral y celular (59,60); 3) Destrucción de células malignas (61,62,63); 4) Producción y liberación de prostaglandinas y nucleótidos cíclicos que intervienen en la activación o inhibición de la actividad de otras células tales como los linfocitos (61,64); 5) Regulación de las actividades de replicación y síntesis de fibroblastos (65); 6) Producción y secreción de enzimas hidrolíticas (66); 7) Producción y liberación de interleucina-1 (factor activador de linfocitos) (67,68) y otras moléculas con diferentes actividades biológicas conocidas genéricamente como monocinas (58).

El macrófago, como célula secretoria, presenta grandes diferencias en sus niveles enzimáticos dependiendo de su origen y de los estímulos a los que ha sido expuesto (69,70,71); esto sugiere la existencia de subpoblaciones de macrófagos las cuales son heterogeneas en cuanto a sus propiedades bioquímicas y funcionales.

El macrófago es considerado una célula importante dentro de los mecanismos de defensa, tanto específicos como inespecíficos, durante las infecciones microbianas ya que participa activamente, a través de su capacidad fagocítica, en la muerte de los microorganismos lo cual es determinante en la resolución de la enfermedad infecciosa. Los mecanismos del proceso de fagocitosis (necesarios en

la eliminación de bacterias, hongos, virus y parásitos) se encuentran íntimamente relacionados con el metabolismo oxidativo de las células del sistema fagocítico mononuclear. Durante la fagocitosis los microorganismos invasores se ponen en contacto con la membrana del macrófago, por medio de la cual son reconocidos como agentes extraños. El mecanismo que le permite al macrófago discriminar entre materiales propios y extraños aún no está determinado pero estudios recientes al respecto, muestran evidencias a favor de la existencia de un factor sérico (5,000 y 10.000 D de peso molecular) de naturaleza glicoproteica, que es necesario para que los componentes propios del organismo sean reconocidos como tales. En el mismo trabajo se sugiere la existencia de receptores cuyo papel sería detectar o reconocer un marcador de lo "propio" (72). Posteriormente los microorganismos son internalizados en la célula y englobados en fagosomas donde después serán expuestos a una gran variedad de enzimas digestivas contenidas en los lisosomas una vez que la unión de ambas vesículas constituya el fagolisosoma.

En ciertas condiciones, los sistemas líticos elaborados por el macrófago pueden ser liberados al espacio extracelular con el fin de destruir células alteradas, células malignas o cuerpos extraños, así como grandes parásitos imposibles de ser endocitados (73).

Las sustancias responsables de la destrucción de partículas extrañas (células malignas, parásitos, etc.) constituyen sistemas tóxicos elaborados por los fagocitos, los cuales pueden ser agrupados según su mecanismo de funcionamiento. Los sistemas propuestos para estas funciones se incluyen en el cuadro 2 (73).

Sistemas líticos presentes en los macrófagosA.- Sistemas Tóxicos dependientes de oxígeno.

Dependientes de peroxidasa

Independientes de peroxidasa

anión superóxido (O_2^-)peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

radical hidroxilo (OH)

oxígeno simple (O_2)B.- Sistemas no dependientes de oxígeno.

pH ácido en lisosomas

lisozima

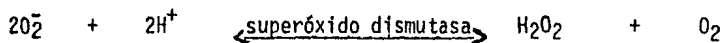
lactoferrina

hidrolasas ácidas y neutras

interferón

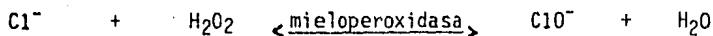
componentes del complemento

Uno de los sistemas más importantes es el de la mieloperoxidasa. Este mecanismo, dependiente de oxígeno, actúa en la muerte de microorganismos a través de la siguiente reacción:



El peróxido así formado en presencia de ácido ascórbico y algunos iones metálicos destruye microorganismos fagocitados (forma no enzimática). Sin embargo, en presencia de mieloperoxidasa (presente en neutrófilos y monocitos) el peróxido aumenta su potencia ya que esta enzima cataliza la oxidación de iones

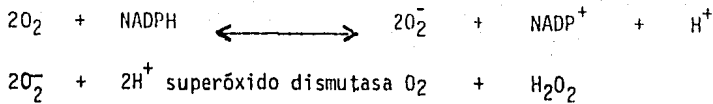
haluro (Cl^- , Br^- , I^-) a iones hipohalito en presencia de peróxido:



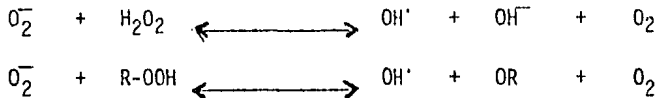
El complejo peróxido-mieloperoxidasa-haluro constituye un sistema microbici da de gran potencia para el fagocito y para este efecto se han propuesto los siguientes mecanismos de acción: a) incorporación de haluro a la pared celu lar de las bacterias, con la consecuente pérdida de la integridad de la superfi cie celular halogenada lo que lleva a la muerte bacteriana; b) descarboxila ción de aminoácidos convirtiéndolos en aldehidos, CO_2 y amoniaco, reacción que conduciría a la ruptura de la superficie y muerte celular; c) descarboxilación de aminoácidos libres y muerte bacteriana por acción de los aldehidos tóxicos producidos como consecuencia de este proceso. (74,75).

Los gránulos con peroxidasa están presentes en los fagocitos mononucleares circulantes, sin embargo, los macrófagos maduros generalmente pierden estos grá nulos, no así, algunos macrófagos residentes en los que se puede encontrar pero xidasa en el retículo endoplásmico. En los monocitos sanguíneos en los macrófa gos que ordinariamente no contienen gránulos con peroxidasa se puede detectar actividad de peroxidasa en el retículo endoplásmico rugoso y alrededor del nú cleo. esta peroxidasa no está empaquetada en gránulos ni se libera en el fago soma, por lo que se desconoce su papel (76). Se sabe que existe peroxidasa en el líquido extracelular la cual es susceptible de ser endocitada por el macróf ago, ya sea por fagocitosis o por pinocitosis, y de esta manera ser utilizada en la destrucción de microorganismos endocitados (73).

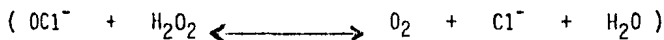
El grado de actividad microbici da también se encuentra asociado a la capaci dad de liberación de anión superóxido (77), el cual se forma por la reducción de un electrón de oxígeno:



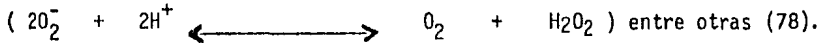
Los radicales hidroxilos son agentes bactericidas activos en el sistema Xantina-oxidasa y son directamente producidos por los fagocitos de la siguiente forma:



El oxígeno simple (O_2), elemento importante implicado en la muerte por fagocitos, se obtiene por varias vías: a) en la cadena respiratoria, b) como producto de la reacción de la mieloperoxidasa:



y c) por dismutación espontánea del anión superóxido



Las reacciones de la cadena respiratoria llevan al incremento en la utilización de O_2 , y a la elevación de la producción de peróxido por el incremento en la utilización de oxígeno extramitocondrial en base a la activación de la vía de la hexosamonofosfato (78).

Dentro de los mecanismos independientes de oxígeno implicados en la destrucción microbiana se encuentra el pH ácido en los lisosomas el cual contribuye directamente a la rápida acidificación de la vacuola fagocítica hasta un pH cercano a 4.5 durante la formación del fagolisosoma; esta acidez puede ser causa de muerte per se, para algunos organismos, tal es el caso de Toxoplasma gondi, no obstante, éste no es su único papel, ya que el pH ácido también favorece la actividad de la mieloperoxidasa en los monocitos y la acción de peroxidasa de

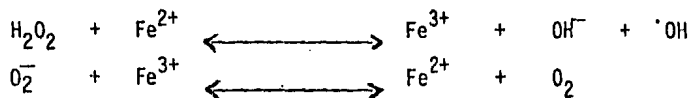
la catalasa, en los macrófagos que carecen de mieloperoxidasa (79,80,81).

En relación a la función que desempeñan las proteínas catiónicas en la muerte de los microorganismos, existen estudios que apoyan su presencia en macrófagos alveolares de conejo y se ha propuesto cierto papel en la muerte de cepas de *Candida* y algunas bacterias gram-positivas (82). Sin embargo, se desconoce su localización subcelular y su contribución a la muerte de microorganismos aún no está bien definida.

Los macrófagos secretan grandes cantidades de lisozima (muramidasa); no se ha determinado si esta enzima tiene responsabilidad directa en la actividad antimicrobiana de estas células, pero se sabe que puede participar en la destrucción de algunos organismos de manera conjunta con otros mecanismos, tal como el del peróxido de hidrógeno (83). Su función principal radicaría en la digestión de microorganismos muertos (80).

Otros compuestos con efecto antibacteriano son las proteínas con alta afinidad por el hierro, tal es el caso de la lactoferrina que compete con los microorganismos por el hierro "depletándolos" de este compuesto que es esencial para su crecimiento. Más aún, la lactoferrina puede estimular la formación de hidroxilos al facilitar el hierro activo que sirve como catalizador de la reacción de Haber-Weiss (73,81).

Reacción de Haber-Weiss:



Las hidrolasas ácidas son proteasas formadas intracelularmente que tienen capacidad de degradar colágeno, membrana basal y otros componentes del tejido conectivo, además de hidrolizar completo, inmunoglobulinas y cininas (66,80). Las hidrolasas neutras tales como la colagenasa (84,85), la elastasa (86), y el activador del plasminógeno (87), son de gran importancia en los procesos inflamatorios ya que, por ejemplo, el último contribuye en la conversión de plasminógeno a plasmina. Tanto la secreción de hidrolasas ácidas como la de las neutras son inducidas por el fenómeno de endocitosis, así como por cambios en los niveles de GMPc y por la presencia de linfocinas (88).

El importante papel del macrófago en la defensa del huésped ante infecciones virales reside en su capacidad para secretar interferón (89). Sin embargo, no solamente el estímulo viral es el responsable de este hecho sino que el macrófago también puede ser estimulado para la secreción de interferón por una gran variedad de agentes, tales como ciertos polisacáridos y polianiones, las endotoxinas y las mismas bacterias (56). Existen diferentes clases de interferón, los cuales varían en su peso molecular; su secreción generalmente depende de la clase de estímulo que propició su producción. Dentro de los efectos que tiene el interferón, se sabe que incrementa la capacidad de estiramiento-adhesión "spreading" (90), la fagocitosis (91,92) y la actividad tumoricida del macrófago (93).

Los macrófagos también secretan componentes del complemento, tanto los de la vía clásica como los de la alterna, incluyendo C2 (92), C1q (54,95), C3, C4 (95), así como el factor B, componente de la vía alterna de activación del complemento, entre otros (96). Tal secreción puede tener gran importancia en los lugares de inflamación, donde los componentes activados del complemento, pueden inducir la quimiotaxis, la proliferación celular, la secreción de productos ce-

lulares y finalmente la lisis celular.

El cuadro 3 enlista la gran variedad de productos de secreción del macrófago, los cuales le confieren diversos efectos biológicos, además de los ya analizados (80).

Productos de Secreción de los
Macrófagos

ENZIMAS

Lisozima
 Proteasas neutras
 - activador del plasminógeno
 - colagenasa
 - elastasa
 -angiotensina convertasa
 Hidrolasas ácidas
 - proteasas
 - lipasa
 - deoxi y ribonucleasas
 - fosfatasas
 - glicosidasas
 - sulfatasas
 Arginasa

COMPONENTES DEL COMPLEMENTO

C1q Factor B
 C4 Factor D
 C2 Properdina
 C3 Activador de C3b
 C5 β₁H

INHIBIDORES ENZIMATICOS

Inhibidor de plasmina
 2-macroglobulina

FACTORES QUE PROMUEVEN LA REPLICACION DE:

Linfocitos (factor activador de linfocitos)
 Precursores mieloides (factor-estimulador de colonias)
 Precursores eritroides
 Fibroblastos

FACTORES QUE INHIBEN LA REPLICACION DE:

Linfocitos
 células tumorales
 virus (interferón)
Listeria monocytogenes

INTERLEUCINA-1

METABOLITOS Y NUCLEOTIDOS

Uracilo
 Timidina
 Acido úrico

PROTEINAS CONJUGADAS

Fibronectina
 Transcobalamina II
 Transferrina

PIROGENOS ENDOGENOS

Lípidos activos
 Prostaglandina E₂
 6-ceto-prostaglandina F
 Tromboxanos
 Leucotrienos
 Acido hidroxi-eicosatetraenoico
 Factores activadores de plaquetas

METABOLITOS ACTIVOS DEL OXIGENO

Superóxido
 radicales hidroxilo
 oxígeno
 peróxido de hidrógeno

FACTOR QUIMIOTACTICO PARA NEUTROFILOS

FACTORES QUE REGULAN LA SINTESIS DE PROTEINAS EN OTRAS CELULAS

- amiloide A
 - haptoglobina
 - colagenasa
 - para hepatocitos
 - para células de la línea sinovial

Por lo anterior se puede concluir que las diferentes subpoblaciones de macrófagos poseen una amplia capacidad secretoria que les confiere una extensa gama de respuestas ante estímulos de diversa naturaleza tales como: infecciones, tumores, inflamación, y otros. De esta forma parece que queda debidamente establecido que esta célula es de gran importancia en la preservación y buen funcionamiento de los mecanismos homeostáticos del organismo.

Por otro lado, el papel del macrófago en la iniciación de la regulación de la respuesta inmune humoral y celular, así como sus funciones como célula efectora de la respuesta inespecífica, son de gran relevancia (59). Es conocido el hecho de que la expresión de la respuesta inmune depende en forma importante de la interacción cooperativa de las diferentes células inmunocompetentes (59). Esta cooperatividad requiere de la presencia, en la superficie de las células, de dos tipos de autodeterminantes los cuales son reconocidos de manera específica. Estos son los determinantes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, denominado sistema HLA en el humano y sistema H2 en el ratón, así como los determinantes idiotípicos de las inmunoglobulinas (59,97).

Los sistemas HLA y H2 son codificados en loci que se localizan en el cromosoma 6 humano y 17 en el ratón, respectivamente. Los productos del complejo principal de histocompatibilidad intervienen en el rechazo de injertos (Moléculas de Clase I); en la interacción célula a célula durante la cooperatividad y regulación de la respuesta inmune (Moléculas de Clase II); y codifican para la producción de sustancias íntimamente relacionadas con el sistema del Complemento (Moléculas de Clase III) (98). Realizando un análisis de lo anterior, podemos decir que la región "I" en el ratón se encuentra íntimamente relacionada con la respuesta inmune al igual que la región D en el humano, ya que ambas codifican a los antígenos de la clase II que están presentes en macrófagos, células

las B y en menor proporción en las células T. La región "I" se divide en los subloci Ia, Ij e Ie. de estos subloci, el Ia ha sido ampliamente estudiado en relación a su presencia en macrófagos durante una respuesta inmunológica. Existen reportes que indican que los macrófagos pueden separarse en dos grupos, basándose en la presencia o ausencia de antígenos Ia sobre su superficie (99). Del 5 al 30% de los macrófagos de exudado peritoneal presentan determinante Ia, en contraste con los del bazo y del timo que presentan determinantes Ia en un 40 a 60% (100,101). El grupo de macrófagos que carece de determinantes Ia no es capaz de adquirirlos (102). De los dos grupos de macrófagos los Ia positivos (Ia⁺) son los responsables de la interacción entre el antígeno y las células T bajo el control génico Ir (101, 103). El hecho de que los macrófagos Ia⁻ no intervengan en la presentación del antígeno indica que existe una estrecha relación entre la presencia de los determinantes Ia y la función presentadora del macrófago.

Existen estudios que demuestran que un estímulo inmunológico adecuado es capaz de inducir un incremento en el porcentaje de célula Ia⁺ en un exudado, no así un estímulo exclusivamente inflamatorio, ya que éste produce un incremento en el número absoluto de macrófagos sin alterar la relación Ia⁺/Ia⁻ en el exudado. De lo anterior se concluye que el alto nivel de macrófagos Ia⁺ es el resultado de un proceso que requiere la función específica de estas células, tal es el caso de la presentación antigénica y la consiguiente interacción con las células T durante la cooperación celular en la respuesta inmunológica (104). Por último, cabe aclarar que tanto los macrófagos Ia⁺ como los Ia⁻ presentan receptores para Fc y C3 y que ambos tipos de macrófagos son capaces de fagocitar (104).

Es conocido el hecho de que para que pueda llevarse a cabo la cooperación celular durante un proceso inmunológico debe existir una célula presentadora

del antígeno, la cual solo es capaz de realizar esta función si se encuentra activada (59). El macrófago, célula presentadora del antígeno por excelencia, se activa ante la presencia de estímulos antigénicos adecuados, por efecto del factor estimulador de colonias y posiblemente también por la presencia de interleucina-3(11-3) la cual es producida por los linfocitos T. Durante su activación el macrófago adquiere la capacidad de elongarse rápidamente, secretar factivador de plasminógeno (105), aumentar sus niveles de H_2O_2 (106), y desarrollar una mayor capacidad para destruir microorganismos (107) y células tumorales (108). En contraste, los macrófagos activados con estímulos inflamatorios no presentan actividad microbicida ni tumoricida y no liberan niveles adecuados de H_2O_2 (109, 110). Además de los cambios antes mencionados, durante la activación de la célula fagocítica se presenta un incremento en la cantidad de antígenos Ia y de receptores para IgG 2a en la superficie del macrófago (111).

En cuanto al proceso de presentación antigénica, se ha demostrado que el macrófago activado ante un antígeno es capaz de endocitarlo y digerirlo, de tal manera que parte de los fragmentos antigénicos sean reutilizados por el mismo y la porción restante sea expuesta en forma ordenada en su superficie; esto es que el antígeno es presentado ante los linfocitos que poseen receptores específicos (112). Este proceso determina la activación de los linfocitos ya que posteriormente el macrófago es capaz de sintetizar y secretar factores solubles con efectos sobre diferentes células; tal es el caso de la interleucina-1 (factor-activador de linfocitos, LAF) que tiene un peso molecular de 15kD, está constituida por una cadena peptídica única y presenta las siguientes propiedades funcionales (67, 113,114).

FUNCIONES DE LA INTERLEUCINA-1

- 1) Actividad de pirógeno endógeno.
 - 2) Actividad mitogénica para fibroblastos y células sinoviales.
 - 3) Estimula la producción de reactivos de fase aguda en el hepatocito (amiloides "A" del suero, fibrinógeno, proteína C reactiva, etc.).
 - 4) Estimula la producción de prostaglandinas por las células sinoviales.
 - 5) Aumenta la producción de colagenasa en las células sinoviales y fibroblastos.
 - 6) Induce la proliferación de células T en presencia de mitógenos.
 - 7) Produce la activación de células B.
-

Por lo anterior se deduce que la interleucina-1 no sólo es necesaria en la activación de las células inmunocompetentes, sino que también participa en las reacciones inflamatorias no inmunológicas.

La célula T cooperadora es capaz de reconocer al antígeno ordenado sobre la superficie del macrófago, siempre y cuando sus determinantes de histocompatibilidad en especial los determinantes Ia correspondan entre sí de tal manera que las células que interactúan no sean reconocidas como extrañas. La activación de las células inmunocompetentes prosigue por la acción de la interleucina-1 que amplifica la respuesta a través de la inducción de la producción de interleucina-2 que es sintetizada por las células T (59,115,116). La interleucina-2 actúa junto con los determinantes de histocompatibilidad y con las señales antigénicas coestimulando timocitos y promoviendo la proliferación de células T; además, esta interleucina interacciona con las células T activadas a

través de sitios de unión específicos y de gran afinidad (receptores para interleucina-2) ocasionando la expansión clonal de las células T activadas (59).

La activación celular como resultado de la estimulación del macrófago por el antígeno se esquematiza en la figura 1.

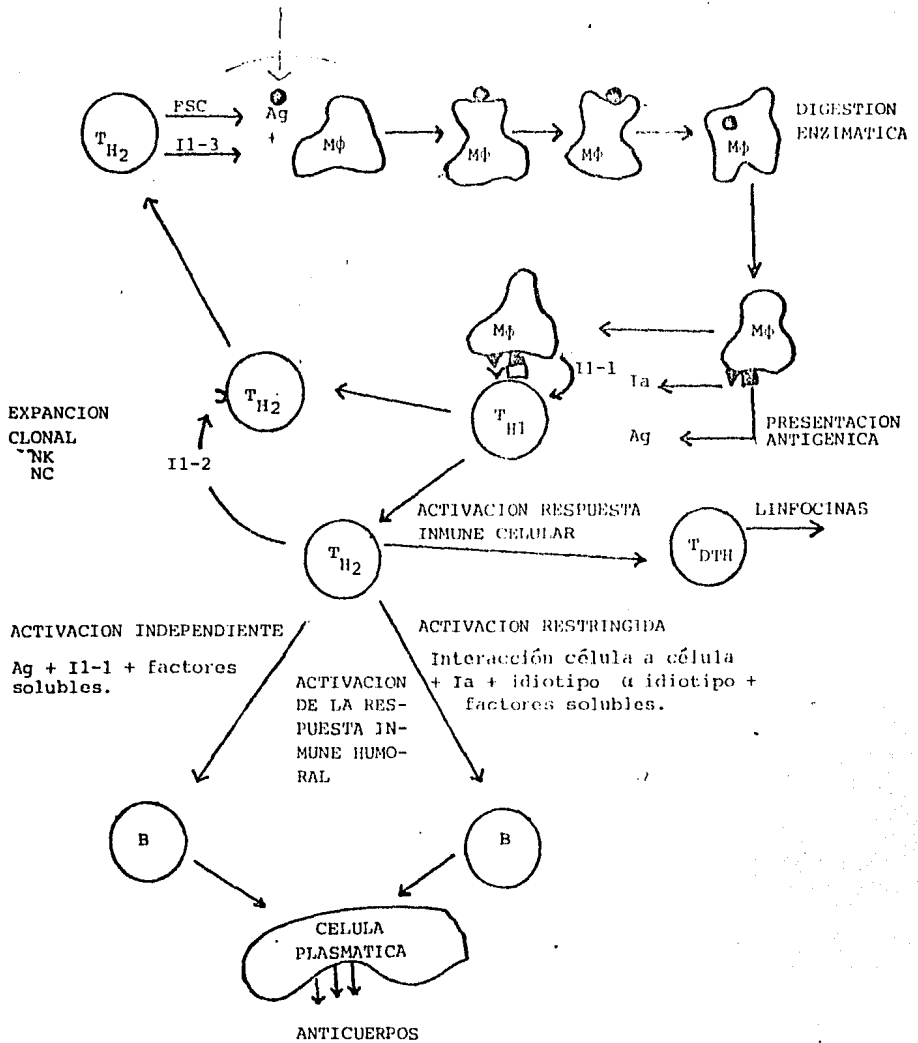


FIGURA 1. Papel del macrófago en la Inducción y Regulación de la Respuesta Inmune.
 Th: linfocito T cooperador (Th1 precooperador y Th2 cooperador), Mφ: macrófago. TDPH: linfocito timodependiente responsable de las respuestas de hipersensibilidad retardada. NK: células asesinas. NC: células citotóxicas. B: Linfocito B. FSC: factor estimulador de colonias. Il-3: Interleucina-3. Il-2: Interleucina-2. Il-1: Interleucina-1. Ag: antígeno. Ia: antígenos de Histocompatibilidad de la región Ia. Ag: antígeno ordenado en la superficie del macrófago.

Como se puede observar, el macrófago activado constituye un mecanismo de defensa primaria contra la infección bacteriana, aún antes de iniciarse la activación de las células inmunocompetentes.

Si se desafia un animal por segunda vez con un antígeno, se induce una respuesta inmune secundaria caracterizada por la sensibilización de los linfocitos T, hacia las 25-48 Hs. Estos linfocitos T sensibilizados liberan sustancias activas (linfocinas) en las zonas donde se está llevando a cabo la multiplicación bacteriana, estas sustancias tienen la propiedad de atraer y activar macrófagos, los cuales inhiben la multiplicación bacteriana y ocasionan la rápida disminución del número de microorganismos como consecuencia de su actividad lítica. Concomitantemente, se lleva a cabo la aparición de un gran número de macrófagos activados en el bazo y en el hígado (92).

Dentro de los factores linfocitarios mencionados tenemos el factor inhibidor de la migración (MIF). Este factor fue el primero en ser estudiado, y se sabe que es producido por los linfocitos T sensibilizados, y tiene la capacidad de inhibir la migración de los macrófagos. El mecanismo implicado en la inhibición de la migración de los macrófagos por el MIF es desconocido, sin embargo, se cree que las células fagocíticas son retardadas en su migración ya que se aglutinan impidiendo físicamente la migración de otras células, tal vez como resultado de los cambios en la membrana que hacen que las células se vuelvan más adherentes (117).

Otra linfocina importante es el factor activador de los macrófagos (MAF); éste induce un incremento en la capacidad de adhesión, de fagocitosis y en la potencia microbicida aún contra microorganismos antigénicamente no emparentados con aquellos que ocasionaron su activación. Este factor es una macromolécula semejante o idéntica al MIF y ejerce su acción hasta 72 hs después de estar en

contacto con las células en cuestión. Además de los efectos antes mencionados, este factor induce: aumento en la capacidad pinocítica, aumento en el nivel de actividad de la adenilatociclasa de la membrana, aumento de la incorporación de glucosamina en los componentes de la oxidación de la glucosa a través de la vía de las hexosas monofosfato, aumento de la actividad de deshidrogenasa láctica en el citoplasma, disminución de ciertas enzimas lisosomales (catepsina-D, β -glucuronidasa, fosfatasa ácida), aumento en el número de gránulos citoplasmáticos, bacteriostasis elevada y aumento de la actividad tumoricida (117).

Existen otros factores linfocitarios con actividad sobre los macrófagos (FQM). La producción de este factor es antígeno específica y se caracteriza por ser termoestable a 56°C tiene un peso molecular de 35-55,000 en cobayo y de 12 a 25,000 en el hombre. Este material ejerce su acción mediante el establecimiento de un gradiente de concentración ante el cual el macrófago se desplaza en forma orientada (117).

Por otra parte, se ha observado que ciertas sustancias exógenas como las endotoxinas bacterianas son capaces de activar a las células fagocíticas -especialmente macrófagos- así como el Corynebacterium parvum muerto que puede activar estas células ya sea directamente, ejerciendo su acción sobre ellas, o en forma indirecta induciendo a los linfocitos T a que liberen el factor activador de los macrófagos (117). Sobre estos fenómenos existen abundantes ejemplos en la literatura pero aún no se ha determinado su significado biológico en la relación huésped-parásito (118).

Hasta aquí se ha revisado el origen, la maduración y las funciones del macrófago en general. Sin embargo, es de importancia analizar las funciones de estas células a nivel pulmonar, ya que el pulmón es un órgano totalmente vulnerable a la invasión por agentes nocivos, por encontrarse en contacto directo

con el aire que proviene del medio externo, el cual contiene toda clase de contaminantes incluyendo partículas inorgánicas y materia orgánica, ya sea de origen animal o vegetal, además de microorganismos diversos.

Así pues, está demostrado que la principal célula de defensa contra estas partículas y microorganismos inhalados que toman contacto con la pared alveolar (sea hongos, virus, bacterias, etc.) es el macrófago alveolar. Estas células difieren de los macrófagos de otros órganos en su ultraestructura (27), en su alto nivel de metabolismo aeróbico (27) y, posiblemente, en su respuesta a una de las linfocinas; el factor inhibidor de la migración (28).

El macrófago se encuentra normalmente adherido a la pared alveolar, en estrecha relación con los neumocitos tipo I. Por lo general, presentan una forma ovalada, un gran núcleo excéntrico, y un aparato de Golgi bien desarrollado en la zona perinuclear. Contiene un par de centriolos cercanos a la región de Golgi, ribosomas libres, pequeñas cisternas de retículo endoplásmico y una gran cantidad de mitocondrias esparcidas en su citoplasma, además de las características vesículas fagolisosomales y los gránulos secretores (1).

El siguiente cuadro enlista algunas enzimas hidrolíticas presentes en los gránulos de secreción del macrófago alveolar (1).

ENZIMAS LITICAS PRESENTES EN LOS GRANULOS DE SECRECION
DE LOS MACROFAGOS ALVEOLARES

Amino peptidasa	Esterasa	Fosfatasa ácida
Lisósima	Catepsina	RNasa
Lipasa	Elastasa	Fosfolipasa A y A2
Hialuronidasa	Catalasa	β -glucuronidasa

Con respecto al origen y cinética de la maduración de los macrófagos alveolares es sabido que al igual que los macrófagos que se localizan en otros órganos, son células del SFMN que se originan en la médula ósea (119). Existen diversos estudios encaminados a explicar el origen y cinética de localización de los macrófagos alveolares (120, 121, 122, 123, 124). Trabajos realizados por Blusee Van Oud Alblas y R. Van Futh en 1979 (125), indican que tanto los macrófagos tisulares del pulmón como los macrófagos alveolares pulmonares derivan de los monocitos circulantes y que ninguno de estos dos tipos de macrófagos tienen la capacidad de proliferar en algún compartimiento pulmonar (125), por lo que el macrófago alveolar ha sido definido como una célula terminal, cuyo tiempo de recambio es de aproximadamente 27 días (125). Sin embargo, existen estudios recientes que indican que los macrófagos alveolares presentan heterogeneidad en cuanto a su densidad, tamaño y características citoquímicas, así como diferencias en patrones de actividad funcional caracterizados por poblaciones que muestran aumento en la susceptibilidad de la estimulación de la migración, incremento en la liberación de anión superóxido, en la pinocitosis, así como en la concentración de proteínas en la célula. Esta última está relacionada con la actividad del macrófago, y disminuye en proporción al aumento del tamaño celular.

Esto sugiere que las diferencias observadas en las diversas poblaciones de macrófagos alveolares posiblemente se deban a que se trata de diferentes estados de diferenciación o maduración de las células fagocítico-mononucleares en el pulmón (126, 127).

Con respecto a los mecanismos implicados en el transporte del macrófago alveolar hacia el medio externo, los resultados de la mayoría de los autores sugieren que los macrófagos pulmonares abandonan el alveolo dirigiéndose a las vías aéreas y son expulsados de estas a través del movimiento mucociliar (128, 129). En cambio se ha observado que el macrófago tisular del pulmón, puede dejar el intersticio a través de los canales linfáticos (130, 131), o tal vez por los vasos sanguíneos (128) o bien, los que están asociados al tejido linfático de los bronquios, atraviesan el intersticio y entran a las vías respiratorias a nivel de los bronquiolos terminales (132).

Para la inducción de la inmunidad tanto humoral como celular se necesita de la presencia del macrófago o de otra célula presentadora del antígeno. Algunos autores proponen, que siendo el macrófago la primera barrera inmunológica en el pulmón ante la presencia de agentes patógenos, por su capacidad de eliminación de microorganismos invasores, podría cumplir con el papel de célula presentadora del antígeno para la inducción y expresión de la inmunidad (133). Por lo menos in vitro se ha observado que esta célula es capaz de procesar el antígeno, mientras es reconocido por las células T de ayuda o las células T que median la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (134,135). Por lo tanto se estima que el macrófago alveolar podría jugar un papel relevante tanto en la inducción de la inmunidad pulmonar como en el reclutamiento selectivo de los linfocitos T en el pulmón (133,136,137). Por otro lado, apoyando la posibilidad de que esta función del macrófago ocurra, existen estudios in vitro

que establecen la expresión de antígenos en el macrófago alveolar, los cuales se sabe que son indispensables en la presentación antigénica por el macrófago. Más aún, los genes Ir codifican para la producción de moléculas que regulan la interacción antígeno-específica entre el macrófago alveolar y la célula T (138). Sin embargo, por ser ésta una célula terminal y por transitar hacia las vías respiratorias altas, la posibilidad de que interactúe con linfocitos solo ocurriría si ésta fuera capaz de reingresar al intersticio pulmonar. Evidencias a favor de este proceso no se han reportado aún. Este proceso de reingreso parece no ser compatible con la fisiología depurativa que tiene el macrófago, ya que si éste pudiera reingresar con microorganismos resistentes a la lisis o con materiales toxicogénicos como las partículas de sílice se estaría promoviendo la penetración de materiales que supuestamente deberían eliminarse por expulsión a las vías respiratorias. Por tanto, a pesar de que se pueda demostrar in vitro su potencialidad para cumplir con una función cooperativa en la respuesta inmune la posibilidad de que ésto ocurra in vivo en condiciones naturales es remota. Asimismo, se ha reportado que esta célula tiene capacidad supresora in vitro al igual que otras células adherentes obtenidas en diferentes órganos (139). Sin embargo la posibilidad de que este efecto ocurra in vivo es poco probable por los argumentos señalados antes.

Como se ha descrito con anterioridad, el macrófago alveolar a través de su capacidad fagocítica, es determinante en la defensa del huésped ante antígenos inhalados, ya que de esta manera se mantiene la esterilidad pulmonar. El proceso fagocítico se inicia con el enlace de la partícula a fagocitar a los receptores Fc o a los receptores inespecíficos; la penetración de la partícula unida a los receptores durante la fagocitosis es un proceso que parece estar controlado por microfilamentos citoplásmicos (140). La endocitosis de la partícula estimula el movimiento de ciertos receptores (ej. Fc) hacia las zonas de la mem-

brana que están siendo introducidas. Con la penetración de la partícula endocitada se encierra una vacuola fagocítica (fagosoma) y al formarse el fagolisosoma, con la consecuente liberación de enzimas hidrolíticas, comienza la destrucción o degradación de partículas que han sido fagocitadas (140).

Existen estudios in vivo encaminados a determinar el porcentaje de bacterias que suelen ser endocitadas por los macrófagos alveolares después de la exposición de animales de experimentación a la inhalación de un número determinado de bacterias, observándose que a los pocos minutos de haber penetrado al pulmón, el 50% de las bacterias inhaladas son endocitadas, llegándose a encontrar un 80% de bacterias ingeridas en los macrófagos de los animales que fueron estudiados después de una hora de desafío, y el 90% hacia las dos horas y media de residencia bacteriana pulmonar (141).

El fenómeno fagocítico requiere el consumo de energía; estudios encaminados a determinar cuales son las vías metabólicas que proveen la energía para la fagocitosis refieren que las principales fuentes son la glucólisis y el metabolismo oxidativo (142). Por otro lado, éstos indican que una presión parcial de oxígeno de 25 mm de Hg o menos induce un efecto supresivo en la fagocitosis, por lo que es probable que el macrófago actúe en condiciones subóptimas en el pulmón, en áreas en las que la tensión de oxígeno está disminuída (142). Además, ya que el consumo de O_2 extramitocondrial es importante para el efecto lítico sobre los microorganismos (78), debe inferirse que la capacidad microbicida de los macrófagos alveolares debe estar disminuída en tales circunstancias.

Después de un estímulo fagocítico in vitro el macrófago alveolar comienza a secretar factores quimiotácticos (143,144,145), por lo que se cree que la endocitosis de microorganismos por el macrófago alveolar puede ser un paso crítico para la inducción del reclutamiento de polimorfonucleares en el pulmón. Los

mecanismos implicados en el reclutamiento de estas células a través de los vasos no se conocen con exactitud, pero se propone que agentes quimiotácticos tales como los factores derivados de los macrófagos, ciertos productos bacterianos y C5a, generan un gradiente químico que atrae polimorfonucleares a través de la pared vascular (144). Se ha observado que los polimorfonucleares migran al alveolo por la pared de los capilares del septum alveolar, entre las células epiteliales de los tipos I y II (146); en otros estudios se ha visto que la migración, tanto de los monocitos como de los polimorfonucleares en el espacio alveolar, ocurre entre las estrechas uniones de las células epiteliales de tipo I (147).

HISTOPLASMA CAPSULATUM COMO AGENTE INFECTANTE.

Histoplasma capsulatum es un hongo dimórfico que fue inicialmente descrito por Darling en 1904, quien creyó que se trataba de un protozoario. Su naturaleza fúngica fue sospechada por Rocha hacia 1912 y fue cultivado por primera vez por De Monbreum en 1934 a partir del primer caso diagnosticado pre mortem de histoplasmosis. En México fue realmente diagnosticado el primer caso en 1949 por Perrin y Martínez Báez por medio de técnicas histopatológicas (148).

La histoplasmosis presenta una distribución geográfica cosmopolita, aunque predomina en regiones tropicales y subtropicales, en México se ha aislado el hongo del suelo de minas, casas y cavernas donde existe guano de aves y murciélagos (149,150,151,152,153).

El hongo Histoplasma capsulatum se considera dimórfico, debido a que se encuentra en la naturaleza en dos formas diferentes, éste es, en forma micelial en el medio ambiente y como levadura intracelular en humanos y animales susceptibles. Durante la fase micelial da lugar a dos tipos de esporas: 1) macroconidias equinuladas (8-12 micras de diámetro) y 2) microconidias (2-4 micras de diámetro) (149).

Las heces de las aves, pollos, estorninos y otros pájaros, proporcionan un sustrato rico en nitrógeno, adecuado para el crecimiento de los micelios. Cuando el suelo contaminado se ha deshidratado, las esporas se aerolizan y son susceptibles de ser inhaladas, distribuyéndose en el parénquima pulmonar, donde toman contacto con las macrófagos, células encargadas de fagocitar a ese nivel, y que al mismo tiempo pueden ser infectadas por el hongo, que intracelularmente adquiere su estado de levadura (forma parasitaria). El proceso mediante el cual el hongo revierte de la fase micelial a la fase levaduriforme se lleva a

cabo en un periodo aproximado de 72 hs, posteriores a la infección (149,154, 155). El hecho de que el macrófago sea la célula encargada de eliminar a los microorganismos y otras sustancias extrañas, pero que en algunas circunstancias pueda ser afectada por una infección intracelular, muestra que su función principal (la fagocitosis) puede ser drásticamente disminuída. Siendo la histoplasmosis una enfermedad intracelular del sistema fagocítico mononuclear, el estudio de ella es de gran interés inmunológico.

El hongo Histoplasma capsulatum está constituido por una pseudocápsula (155) y una pared celular cuyos constituyentes varían de acuerdo a la fase en la que se encuentre el hongo, de tal manera que la pared celular durante la fase levaduriforme contiene mayor cantidad de quitina y menor cantidad de manosa y aminoácidos que la pared celular de la forma micelial (157). Sin embargo, se toman como componentes de la pared en general, a la glucosa, la galactosa y la manosa. Estudios morfológicos describen dos tipos de H. capsulatum que difieren en su morfología durante la fase micelial, no así durante la fase levaduriforme en la que son prácticamente indistinguibles. Esto es, el tipo A (albino) y el tipo B (café) el tipo A durante su fase micelial crece constituyendo colonias blancas, sin pigmentos difusibles con anchas áreas de hifas blancas, pocas macroconidias y muchas microconidias. Mientras el tipo B de micelios crece en colonias que producen un pigmento café, con estrechas hifas lisas del mismo color muchas macroconidias y pocas microconidias (158). Otros estudios establecen subdivisiones de los tipos A y B en quimiotipos, basándose en la presencia de α -glucanos en la pared de la levadura, de tal manera que aquellas que presentan α -glucanos en la pared durante la fase levaduriforme serán del quimiotipo II y las que carecen de α -glucanos en la pared durante la fase levaduriforme pertenecen al quimiotipo I (159,160). Tal variabilidad en la composición de la pared de la levadura ha sido considerada como un componente probablemente im

portante en la regulación de la virulencia en los diferentes tipos de H. capsu-
latum (161).

La histoplasmosis es una micosis secundariamente tegumentaria, ya que casi siempre se inicia en el pulmón, pudiendo confinarse solo a este órgano o bien diseminarse prácticamente a todos los órganos constituyendo un cuadro, en la mayoría de los casos, letal. Esta infección ha sido objeto de clasificaciones clínicas en varias ocasiones, sin embargo, los diferentes autores concuerdan en la descripción de dos tipos principales de presentación de este proceso, éstos es: 1) una infección respiratoria ligera, por lo general asintomática, que evoluciona a la curación y 2) el establecimiento de la enfermedad propiamente dicha, cuadro que puede ser progresivo y evolucionar a un estado letal ampliamente diseminado (153).

Por lo general, la clasificación de la histoplasmosis sigue los criterios clínico-patológicos determinados por los estados de severidad del padecimiento. La más difundida considera 4 formas clínicas:

a) Cuadro pulmonar agudo.- caracterizado por ser de instalación brusca, el paciente refiere malestar general, hipertermia, tos, dolor torácico y disnea. Este cuadro va seguido del rápido restablecimiento del individuo.

b) Histoplasmosis pulmonar progresiva.- ésta se presenta como un cuadro en el que los síntomas anteriormente mencionados evolucionan en forma crónica con tendencia a agravarse (hasta llegar a ser similar al cuadro clínico de la tuberculosis) con tos crónica, ocasionalmente productiva. Radiológicamente existen lesiones idénticas a las producidas por la tuberculosis de reinfección y suelen evolucionar hacia la necrosis y calcificación con el establecimiento de lesiones cavitarias.

c) Histoplasmosis Diseminada.- se caracteriza por un cuadro febril acompa-

ñado de hepato y esplenomegalia, adenopatías y en algunas ocasiones diarrea. La serología es positiva intensa. El cuadro tiene un curso rápido, por lo general es de tipo fulminante y mortal a corto plazo.

d) Histoplasmosis Crónica.- se presenta un cuadro respiratorio crónico (tos, expectoración y fiebre moderada) adenopatías, hepato y esplenomegalia, lesiones en mucosa faríngea y laríngea principalmente; su evolución es lenta y finalmente letal (153, 156).

La inhalación de esporas de H. capsulatum conduce a la infección pulmonar con la aparición de lesiones miliares distribuidas por todo el parénquima pulmonar así como aumento del tamaño de los ganglios linfáticos. La infección primaria es benigna y en la mayoría de los casos pasa inadvertida o bien se manifiesta como una enfermedad respiratoria autolimitada. Durante la curación las lesiones pulmonares se tornan fibróticas y se calcifican (152). Cuando la infección por H. capsulatum evoluciona hacia la diseminación (y en la mayoría de los casos a la muerte) se observa la multiplicación del hongo en las células del sistema fagocítico mononuclear de hígado, ganglios linfáticos, bazo, pulmón, médula ósea, etc. Más aún, en estos órganos se puede detectar la presencia de acumulaciones nodulares de células epiteloides y células gigantes tipo Langhans. Las lesiones pueden acompañarse de necrosis caseosa, las glándulas suprarrenales, que suelen ser afectadas con mucha frecuencia, se encuentran con gran aumento de tamaño. Los granulomas pulmonares presentan generalmente necrosis caseosa (como en la tuberculosis pulmonar cavitada). La histoplasmosis necrosante puede adquirir la forma de una papilitis renal. En las lesiones necróticas, presentes en la mayoría de los órganos afectados, se observan formas extracelulares de histoplasma, mediante tinciones especiales (coloración ácida periódica de Schiff); estos organismos extracelulares, que suelen tener mayor tamaño que los intrace-

lulares, están distorcionados y en ocasiones asumen la forma micelial (153).

Como es lógico, en base a las lesiones que caracterizan a la enfermedad es fácil de asumir que, la respuesta inmune celular se encuentra comprometida importantemente; no obstante, se sabe que la respuesta protectora durante la infección por H. capsulatum es la celular, la cual involucra un sinnúmero de actividades biológicas en las que intervienen las células y sus productos, sean linfocinas, interleucinas, etc. La participación de la respuesta inmune celular ante la infección por H. capsulatum ha sido estudiada en diferentes ocasiones con el fin de conocer hasta que grado se encuentra involucrada como mecanismo de defensa inmunológico. Estudios realizados en ratones a los que se les administró sueros antilinfocíticos demuestran que la disminución de las poblaciones de linfocitos T lleva a un incremento de la susceptibilidad del animal para contraer la infección (162,163). Más aún, animales atímicos, como los ratones nu/nu, infectados con el hongo, desarrollan la enfermedad en forma severa, confirmando la participación de la respuesta celular durante la infección (164,165). Asimismo, existen trabajos que apoyan la existencia de transferencia pasiva de inmunidad, al lograr incrementar la resistencia en animales no sensibilizados con H. capsulatum por la transferencia de linfocitos de bazo de animales inmunizados con dosis subletales del hongo (166,167).

Uno de los mecanismos más importantes en la defensa del huésped en la histoplasmosis es la actividad fagocítica del macrófago ya que se ha demostrado experimentalmente la activación de la célula ante el desafío de ratones con levaduras y con la forma micelial del hongo (155,168,169). Los macrófagos una vez activados tienen la capacidad de impedir el crecimiento intracelular del hongo y su activación es mediada por los linfocitos T sensibilizados, por lo que se dice que es necesaria la interacción macrófago-célula T para que el macrófago

pueda ejercer su acción fungicida contra la levadura (168,169). Sin embargo, los mecanismos de interacción entre el hongo y el macrófago no han sido definidos del todo y nos referiremos a éstos más adelante.

Por lo que se refiere al papel de los anticuerpos durante la infección por H. capsulatum, se ha propuesto un posible papel facilitador de éstos en la sobrevida del hongo, así como una acción moduladora de la respuesta inmune celular (170).

Estudios realizados sobre la inmunorregulación durante la histoplasmosis diseminada en ratones revelan cambios que van de la inmunosupresión a la inmunestimulación, en un tiempo determinado, lo que indica la existencia de actividades mediadas por las diferentes subpoblaciones celulares durante la infección (171). Más aún, existen estudios que establecen que los linfocitos con el fenotipo Thy 1, 2⁺, Ly1⁺ y Ly2⁺ durante la infección en ratones, aumentan en el bazo y disminuyen en el timo y la sangre periférica. Esto ha sido interpretado como la migración de células procedentes del timo, sangre y médula ósea, hacia el bazo, en ratones con histoplasmosis diseminada (172).

Otros estudios establecen la existencia de dos poblaciones de células supresoras, basándose en los siguientes hallazgos: una de ellas no presenta capacidad de adhesión al vidrio, además de que su capacidad supresora es abolida con anticuerpos anti-Thy1 o reducida con bajas dosis de radiación (300 R); la otra población no muestra alteraciones en su capacidad supresora ante altas dosis de radiación (500 R), ni ante mitomicina (172). Al determinarse el fenotipo de las células T supresoras de bazo, en animales infectados con el hongo, se observó que eran del tipo Ly2⁺, Ij⁺ (174). Ahora bien, existen estudios que revelan la producción de factores inmunorreguladores en cultivos de células supresoras procedentes de bazo de animales desafiados con el hongo: el factor

supresor de la histoplasmosis (SF-H) el cual es inactivado con tripsina, pH 2.2 y 56°C y el factor ayudador de la histoplasmosis (HF-H) también inactivable con tripsina, pero soporta temperaturas de hasta 100°C (175). Por lo anterior parece ser que en esta infección, al igual que en otras, el parásito tiene la capacidad de impedir la inducción de una respuesta inmunológica, por alteraciones en el sistema inmunorregulador del huésped, por lo que podría conducir a la persistencia del agente infeccioso o en ocasiones a la aparición de infecciones recurrentes (176,177). Estos fenómenos de inmunorregulación alterada y los posibles fenómenos de evasión de la respuesta inmune, y en especial de la fagocitosis, parecen conducir a la persistencia del microorganismo y sus antígenos y, por lo tanto, a la hiperactivación inmunológica con consecuencias inmunopatológicas, tal es el caso de la formación de lesiones como los granulomas, la hipertrofia de órganos linfoides, etc (178).

Por otro lado, parece necesario enfatizar que por lo general la histoplasmosis cura en forma espontánea, pero que existen casos en que la enfermedad progresa. Estudios al respecto describen la existencia de factores predisponentes del progreso de la enfermedad, tal es el caso de las superinfecciones o bien de los estados de inmunosupresión (síndrome de inmunodeficiencia adquirida, trasplante de médula ósea, cancer, etc.) (179,180,181,182), que ocasionan un balance favorable para el parásito, ya sea por los aspectos anteriores o por dosis muy grande del parásito durante la infección.

Ante el estímulo del hongo se establece una respuesta inmune, la cual hace que el fenómeno fagocítico sea facilitado por la presencia de receptores Fc en los macrófagos, permitiéndoles captar complejos antígeno-anticuerpo (182). La presencia de estos complejos inmunes circulantes ha sido descrita en histoplasmosis (184), coccidioidomicosis (185) y otras enfermedades causadas por hongos.

Más aún se ha determinado que productos subcelulares del hongo como la histoplasmina presenta actividad inmunosupresora (185) y de expansor policlonal (187), así como propiedades de activación de la vía alterna del complemento y de la quimiotaxis (188,189) lo que finalmente repercutiría en un fenómeno de amplificación de la respuesta inmune.

INTERACCIÓN H. CAPSULATUM-MACRÓFAGO EN EL PULMON

Hasta aquí se han analizado todos los elementos que, de una u otra manera, pudiesen estar involucrados en el establecimiento de la enfermedad histoplasmósica. Sin embargo, es necesario elucidar la forma en que éstos pudieran interactuar durante la infección. No existen reportes concluyentes al respecto, ya que se encuentran algunas incógnitas sobre como se llevan a cabo las interacciones en los periodos iniciales de la infección, así como en la fase inductiva de la respuesta inmune.

La llegada del hongo a los alveolos pulmonares, parece estar restringida a las esporas ya que el micelio, dado su tamaño, debería ser atrapado en las vías respiratorias altas (vibras, etc.). Los mecanismos defensivos de las vías respiratorias bajas (células, secreciones y microvellosidades) serían las encargadas de eliminar estructuras más pequeñas (microconidias) (190). Las esporas y levaduras que llegan al alveolo son endocitadas por el macrófago. El proceso endocítico a nivel alveolar durante la interacción macrófago alveolar-H. capsulatum parece presentarse de 4 a 6 hs. después de la infección, según se pudo estimar por experimentos in vitro, en los que se observó la fagocitosis de partículas que van de 3 a 10 micras de diámetro (levaduras, microconidias o fragmentos de hifas). El índice fagocítico fue mayor en macrófagos de animales previamente inoculado con la fase levaduriforme del hongo (191). Al estudiarse el proceso fagocítico en presencia de protoplastos, paredes celulares y levaduras completas, por macrófagos alveolares de conejo se vio que, tanto los macrófagos de animales previamente inmunizados como los no inmunizados, son incapaces de fagocitar protoplastos, no así levaduras, cuya fagocitosis aumenta en forma significativa en presencia de suero inmune y paredes celulares en el sistema (192). Una vez fagocitadas las esporas se inicia el proceso de conversión a la fase levaduriforme,

proceso que es independiente de la capacidad de sobrevivida e infectividad del hongo (193) y dependiente de la temperatura y de factores nutricionales (194). Estudios realizados sobre la interacción del hongo y el macrófago in vitro demuestran que existe un tiempo de generación del hongo en el macrófago, que va de 11 a 24 hs. a 25-37°C (195,196), así como también se establece la existencia de la inhibición de la síntesis de proteínas en el hongo, fenómeno que está en relación con una disminución en su capacidad de proliferación (197).

Los sistemas microbicidas de las células fagocíticas ante agresores micóticos, están dadas por la activación del sistema de mieloperoxidasa en la destrucción de H. capsulatum (198,199,200). El papel letal de esta enzima suele ser más eficaz sobre blastosporas que sobre microconidias. Más aún, se ha reportado que diferentes cepas de H. capsulatum presentan distinta susceptibilidad a la mieloperoxidasa, fenómeno que está en relación con los niveles de catalasa del hongo, de tal manera que: a mayor cantidad de catalasas, mayor resistencia a la lisis (201,202). Sin embargo, existen estudios que establecen que la presencia de mieloperoxidasa o superóxido en el macrófago no determina la inhibición del crecimiento de H. capsulatum, lo cual sugiere la existencia de otros mecanismos fungicidas en las células del sistema FMN (201). Al respecto, existen reportes que establecen que la transferrina insaturada tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de la fase levaduriforme ocasionando deformaciones en la levadura in vitro (203), lo que indica el posible papel de los radicales hidroxilo en esta función (73,81).

Por otra parte, algunos autores reportan que el hongo es altamente resistente a la digestión fagocítica, ya que encontraron que tanto macrófagos normales como activados son incapaces de digerir levaduras de H. capsulatum (191,192,194, 197,205,20). Este fenómeno es contrario a lo que se esperaría de la capacidad

defensiva de los macrófagos, ya que, de ocurrir, determinaría una gran susceptibilidad del huésped a la infección, por falta en la resolución del proceso infeccioso. Evidentemente éste, no es el caso. En contraposición, existen trabajos que establecen la capacidad de los macrófagos para destruir levaduras de H. capsulatum in vitro (208,209), siendo la dosis del hongo un factor determinante de la capacidad de su supervivencia y del desarrollo y evolución de la enfermedad. El mecanismo por el cual el hongo a altas dosis sería capaz de evadir la digestión aún no se conoce. El hecho de que la infección parece establecerse en forma pasiva (el hongo no parece tener capacidad para penetrar al macrófago), ya que el macrófago endocita al hongo y al hacerlo la célula se infecta, indica que la infección y la fagocitosis podrían considerarse, en este caso, como fenómenos indistinguibles uno del otro. En diversos tipos de relación huésped-parásito se han descrito factores que modifican la adhesión y la endocitosis, es decir, la infección intracelular. En el caso de H. capsulatum contra el macrófago, no se conocen factores que pudieran actuar negativamente; sin embargo, tal vez podría considerarse que se establece un fenómeno inhibitorio cuando el hongo se encuentra como protoplasto ya que se ha observado que en este estado se provoca un menor atrapamiento; pero cuando el hongo llega a ser endocitado en esta fase su digestión suele facilitarse (192). Lo anterior podría ser consecuencia de la ausencia de carbohidratos de la pared del hongo. Parecen no existir más factores de este tipo, ya que no se ha demostrado que el hongo cuente con la capacidad de producir sustancias antifagocíticas.

Al referirnos a los factores que pueden afectar positivamente la adhesión-endocitosis, citaremos la presencia de anticuerpos específicos y opsoninas derivadas del completo (210). Los primeros pueden estar presentes en el fluido alveolar que difunde del intersticio y los capilares (IgG) en el individuo previamente expuesto, las segundas posiblemente se instalan a consecuencia de la ac-

ción de los anticuerpos o por medio de la activación de la vía alterna por otros microorganismos o por el mismo hongo, ya que se ha encontrado, in vitro, que las células de la fase levaduriforme viables y muertas por formol, consumen C3 en sueros de cobayos deficientes en C4 (204). El hecho de que la pared celular de H. capsulatum y la histoplasmina contengan polímeros de manosa y galactosa determina esta posibilidad; además, lo anterior puede interpretarse como un fenómeno de interés en la respuesta inflamatoria del huésped (204).

-- La diferencia de resultados, entre estos autores y los anteriores, parece depender de las condiciones de cultivo y el manejo de los macrófagos: la incapacidad para destruir al hongo parece depender de las circunstancias que afectan al macrófago in vitro, ya que al semejar condiciones in vivo sí se observa capacidad fungicida. Sea como fuere, al ser el macrófago una célula terminal que es transportada hacia las vías respiratorias altas, para después ser eliminada por el mecanismo de deglución, se puede pensar que aún en el caso de que el microorganismo endocitado contara con mecanismos de evasión de la fagocitosis que le permitieran vivir en el macrófago, terminaría siendo eliminado por el mecanismo antes descrito. Por lo tanto, cuando el organismo está en condiciones de integridad funcional la penetración de este tipo de microorganismo no sería un fenómeno factible, más aún en los casos en los que el parásito carece de actividad tóxica (211,212) que le pudiera facilitar el ingreso por lesión de las células del alveolo (macrófagos, neumocitos). Sin embargo, ya que la penetración de Histoplasma capsulatum parece ocurrir en todos los casos en los que existe contacto con el microorganismo por vía respiratoria (argumento que es apoyado por la prevalencia de individuos histoplasmina positivos en las zonas endémicas) parece importante determinar cuales son los factores que controlan la dinámica de penetración. Ante este cuadro se pueden plantear diversas posibilidades, entre las que se encuentran: a) la presencia de factores concurrentes sistémicos

y locales que afectan la capacidad defensiva a nivel alveolar; y b) la existencia de trastornos en la defensa, inducidos por el parásito en cuestión.

Entre los primeros se puede considerar la presencia de fenómenos inmunosupresivos permanentes o episódicos que alteran la capacidad del macrófago en su diferenciación, maduración o funcionamiento (fatiga, "Stress", malnutrición, trastornos metabólicos y endócrinos, ciertos fármacos inmunomodulares, etc.) (213). Asimismo, se deben considerar los factores locales que afectan al macrófago modulando la fagocitosis negativamente, tal es el caso de: los virus respiratorios, la presencia de toxinas bacterianas, etc. (214,230), que en algún momento pudiesen afectar la interacción H. capsulatum-macrófago. Es de esperar que tales factores al inhibir la actividad del macrófago en cualquiera de sus fases, pudieran permitir la supervivencia, permanencia y reproducción del hongo, lo que aumentaría sus posibilidades de penetración. Más aún, si se produce citólisis del macrófago, la consecuente liberación de enzimas lisosomales sería un factor de disrupción de la arquitectura alveolar (independientemente de que ésta pueda, además, ser alterada por los factores endógenos antes mencionados) constituyéndose, en esta forma, un mecanismo de penetración a través de la barrera pulmonar, altamente factible.

Sin embargo, el proceso infeccioso parece también presentarse en ausencia de los factores mencionados. Esto indica que la interacción entre H. capsulatum y el macrófago alveolar, en los sitios de intercambio gaseoso, tiene su propia dinámica, es decir, que el macrófago de alguna manera es afectado en su actividad fisiológica o es modificado en su capacidad depurativa al interactuar con el hongo. Bajo este enfoque, es factible plantear tres posibilidades sobre el papel del hongo durante su interacción con el macrófago alveolar: a) por un lado se encuentra la posibilidad de que el hongo libere factores líticos o tóxicos con efecto citopático, lo que ocasionaría daño en la arquitectura del alveo

lo; b) la posibilidad de que el parásito cuente con un mecanismo de evasión de la actividad del macrófago que le permitiera sobrevivir ante la capacidad microbicida de la célula fagocítica; c) la posibilidad de que el hongo pueda modular la actividad del macrófago o inducirlo a funcionar fuera de su normalidad característica. Las dos últimas posibilidades se apoyan en aquellos reportes que muestran que aunque el macrófago presenta capacidad digestiva, aun cuando no se encuentra activado (104); si fagocita H. capsulatum no se aprecia destrucción del hongo (205-207).

La primera opción (a) es un mecanismo de penetración habitual de otros microorganismos que son inhalados a través de las vías respiratorias; éstos al dañar la estructura alveolar, promueven su instalación en el medio ambiente interno. La posibilidad de que H. capsulatum, al igual que otros parásitos, pudiera ser capaz de matar al fagocito, ocasionando daño alveolar por la liberación de enzimas lisosomales, no parece ser factible, ya que es evidente que los parásitos intracelulares estrictos, en general no eliminan a su huésped (237). Aunque algunos datos muestran reacciones degenerativas de los macrófagos infectados con este hongo in vitro (209), esta posibilidad puede descartarse si se considera que este hongo parece no ser productor de exotoxinas ni de otros factores líticos (211-212).

La posibilidad de la existencia del mecanismo de evasión (b) tiene fundamento en los últimos fenómenos reportados a este respecto en los diferentes tipos de interacciones macrófago-parásito, y sobre todo con los parásitos intracelulares. Se han demostrado diferentes mecanismos de evasión, entre los que se encuentran: 1- fallas en el reconocimiento; 2- inhibición de la adherencia y la endocitosis; 3- inhibición de la quimiotaxis; 4- evasión del fagosoma; 5- inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma; 6- muerte del fagocito; 7- niveles bajos

de componentes del complemento; 8- incorporación del parásito a la membrana celular (215-228).

Todos estos mecanismos han sido estudiados ampliamente y cuentan con evidencias específicas, tal es el caso del mecanismo de evasión del reconocimiento el cual determina fallas en la captación de antígeno, por parte del huésped. Los parásitos que ejemplifican satisfactoriamente este fenómeno serían Schistosoma mansoni y C. celulosae. El primero, una vez que adquiere las características del estado adulto, presenta determinantes antigénicos propios de los eritrocitos en su superficie, tal es el caso de los determinantes como los A,B,H, y los Lewis (214). Asimismo, el segundo se rodea de proteínas del huésped lo que impide su reconocimiento (215). La inhibición de la quimiotaxis se presenta en infecciones por M. tuberculosis siendo el factor "cuerda" el responsable de inhibir este fenómeno (216). Se ha establecido que ciertos microorganismos pueden inducir la inhibición de la quimiotaxis alterando el estímulo quimiotáctico o inhibiendo directamente la movilidad de la célula fagocítica; refiriéndonos al primer caso tenemos a P. aeruginosa que elabora una proteasa (elastasa) que actúa sobre C1,C3,C5 y C8 solubles y sobre C1 y C3 asociados a la célula, determinando la existencia de un estímulo negativo por parte del microorganismo para activar el sistema del complemento, tanto por la vía clásica como por la alterna (219). Asimismo la disminución en los niveles de los componentes del complemento puede ser el resultado de la acción de proteasas y endotoxinas que son liberadas por ciertas bacterias (229,230,156), lo que traería como consecuencia una disminución en la disponibilidad de C3 que es un componente indispensable para el proceso de fagocitosis bacteriana. Lo anterior se apoya en estudios con sueros depletados de complemento por inactivación con calor (231-232) EDTA (233-234), por tratamiento con veneno de cobra (235) o con anticuerpos anticomplemento (236). El mecanismo por el cual C3b unido a la superficie de un microorganismo invasor

pueda ser un factor crítico que influya en la fagocitosis del mismo, aún no se conoce. Apoyando la existencia de organismos que inhiben directamente la movilidad de la célula fagocítica encontramos el caso de E. Hystolítica cuyo efecto se cree que es el resultado de la presencia de un factor termolábil dializable capaz de actuar sobre los monocitos humanos (229). La inhibición de la adherencia y la endocitosis está ejemplificada por la existencia de ciertas bacterias cuyas cápsulas les confieren propiedades antifagocíticas, fenómeno que está en relación con su alto contenido de polisacáridos, tal es el caso del estreptococo del grupo A (221). El fenómeno de evasión del fagosoma se presenta al existir una infección intracelular real (es decir cuando el microorganismo invasor se encuentra en el citoplasma celular) ante la cual la célula fagocítica es incapaz de vaciar su contenido lisosomal en su citoplasma ya que de hacerlo se autodestruye. I. cruzi (224) y M. bovis (225) son ejemplos clásicos al respecto. Por otro lado, se ha visto que la capacidad de diferentes microorganismos virulentos para escapar de la digestión de las células fagocíticas está en relación con su capacidad de permanecer en el fagosoma, inhibiendo la subsecuente fusión con el lisosoma, como sucede durante la infección por M. tuberculosis vivo (226), siendo los responsables de este fenómeno algunos sulfátidos que se encuentran en la pared del bacilo (glicopéptidos de trealosa) (228). La incorporación del parásito a la membrana celular y la consecuente instalación de la infección intracelular queda ejemplificada en ciertos virus que tienen la propiedad de penetrar en la célula huésped fusionando su envoltura a la membrana plasmática de la célula blanco, estableciéndose de esta manera la infección; un ejemplo clásico lo constituyen los paramixovirus (Sendai) (90).

Para H. capsulatum no se ha descrito ningún fenómeno de evasión, sin embargo, el hecho de que sea posible observar al hongo después de varias horas o días de ser endocitado (209), sugiere esta posibilidad. Recientemente han surgido

ciertos datos que son compatibles con la posibilidad de que H. capsulatum integro tenga la capacidad de inducir la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma (209). En ese mismo trabajo se reportan micrografías que pueden ser evidencias a favor de la presencia de las levaduras en el interior del citoplasma. Esto podría constituir un proceso de perpetuación de la infección, así como formar parte de la fenomenología presente durante los pasos iniciales de la infección. Apoyando lo anterior, Dumont (208), establece la existencia de dos tipos de vacuolas fagocíticas durante la interacción macrófago-H. capsulatum: por una parte, vacuolas cuya membrana fagosomal se encuentra adherida a la levadura y que parecen no disponer de fosfatasa ácida, en su interior el hongo parece conservar su integridad, fenómeno que podría ser el resultado de la ausencia de fusión fagosomal; el segundo tipo de vacuolas es de dimensiones mayores y presenta en su interior una o más levaduras en diferentes grados de digestión, así como fosfatasa ácida, estableciéndose en este caso la fusión del fagosoma con el lisosoma. Lo anterior podría estar en relación con lo que pudiera ser un mecanismo de evasión de la fagocitosis dosis dependiente y, al parecer, altamente compatible con el establecimiento de la histoplasmosis.

La tercera posibilidad (c) aún no ha sido explorada y su estudio parece ser pertinente ya que se sabe H. capsulatum produce y libera diversas sustancias al medio ambiente, las cuales solo se han estudiado como antígenos o inmunógenos. Es razonable pensar que estos productos contengan sustancias moduladoras, las cuales le confieran al hongo ciertas ventajas en su relación con su huésped celular inmediato el macrófago. Esta posibilidad sería un factor determinante para su penetración e instalación. Al ser el macrófago alveolar una célula terminal cuya función es la eliminación de agentes tóxicos a través de la digestión y el arrastre al exterior de las partículas inhaladas, es posible que alteraciones en su funcionamiento influyan en forma importante en la instalación de la infección

pulmonar histoplasmósica. La posibilidad de que ésto sea inducido por los productos del hongo se explora en el trabajo que se expone en la siguiente parte.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Kuhn, Ch. (1976). The cells of the lung and their organelles. In: Crystal, R. G., ed. The biochemical basis of pulmonary function. New York: Dekker; 3.
- 2.- Jeffery, P.K., Reid, L.M. (1977). The respiratory mucous membrane. In: Braim, J.D., Proctor, D. F., Reid, L.M., eds. Respiratory defense mechanisms, part I. New York: Marcel, D. 193.
- 3.- Phipps, R.J. (1981). The airway mucociliary system In: Widdicombe, J. G. ed. International review of physiology III. Baltimore University. Park Press, 23: 213.
- 4.- Richardson, P. S., Phipps, R.J. (1978). The anatomy physiology, Pharmacology and pathology of tracheobronchial mucus secretion and the use of expectorant drugs in human disease. Pharmacol. Ther. (B); 3: 441.
- 5.- Jeffery, P. K., Reid, L. (1975). New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron-microscopic study. JANAT. 120: 295.
- 6.- Breeze, R.G. Wheeldon, E.B. (1977), The cells of the pulmonary airways. Am. Rev. Respir, Dis. 116: 705.
- 7.- Meyrick, B., Reid, L. (1975). In vitro incorporation of (³H) glucose by the mucous and serous cells of the human bronchial submucosal gland: a quantitative electron microscopic study. J. Cell Biol. 67: 320.
- 8.- Spicer, S.S., Machizuki, J. Setser, M.E., Martínez, J.R. (1980), Complex carbohydrates of rat tracheobronchial surface epithelium visualized ultrastructurally Am. J. Anat. 158: 93.
- 9.- Jeffery, P. K., Reid, L. M. (1981). The effect of tabaccosmoke, with or without phenylmethyloxadiazole (PMO), on rat bronchial epithelium: a light and electron microscopic study. J. Pathol. 133: 341.
- 10.- Reid, L. (1960). Measurement of bronchial mucus gland layer: a diagnostic yardstick in chronic bronchitis. Thorax. 15: 132.

- 11.- Meyrick, B., Sturgess, Reid, L. (1969). Reconstruction of the duct system and secretory tubules of the human bronchial submucosal gland. *Thorax*. 24: 729.
- 12.- Reid, L., Bhaskar, K., Coles, S. (1982). Clinical aspects of respiratory mucus. In: Chantler, E.M., Elder, J.B., Elstein, M. eds. *Mucus in health and disease II*. New York: Plenum; 369.
- 13.- Shwihamer, J.H., Marom, Z., Kaliner, M. (1980). Immunologic and neuropharmacologic stimulation of mucous glycoprotein release from human airways in vitro. *J. Clin. Invest.* 66: 1400.
- 14.- Berlin, D., and Claude, J.M. (1983). Cells of the lung. Biology and Clinical Implications. *Am. Rev. Resp. Dis.* 127; (3): 366.
- 15.- Gordon, R.E, Lnae, B.P., Miller, F. (1980). Identification of contractile proteins in basal bodies of ciliated tracheal epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* 28: 1189.
- 16.- Wanner, A. (1977). Clinical aspects of mucociliary transport. *Am. Rev. Resp. Dis.* 116:73.
- 17.- Widdicombe, J.G. Pack, R.J. (1982). The Clara cell. *Eur. J. Respir. Dis.* 63: 202.
- 18.- Martínez, J.R. (1980). Complex Carbohydrates of rat tracheobronchial surface epithelium visualized ultrastructurally. *Am. J. Anat.* 158: 93.
- 19.- McDowell, E.M., Barret, L.A., Trump, B.F. (1976). Observations on small granule cells in adult human bronchial epithelium and in carcinoid and oat cell tumors. *Lab. invest.* 34: 202.
- 20.- Kaufman, S.L. (1980). Cell proliferation in the mammalian lung. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 22: 131.
- 21.- King, R.J. (1979). Utilization of alveolar epithelial type II cells for the study of pulmonary surfactant. *Fed. Proc.* 38: 2637.
- 22.- Miller, W.A. (1958). Studies on the amido and C⁻ terminal residues in proteins. 4. Separation and quantitative determination of amino alcohols. *Biochem. J.* 68: 118.

- 23.- Bienenstock, J., Johnston, N., and D.Y.E. (1973). Bronchial lymphoid tissue, 1. Morphologic characteristics, Lab. Invest., 28: 686.
- 24.- Chamberlain, D.W., Napajaroonsri, C., and Simon, G.T. (1983). Ultrastructure of the pulmonary lymphoid tissue Am. Rev. Respir. Dis. 108: 621.
- 25.- Tourville, D.F., Adler, R.H., Bienenstock, J., and Tomasi, T.B. (1969). The human secretory immunoglobulin system: Immunohistological localization of gamma A₂ secretory "piece" and lactoferrin in normal human tissues. J. Exp. Med., 129: 411.
- 26.- Callerame, M.L., Condemi, J.J., Idhigika, K., Johansson, S.G.O., and Vaughan, J.H. (1971). Immunoglobulins in bronchial tissues from patients with asthma, with special reference to immunoglobulin, J. Allergy, 47: 187.
- 27.- Leak, E. S. and Heise, E. R. (1967). Comparative cytology of alveolar and peritoneal macrophages from germ-free rats, the reticuloendothelial system and atherosclerosis. In; advances in Experimental Med. and Biology, ed by: DiLuzio, N. R., and Paoletti, R. 1: 136.
- 28.- Lew, R.W., Eddleston, A.L. W. F., Hadden, J.W., and Good, R.A. (1972). Mechanism of action of migration inhibitory factor (MIF). I Evidence for a receptor for MIF present on the peritoneal macrophage but not on the alveolar macrophage. J. Exp. Med. 136: 589.
- 29.- Cohn, A.Z., and Wiener, E. (1963). The particulate hydrolases of macrophages. I. Comparative enzymology, isolation and properties, J. Exp. Med. 118: 991.
- 30.- Ford, R.J. Jr., and Kuhn, C. (1977). Immunologic competence of alveolar cells: I. The plaque-forming response to particulate and soluble antigens. Am. Rev. Resp. Dis. 107: 763.
- 31.- Waldman, R. H., and Henny, C.S. (1971). Cell-mediated immunity and antibody response in the respiratory tract after local and systemic immunization. J. Exp. Med. 134: 482.
- 32.- Nakahata and Ogawa (1982). Identification in culture of a class of haemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential hemopoietic clones. Proc. Nat. Aca.

Sci. U. S. A. 79: 3843.

- 33.- Nowell, P.C., Hirsch, B. E., Fox, D. H., and Wilson, D.B. (1977). Evidence for the existence of multipotential and restricted cells of the myeloid and lymphoid systems. *J. Exp. Med.* 145: 1567.
- 34.- Iscove, N. N. (1979). Erythropoietin-independent stimulation of early erythropoiesis in adult marrow cultures by conditioned medium from lectin stimulated mouse spleen cells. In: haemopoietic cell differentiation. Colde, D. E., et al ed. New York Academic. Press. 37.
- 35.- Stephenson, J. R., Axelrad, A.A., Mcleoad, D. L., and Shreeve, M. M. (1971). Induction of colonies of hemoglobin-synthesising cells by erythropoietin in vitro. *Proc. Nat. Aca. Sci. U.S.A.* 68: 1542.
- 36.- Till, J.E., and McCulloch. E. A. (1980). Haemopoiesis stem cell differentiation. *Bioch. Bioph. Acta.* 605: 431.
- 37.- Metcalf, D., and Moore, D. A. S. (1971). Haemopoietic Cells. Amsterdam: North Holland Press. p. 13.
- 38.- Wu. and et al. (1968) Cytological evidence for a relationship between normal hemopoietic colony forming cells and cells of the lymphoid system. *J. Exp. Med.* 127: 455.
- 39.- Abramson, S., Miller, R.G., Phillips, R.A. (1977) The identification in adult bone marrow of pluripotential on the restricted stem cells of the myeloid an lymphoid systems, *J. Exp. Med.* 115: 1567.
- 40.- Nowell, P.C., Hirsch, B. E., Fox, D.H., Wilson, D. N. (1977). Evidence for the existence of multipotential and restricted cells of the myeloid and lymphoid systems. *J. Exp. Med.* 145, 1567.
- 41.- Eaves, A. C. and Bruce, W. R. (1974). *Cell Tissue Kinetics.* 7; 19.
- 42.- Metcalf, D. (1981) Hemopoietic colony stimulating factors. In: *Tissue growth factors.* Baserga. R. Berlin, Heidelberg. New York: Springer Verlag, 343.
- 43.- Metcalf, D. (1971). Acute antigen-induced elevation of serum colony-stimulating factor (CFS) levels. *Immunology.* 21; 427.

- 44.- Quesenberry, P. J., Morley, A., et. al (1972). Effect of endotoxin on granulopoiesis and colony-stimulating factor.- *New.Engl. J. Med.* 286; 227.
- 45.- Handman, E., and Burgess, A.W. (1979). Stimulation by granulocyte-macrophage colony stimulating factor of Leishmania tropica killing by macrophages. *J. Immunology.* 122; 1134.
- 46.- Calcagno, M., Pérez, P.J., Waldo, G.M. Cabrera, G., Weiss, S.B. (1982). Evidence of the existence of a factor that induces Fc receptors on bone marrow cells. *Blood* 59: 4; 756.
- 47.- Allen, T.D., and Dexter, T.M. (1970). Cellular interrelationships during in vitro granulopoiesis Differentiation. 6; 191.
- 48.- Allen, T.D., and Dexter, T.M. (1982). Ultrastructural aspects of erythropoietic differentiation in long-term bonemarrow culture. *Differentiation.* 21; 86.
- 49.- Van Furth, R. (1978). Mononuclear phagocytes in inflammation. In: *Hand book on experimental pharmacology "Inflammation and anti-inflammatory drugs"*. J. R. Vane and S.H. Ferreira, Berlin, Heidelberg, New York. Springer Verlag. 68.
- 50.- Van Furth, R. (1980). Cells of the mononuclear phagocyte system. Nomenclature in terms of site and conditions. In: *Mononuclear phagocytes; Functional aspects.* R. Van Furth. The Hague, Boston, London: Martinus Nijhoff Publishers. 1.
- 51.- Van Furt-, F., Diesselhoff-den Dulk, M.M.C., Roeburn, J.A., van Zwet, T.L., Crofton, R. and van Blusse Ond., Alblas, A. (1980). Characteristics, origin and kinetics of human and murine mononuclear phagocytes. In: *mononuclear phagocytes; Functional aspects.* R. van Furth (ed). The Hague Boston, London; Martinus Mijhoff. Publishers. 279.
- 52.- Van Furth, R., and W. Sluiter. (1983). Current views on the ontogeny of macrophages and the humoral regulation of monocytopoiesis. *Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 5; 614.
- 53.- Metchnikoff, E., (1905) "Immunity in infective diseases" (F.G.Binnie, Transl) Cambridge Univ Press, London New York.

- 54.- Loos, M. (1983). "The functions of endogenous C1q". A subcomponent of the first component of complement, as a receptor on the membrane of macrophages. *Mol. Immunol.* 19:10. 1229.
- 55.- Dinarello, C.A., Goldin, N.P., and Wolff, S.M. (1974). Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens. *J. Exp.* 286. 227.
- 56.- Havell, A.E. (1983). Endotoxin-induced interferon synthesis in macrophage cultures. *J. Reticuloendothelial Soc.* 33; 369.
- 57.- Fleit, H.B., and Rabinovitch, M. (1980). Interferon production by cultivated mouse marrow macrophages. *Fed. Proc.* 39; 453.
- 58.- Francois, B.J., Lesavre, P. (1983). Hipersensibilidad inmediata e inmunidad mediada por células. En: *Immunología*. ed. Masson. 1ª edición. 5: 105.
- 59.- Stobo, D.J. (1984). Interacciones celulares en la expresión y regulación de la inmunidad. En: *Immunología Clínica Fudenberg Hugh. H.* 4ª ed. 8; 91.
- 60.- Pierce, W.C.M.D.PhD. (1980). Macrophages: Modulators of immunity. *Am. J. Pathol.* 98. 1; 10.
- 61.- Hopper, E.L., and Cahill, JPH. (1983). Immunoregulation by macrophages II. Separation of mouse peritoneal macrophages having tumoricidal and bactericidal activities and those secreting PGE and Interleukin 1. *J. Reticuloendothelial Soc.* 33; 443.
- 62.- Adams, O.D. (1980). Effector mechanisms of cytolytically activated macrophages. I. Secretion of neutral proteases and effect of protease inhibitors. *J. Immunol.* 124:1; 286.
- 63.- Adams, O.D. Kuo-Jang Kao., Roderick Farb, and Salvatore, V. Pizzo (1980). Effector mechanisms of cytolytically activated macrophages. II cretion of a cytolytic factor by activated macrophages and its relationship to secreted neutral proteases. *J. Immunol.* 124.1; 293.
- 64.- Kurlans, J.I., Pelus, L.M., Ralph, P., Bockman, R.S., and Moore, M.A.S. (1979). Induction of prostaglandin E Synthesis in normal and neoplastic macrophages. Rol for colony stimulating factor (S) distinct from effects on myeloid progenitor cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. SI. U.S.A.* 76; 2326.

- 65.- Lemaire, I. (1983). Asbestos exposure enhances the release of fibroblast growth factor by sheep alveolar macrophages. *J. Reticuloendothelial Soc.* 33; 275.
- 66.- Page, C.R., Davies, P., and Alleson, C.A. (1978). The macrophage as a secretory cell. *International review of cytology* (ed) by G.H. Bourne and J.F. Danielli, Acad. press. 52; 119.
- 67.- Stutman, O. (1983). Interleuquinas y funcion de las células T. En: *Inmunología* 2:4; 147.
- 68.- Gillis, S. (1983). Interleukin biochemistry and biology: summary and introduction. *Fed. Proc.* 42:9; 2635.
- 69.- Cohon, Z.A., and Benson, B. (1965). The differentiation of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 121; 153.
- 70.- Saito, K., and Suter, E. (1965). Lysosomal acid hydrolases and hyperreactivity to endotoxin in mice infected with BCG. *J. Exp. Med.* 121; 739.
- 71.- Seymour, J.G., Poulter, W.L., Bojill, J., Hobbs, S., Janossy, G., Brooks, D., Zola, H. and Brodley, J. (1983). The reactivity of a monoclonal antibody against cells of the monocyte-macrophage. Series in sections of normal and inflamed human tissues. *J. Ret. Soc.* 34; 463.
- 72.- Maldonado, M.M.G. (1985). Reconocimiento intercelular: factores involucrados en el reconocimiento por macrófagos. Tesis de Maestría Facultad de Ciencias. U.N.A.M.
- 73.- Klebanoff, J.S. (1973). *Cytocidal Mechanisms of Phagocytic Cells*. Department of Medicine, University of Washington. Seattle, Washington, USA. Cap. 41 pp 720.
- 74.- Root, K.R., Metcalff, J., Oshino, N., Chance (1975). Peroxide hydrogen release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation quantitation and some regulating factors. *J. Clin. Invest.* 55:5; 945.
- 75.- Murray, W.W., Cjawanee, W., and Cohn, A.Z., (1979). Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II The role of oxygen intermediates. *J. Exp. Med.* 150; 950.
- 76.- Daems, W. Th., Poelmann, R.E. and Brederoo, P. (1973). Peroxidatic activity in resident peritoneal macrophages and exudate monocytes of the

- guinea pig after ingestion of latex particles. *J. Histochem. and Cytochem.* 21:1; 93.
- 77.- Sasada, M., and Johnston, B.R., Jr. (1980). Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of candida by macrophages. *J. Exp. Med.* 1:152(1); 85.
- 78.- Krinsky, N.I. (1974). Singlet excited oxygen as a mediator of the anti-bacterial action of leukocytes. *Science* 186; 363.
- 79.- Klebanoff, S.J. and Hamon, C.B. (1975). Antimicrobial systems of mononuclear phagocytes. In: *Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology*; van Furth, R. (ed), Oxford Blackwell, . 507.
- 80.- Nathan, F., C.M.D., Murray, W.H.M.D., and Zanvil, A., Cohn, H.B. The macrophage as effector cell. *New England. J. Med.* 303:11; 622.
- 81.- Nathan, F.C. (1983). Mechanisms of macrophage antimicrobial activity. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 77:5; 620.
- 82.- Patterson-Delafield, J., Martínez, R.J., and Lehere, R.I. (1980). Microbicidal cationic proteins in rabbit alveolar macrophages: a potential host defense mechanism. *Infect. Immunity.* 30; 180.
- 83.- Miller, T.E. (1969). Killing and lysis of gram-negative bacteria through the synergistic effect of hydrogen peroxide, ascorbic acid, and lysozyme. *J. Bact.* 98; 949.
- 84.- Harwitz, A.L. and Crystal, R.G. (1976). Collagenase from rabbit pulmonary alveolar macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69: 296.
- 85.- Pantalone, R. My Page, R.C. (1977). Enzyme Production and secretion by lymphokine activated macrophages. *J. Ret. Endothel. Soc.* 21; 341.
- 86.- Gordon, S., and Werb, Z. (1976). In vitro synthesis of factor B of the alternative pathway of complement activation by mouse peritoneal macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73; 872.
- 87.- Cochrane, C.G., Revak, S.D., Wepper, K.D., Johnston, A., Morrison, D.C. and Ulevitch, R. (1974). Soluble mediators of injury of the microvasculature, Hageman factor and the Kinin-forming, intrinsic clotting and the fibrinolytic systems. *Microvasc. Res.* 8(1): 112.
- 88.- Samuel, C., Silvestein, R. Steinman, M., and Cohn, A.Z. (1977). Endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 701.

- 89.- Hirsch, M.S. Zisman, B., and Allison, A.C. (1971). Macrophages and age-dependent resistance to herpes simplex virus in mice. *J. Immunol.* 104; 1160.
- 90.- Rabinovitch, M., Manejias, R.E. Rusao, M., and abbey, E.F. (1971). Increased spreading of macrophages from mice treated with interferon inducers. *Cells Immunol.* 29; 86.
- 91.- Huang, K., Donahae, R.M., Gordon, F.B., and Dresser, H.R. (1971). Enhancement of phagocytosis by interferon containing preparations. *Infect. Immun.* 4; 581.
- 92.- Hamburg, 2.I. Manejias, R.E., and Rabinovitch, M. (1978). Macrophage activation: Increased ingestion of IgG-coated-erythrocytes after administration of interferon inducers to mice. *J. Exp. Med.* 147; 593.
- 93.- Schulltz, R.M., Chivigos, M.A., and Heine, U.I. (1978). Functional and morphologic characteristics of interferon heated macrophages. *Cells Immunol.* 35;85.
- 94.- Einstein, L.P., Scheetverg, E.E., and Collen, H.R. (1976) Synthesis of the second component of complement by long term primary cultures of human monocytes. *J. Exp. Med.* 143; 114.
- 95.- Lai, A., Fat, R.F.M., and van Furth, R. (1975). In vitro synthesis of some complement components (C1q, C3, and C4) by lymphoid tissues and circulating leukocytes in man. *Immunology* 28; 359.
- 96.- Bentley, C., Bitter-Suermann, D., Hadding, and Brade, V. (1976). In vitro synthesis of factor B of the alternative pathway of complement activation by mouse peritoneal macrophages. *Eur. J. Immunol.* 6: 393.
- 97.- Benacerraf, B. (1981). Role of MHC gene products in immune regulation. *Science* 212; 1229.
- 98.- Steinmetz, M., and Hood, L. (1983). Genes of the major histocompatibility complex in mouse and man. *Sci.* 222; 727.
- 99.- Beller, D.I. and E.R. Unanue (1978). Thymic macrophages modulate one stage of T cell differentiation in vitro. *J. Immunol.* 121; 1861.
- 100.- Cowing, C., B.C. Shwartz, and H.B. Dckler. (1979) Macrophage Ia antigens I. macrophage populations differ in expression of Ia antigens. *J. Immunol* 120; 378.

- 101.- Beller, D.I. and E.R. Unanue (1980). Ia antigens and antigen presenting function of thymic macrophages. *J. Immunol.* 124; 1433.
- 102.- Dorf, M.E., and E.R. Unanue (1978). Subpopulations of peritoneal macrophages identified with anti-Ia sera. In: *Ir gene Workshop*. Edited. by H.O. Mc Devitt Accademic. Press, inc., New York. 171.
- 103.- Schwartz, R.H., A. Yano, and W.D.Paul. (1978). Interaction between antigen-presenting cells and primed T lymphocytes, presenting cells. *Immunol Rev.* 40; 153.
- 104.- Beller, I.D., Kiely, J.M., and Unanue, R.E. (1980). Regulation of macrophage populations I. Preferential Induction of Ia-Rich peritoneal exudates by Immunologic Stimuli. *J. Immunol.* 123:3; 1426.
- 105.- Gordon, S. and Cohn, Z.A. (1978). Macrophage plasminogen activator by T lymphocytes and specific antigen. *J. Exp. Med.* 147; 1175.
- 106.- Nathan, C., Silverstein, S.C., Brukner, L.H. and Cohn, Z.A. (1979). Extra-cellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. II hydrogen peroxidase mediator of cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 149; 100.
- 107.- Blanden, R.N., Leofford, J.J., and Mackaness, G.B. (1969). The host response to Calmette-Guerin bacillus infection in mice. *J. Exp. Med.* 129; 1079.
- 108.- Old, L.J., Benacerraf, B., Clarke, B.A., Carswell, C.E. and Stockert, E. (1961). The role of the reticuloendothelial system in host reaction to neoplasia. *Cancer. Research* 21; 1281.
- 109.- Spitalny, G.L. (1981). Dissociation of bactericidal activity from the other functions of activated macrophages in exudates involved by thioglycollate medium *Infect. Immun.* 34; 274.
- 110.- Nathan, C.F., and Cohn, Z.A. (1980). Role of oxygen dependent mechanisms in antibody-induced lysis of tumour cells by activated macrophages. *J. Exp. Med.* 152; 198.
- 11.- Beller, D.A., Springer, T.A. and Schreiber, R.D. (1982). Anti-mac-1 selectively inhibits the mouse and human by the type three complement receptor. *J. Exp. Med.* 156; 1000.
- 112.- Pierce, W.C.MD.PhD. (1980). Macrophages: Modulators of Immunity, *Am. J. Pathol.* 98:1; 10.

- 113.- Bach, J.F., Lesavre, P. Regulacion de las respuestas inmunológicas. (1983). En: *Inmunología*. ed. Masson. cap. 6; 111.
- 114.- Gillis, S. (1983). Interleukin biochemistry and biology: summary and introduction. *Fed: Proc.* 42:0; 2635.
- 115.- Wagner, H., Rollinghoff, M. Kurrle, R, Seiler, F.R. ed. Interleukin-2. *Behring. Inst. Mitt.* (1980). 67; 1.
- 116.- Moller, G. ed. Interleukins and Lymphocyte activation (1982). *Immunol. Rev.* 63; 5.
- 117.- Rocklin, E.R. (1982). Mediadores de la inmunidad celular. en: *Inmunología clínica* H. Hugh, Fudenberg. 147.
- 118.- Carvajal, S. RE. (1985). Inmunomodulación por agentes infecciosos. Tesis Doctoral U.N.A.M. 175 p.
- 119.- Van Furth, F., Z.A. Cohn, J.G. Hirsch, J.H., Humphrey, W. G. Spector, and H. L. Langevoort. (1972). The mononuclear phagocyte system. A new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. *Bull. W.H.O.* 46:848.
- 120.- Ungar, J. Jr., and G.R. Wilson. (1935). Monocytes as a source of alveolar phagocytes. *Am. J. Pathol.* 11; 681.
- 121.- Godleski, J., and J. Brain. (1972). The origin of alveolar macrophages in mouse radiation chimeras. *J. Exp. Med.* 136; 630.
- 122.- Bowden, D., J. Adamson, W. Grantham, and J.P. Wyatt. (1969). Origin of lung macrophage: evidence derived from radiation injury. *Arch. Pathol.* 88; 540.
- 123.- Bowden, D., and J. Adamson. (1972). The pulmonary interstitial cell as imediated precursor of the alveolar macrophage. *Am. J. Pathol.* 68; 521.
- 124.- Masse, R., P. Fritsch, D. Nobbe, J. Lafuma., and J. Chretien. (1977). Cytokinetic study of alveolar macrophages and epithelial cells. *ERDA. Symps. Series.* 43;106.
- 125.- Blusse van Ond., Alblas and R. van Furth. (1979). Origin, Kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J. Exp. Med.* 149; 1504.

- 126.- Daubor, H.J. Holian, A., Rasemiller, E.M., and Daniels, P.R. (1983). Separation of bronchoalveolar cells from the guinea pig on continuous density gradients of percoll; Morphology and cytochemical properties of fractionated lung macrophages. *J. Reticuloendothelial. Soc.* 33; 119.
- 127.- Habian, A., Cauber, H.J., Diamond, S.M., and Daniele, P.R. (1983). Separation of bronchoalveolar cells from the guinea pig on continuous gradients of percoll; functional properties of fractionated lung macrophages. *J. Reticuloendothelial. Soc.* 33; 157.
- 128.- Brain, J.D. (1970). Free cells in the lungs. *Arch. Intern. Med.* 126; 477.
- 129.- Spritzer, A.A., J.A. Watson., J.A. Auld, and M. Guethoff. (1968). Pulmonary macrophage clearance. The hourly rates of transfer of pulmonary macrophages to the oropharynx of the rat. *Arch. Environ. Health.* 17; 726.
- 130.- Lauwerijns, J.M., and J.H. Baert. (1977). Alveolar Clearance an the role of pulmonary lymphatics. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115; 625.
- 131.- Sorakin, S.P., and J.D Brain. (1975). Pathways of clearance in mouse lungs exposed to iron oxide aerosols. *Anat. Rec.* 181; 581.
- 132.- Green, G.M (1973). Alveolobroncholar transport mechanism. *Arch. Intern. Med.* 131; 109.
- 133.- Lyons, R.C., and Lipscomb, F.M. (1983). Alveolar macrophages in pulmonary immune response. I. Role in the initiation of primary immune responses and in the selective recruitment of T lymphocytes to the lung. *J. Immunol.* 130; 3 113.
- 134.- Kappler, J. Wand, P.C. Marrack. (1976). Helper T cells recognize antigen and macrophages surface components simultaneously. *Nature*, 262; 797.
- 135.- Toews, G.N., P.D. Bergstresser., and J.W. Streilein. (1980). Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or inresponsiveness follow skin painting with DNFB,. *J. Immunol.* 124; 445.
- 136.- Lipscomb, M.F., C.R. Lyons, R.MO¹Hara, J., and J. Stein sttreilein. (1981). The antigen-induced selective recruitment of specific T lymphocytes to the lung. *J. Immunol.* 128; 111.

- 137.- Emeson, E.E., A.J. Norin, and F.J. Beith. (1982). Antigen-induced recruitment of circulating lymphocytes to the lungs and hilar lymph nodes of mice challenged intratracheally with alloantigens. *Am. Rev. Res. Dis.* (in press).
- 138.- Lypscomb, M.F., G.R. Toews, C.R. Lyons, and J.W. Uht (1981). Antigen presentation by guinea pig alveolar macrophages. *J. Immunol.* 126; 286.
- 139.- Pennline, K.J., Conrad, R.E., Gerber, H.R., Hersocwitz, H.B. (1979) Suppressive effect of alveolar macrophages on the in vitro immune response of rabbit lymphocytes. *J. Reticuloendoth. Soc.* 25; 495.
- 140.- Wing, J.E., Remington, S.J., (1982). Hipersensibilidad retardada y funciones de los macrófagos. En: *inmunología clínica*. Fudenberg, Hugh. H. 3ª ed. cap. 11; 131.
- 141.- Golstein, E., Lippert, W., and Warshauer, D. (1974). Pulmonary alveolar macrophage defender against bacterial infection of the lung. *J. Clin. Invest.* 54; 519.
- 142.- Cohen, B.A., and Cline, J.M. (1971). The human alveolar macrophage: Isolation cultivation in vitro, and studies of morphologic and functional characteristics. *J. Clin. Inv.* 50; 1390.
- 143.- Hunninghake, G.W., Gallin, J. I., and Fanci, A.S. (1978). Immunologic reactivity of the lung. The in vivo and in vitro generation of a neutrophil chemotactic factor by alveolar macrophages. *Am. Rev. Resp. Dis.* 117; 15.
- 144.- Kazmierowski, J.A., Gallin, J.I., and Reynolds, H.Y. (1977). Mechanism for the inflammatory response in primate lung. Demonstration and partial characterization of an alveolar macrophage-derived chemotactic factor with preferential activity for polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* 59; 273.
- 145.- Merrill, W.W., Naegel, G.P., Matthay, R.A., and Reynolds, H.Y. (1980). Alveolar macrophage-derived chemotactic factor kinetics of in vitro production and partial characterization. *J. Clin. Invest;* 65; 268.
- 146.- Damiano, V.V., Cohen, A., Tsang, A., Batra, G., and Petersen, R. (1980) A morphologic study of the influx of neutrophils into dog lung alveoli after lavage with sterile saline. *Am. J. Pathol.* 100; 2. 349.

- 147.- Shaw, J.O., (1980). Leukocytes in chemotactic-fragment-induced lung inflammation. Vascular emigration and alveolar surface migration. Am. J. Pathol. 100; 2:283.
- 148.- Coodwin, A.R., Jr. Shapiro, L.J. Disseminate Histoplasmosis; Clinical pathologic Correlation. In: Medicine. 59.1.
- 149.- Rippon, J.W. (1974). Medical micology. W.B. Saunders company, Philadelphia.
- 150.- González Ochoa, A. y Relix, D. Distribución geográfica de la reactividad cutánea a la histoplasmina en México (1971). Rev. Invest. Salud Publ. 31: 74.
- 150.- González Ochoa, A. y Relix, D. Distribución geográfica de la reactividad cutánea a la histoplasmina en México (1971). Rev. Invest. Salud Publ. 31: 74.
- 151.- González Ochoa, A. (1969). Las micosis pulmonares en México y centroamérica. Rev. Invest. Salud, Pub. 29:179. (Méx).
- 152.- Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, N., Gensberg, S.G., Wood, B.W. (1976). Tratado de microbiología. ed. Salvat. 1005.
- 153.- Thorn, W.G., Adams, D.R., Braunawald, E., Isselbacher, J.K., Pelersdorf, R.G. (1979). Medicina interna. Harrison, Tomo I, 5 ed. esp. pp. 1111.
- 154.- Drutz, J.D., and Graybill, R.J. (1982). Enfermedades infecciosas. En: Inmunología clínica. ed. Fudenberg, H. 3ª ed. cap. 37 pp. 639.
- 155.- Kimberlin, C.L., Hariri, A.R., Hempel, H.O., and Goodman, N.L. (1981). Interactions between Histoplasma capsulatum and macrophages from normal and treated mice; comparison of the mycelial and yeast phases in alveolar and peritoneal macrophages. Infect. Immun. 34:6.
- 156.- Freeman, B.A. (1983). Tratado de Microbiología de Burrows. Nueva editorial interamericana.
- 157.- Domer, J.E. (1967). Comparative study of the cell walls of the yeastlike and mycelial phases of Histoplasma capsulatum. J. bacteriol. 94; 466.
- 158.- Berliner, M.D. (1968). Primary subcultures of Histoplasma capsulatum. I. Macro and micromorphology of the mycelial phase. Sabouroudia. 6. 111.

- 159.- Domer, J.E. (1971). Monosaccharide and chitin content of cell walls of cell walls of Histoplasma capsulatum and Blastomyces dermatitidis. J. Bacteriol. 107; 870.
- 160.- Kanetsuna, F., Carbonell, L.M. (1974). Chemical and ultrastructural studies on the cell wall of the yeastlike and mycelial forms of Histoplasma capsulatum. Mycopathol. My col. appl. 54; 1.
- 161.- Gioconda San-Blas, Domitila, Ordaz and F.J. Yegres. (1978). Histoplasma capsulatum: Chemical variability of the yeast cell wall. Sabouraudia. 16; 279.
- 162.- Adamson, D.M., Cozad, G.C. (1969). Effect of antilymphocyte serum on animals experimentally infected with Histoplasma capsulatum. J. Bacteriol. 100; 754.
- 163.- Adamson, D.M., Cozad, G.C. (1969). Effect of antilymphocyte serum on animal experimentally infected with Histoplasma capsulatum or Cryptococcus neoformans. J. Bacteriol. 100; 127.
- 164.- Williams, M.D., Graybill, J.R., Drutz, D.J. (1978). Histoplasma capsulatum infection in nude mice. Infect. Immun. 21; 973.
- 165.- Williams, D.M., Graybill, J.R., Drutz, D.J. (1981). Adoptive transfer of immunity to Histoplasma capsulatum in atimyc nude mice. Sabouraudia 19; 39.
- 166.- Tewari, R.P., Sharma, D., Solotorowsky, M., Lafemina, R., Balint, J. (1977). Adoptive transfer on immunity from mice immunized with ribosomes of live yeast cells of Histoplasma capsulatum. Infect. Immun. 15: 789.
- 167.- Tewari, R.P., Sherma, D.K., Mathur, A. (1978). Significance of thymus derived lymphocytes in immunity elicited by immunization with ribosomes of live yeast cells of Histoplasma capsulatum. J. infect. Dis. 138; 605.
- 168.- Howard, D.H. and Otto, V. (1977). Experiments on lymphocyte mediated cellular immunity in murine histoplasmosis Infect. Immun. 16: 226.
- 169.- Howard, D.H. and Otto, V. (1971). Lymphocyte mediated cellular immunity in histoplasmosis. Infect. Immun. 4; 605.
- 170.- García, C.F., Hernández, R.A., Casasola, J., Reyes, M.R., Carvajal, S.R.E. Taylor, M.L. (1982). Variación de la respuesta celular en la histoplasmosis, por la administración pasiva de anticuerpos anti-Histoplasma capsulatum. 5° Congreso Nacional de Parasitología, Puebla, Pue. pp. 25.

- 171.- Artz, R.P. and Bullock, W.F. (1979). Immunoregulatory response in experimental disseminated histoplasmosis: depression of T-cell dependent and T-effector responses by activation of splenic suppressor cells. *Infect. and Immun.* 23: 3; 893.
- 172.- Watson, S.R., Miller, R.B., Redington, T.J., and Bullock, W.E. (1979). Immunoregulation in experimental disseminated histoplasmosis. Flow microfluorometry (FMF) studies of the Thy and Lyt phenotypes of T lymphocytes from infected mice. *J. Immunol.* 131: 948.
- 173.- Nickerson, D.H., Havens, R.A., and Bullock, W.E. (1981). Immunoregulation in disseminated histoplasmosis: characterization of splenic suppressor cell populations. *Cell. Immunol.* 60; 287.
- 174.- Watson, S.R., and Bullock, W.E. (1982). Immunoregulation in disseminated histoplasmosis: characterization of the surface phenotype of splenic suppressor T lymphocytes. *Infect. Immun.* 37; 940.
- 175.- Deepe, G.S., Jr., 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.
- 176.- Cunninham, D.S., and Khun, R.E. (1980). *Trypanosoma cruzi* induced suppressive substances. II Immunoregulatory activity. *Immunogenetics* 10; 557.
- 177.- 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.
- 178.- Stites, D.P. Fudenberg, H.H., Stobo, J.D., Wells, J.V. (1983). *Immunología básica Clínica*. Ed. El Manual Moderno.
- 179.- Hawkins, C., Armstrong, D. (1984). Fungal infections in the immunocompromised host. *Clin. Haematol.* 13:3; 599.
- 180.- Bonner, J.R., Alexander, W.J., Dismukes, W.E. App, W., Grijfin, F.M., Little, R., Shin, M.S. (1984). Disseminated histoplasmosis in patients with the acquired immune deficiency syndrome. *Arch. Intern. Med.* 144:11; 2178.
- 181.- Hughes, W.T. (1984). Hematogenous histoplasmosis in the immunocompromised child. *J. Pediatr.* 105:4; 569.

- 182.- Walsh, T.J., Calchatourians, R., Cohen, H. (1983). Disseminated histoplasmosis complicating bone marrow transplantation. *Am. J. Clin. Pathol.* 79: 4; 509.
- 183.- Griffith, F.M. Jr. (1980). Effectors of soluble immune complexes on Fc receptors and C3b receptor-mediated phagocytosis by macrophages. *J. Exp. Med.* 152; 905.
- 184.- Bullock, W.E., Artz, R.P., Bhatena, D., and Tung, K.S.K. (1979). Histoplasmosis associated with circulating immune complex, eosinophilic and mesangiopathic glomerulonephritis. *Arch. Intern. Med.* 139; 700.
- 185.- Yoshinoya, S., Cox, R.A. and Pope, R.M. (1980). Circulating immune complex in coccidioidomycosis. Detection and characterization. *J. Clin. Invest.* 66; 655.
- 186.- Ruiz, H.B., Carvajal, E.R. and Taylor, M.L. (1981). Immunosuppressive effect of histoplasmin in mice. Fourth National Congress of Immunology and International Symposium on Immunobiology of infections and Parasitic Disease. Oaxtepec, Mor. pp. 56.
- 187.- Ruiz, D.B.H., Carvajal, R.E. (1983). Efectos de activador policlonal detectados en productos de Histoplasma capsulatum. V. Congreso Nacional de Inmunología. Méx. D.F. pp. 62.
- 188.- Ratfneff, W.F., Pepple, J.M. and Winkelstein, J.A. (1980). Activation of the alternative complement pathway by Histoplasma capsulatum. *Infect. Immun.* 30; 147.
- 189.- Calchi, V.J., Kipnis, T.L., Mariane, M., Nieto, C.F., and Diaz de Silva, W.D. (1979). The activation of the complement system by Paracoccidioides brasiliensis in vitro: Its opsonic effect and significance for an in vivo model of infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 12; 21.
- 190.- Turner-Warwick, M. (1980). Inmunología del pulmón. El manual Moderno. Méx. D.F. p. 9.
- 191.- Kimberlin, C., A.R. Hariri, H.O. Hempel., and N.L. Goodman. (1981). Interactions between Histoplasma capsulatum and macrophages from normal and treated mice: comparison of the mycelial and yeast phases in alveolar and peritoneal macrophages. *Infect. and Immun.* 34;1: 6.

- 192.- De Sánchez, S.B., and Carbonell. (1975). Immunological studies on Histoplasma capsulatum. Infect. and Immun. 11:2; 387.
- 193.- Nielse, H.S. (1967). The dimorphism and infectivity of Histoplasma capsulatum. Mycopathologia et Mycologia Applicata. 31:1; 1.
- 194.- Howard, D.H. (1967). Effect of temperature on the intracellular growth of Histoplasma capsulatum. J. Bacteriol. 93: 1; 438.
- 195.- Howard, D.H. (1964). Intracellular behaviour of Histoplasma Capsulatum. J. Bacteriol 89; 518.
- 196.- Howard, D.H., Otto, V. (1977). Experiments on lymphocyte mediated cellular immunity in murine histoplasmosis. Infect. Immun. 16; 226.
- 197.- Howard, D.H. (1975). The role of phagocyte mechanisms in defense against Histoplasma capsulatum. In: Mycosis Scientific Publications. No. 304. Pan American Health Organization, Washington, D.C. p. 50.
- 198.- Cunningham, K.M., Bulmer., and E.R. Rhoades. (1979). Phagocytosis and intracellular fate of Sporothrix schenckii. J. Infec. Dis. 140:5; 815.
- 199.- Higler, A.E., and D.L. Danley. (1980). Alteration of polymorphonuclear leukocyte activity by viable Candida albicans. Infect. Immun. 27: 3; 714.
- 200.- Klebanoff, S.J. (1970). Myeloperoxidase: Contribution to the microbial activity of intact leukocytes. Science 169: 1095.
- 201.- Howard, D.H. (1977). Fungicidal systems derived from phagocytic cells. In: recent Advances in Medical and Veterinary Mycology. Ed. K. Iwata. University Park Press. P. 197.
- 202.- Howard, D.H. (1981). Comparative sensitivity of Histoplasma capsulatum conidiospores and blastospores to oxidative antifungal systems. Infec. and Immun. 32:1; 381.
- 203.- Sutcliffe, M.C., A.M. Savage. and R.H. Alford. (1980). Transferrin-dependent growth inhibition of yeast-phase Histoplasma capsulatum by human serum and lymph. J. Inf. Dis. 142:1; 209.
- 204.- Rathoff, W.D., J.M. Pepple and J.A. Winkelstein. (1980). Activation of alternative complement pathway by Histoplasma capsulatum. Infec and Immun. 31:1; 147.

- 205.- Howard, D.H. (1965). Intracellular growth of Histoplasma capsulatum. J. Bacteriol. 89; 518.
- 206.- Howard, D.H. (1973). Further studies on the inhibition of Histoplasma capsulatum within macrophages from immunized animals. Infect. Immun. 8; 577.
- 207.- Howard, D.L., Otto, V. and Gupta, R.K. (1971). Lymphocyte mediated cellular immunity in histoplasmosis. Infect. Immun. 4; 605.
- 208.- Dumont, A. and Robert, A. (1970). Electron microscopic study of phagocytosis of Histoplasma capsulatum by hamster peritoneal macrophages. Lab. Invest. 23; 278.
- 209.- Castro, A.M. (1985). La relación huésped-parásito a nivel celular en histoplasmosis. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas. Fac. de Med. U.N.A.M. Méx. D.F.
- 210.- Williams, R.C. Jr., Que, P.G. (1971). Opsonic activity of agammaglobulinemic human sera. J. Immunol. 106; 51.
- 211.- Salvin, S.B., (1960). Resistance of animals and man to histoplasmosis. In: Sweany HC, ed Histoplasmosis. Springfield, Illinois: Charles. B. Thomas. 99.
- 212.- Taylor, M.L. Bojalil, L.F. (1977). Inmunología de la histoplasmosis: Aislamiento de un complejo polisacárido-proteína con actividad inmunoespecífica a partir de H. capsulatum. Arch. Invest. Med. (Méx). 8; 91.
- 213.- Martín, R.T., Altman, C.L., and Alvares, F.O. (1983). The effects of severe protein-calorie malnutrition on antibacterial defense mechanisms in the rat lung. Am. Rev. Respir. Dis. 128: 1013.
- 214.- Goldring, O.L., Ciegg, J.A., Smithers, S.R., Terry, R.J. (1976). Acquisition of human blood group antigens by Schistosoma mansoni. Clin. Exp. Immunol. 26; 181.
- 215.- Willms, K., Arcos, L., Merchant, M.T., Sealey, M., Díaz de Leon, L. (1980). In: Molecules cells and products. In: Immunology. Acad. Press. 145.
- 216.- Allgorwer, M., Blach, H. (1949). The effect of tubercle bacilli on the migration of phagocytes in vitro. Amer. Rev. Tuberc. 59; 562.
- 217.- Elberg, S.S., Schneider, P. (1953). Directed leucocyte migration in response to infection and other stimuli. J. Infect. Dis. 93; 36.

- 218.- Densen, P., Mackeen, L., Clarck, R.A. (1979). Gonococci infection differ in stimulation of neutrophil chemotaxis (abstract 4) In: Procc. of the II th. International congress of chemotherapy. Am Soc. for Microbiology. Washington, D.C. p. 45
- 219.- Schultz, D.F., Miller, K.D. (1974). Elastase of Pseudomona aeruginosa: Inactivation of complement derived chemotactic and phagocytic factors. Infect. Immun. 10; 128.
- 220.- Leucona, M., Pacheco, G., Castro, E.M. and Kretschmer, R.R. (1983). Estudios in vivo del factor inhibidor de la quimiotaxis producido por E. histolytica. V. Contreso Nacional de Inmunología. p. 45.
- 221.- Wood, W.B. Jr. (1959). Studies on the pathogenicity of grup A streptococci II. The antiphagocytic effects of the M protein and the capsular gel. J. Exp. Med. 110; 617.
- 222.- Watt, G.P. (1970). The fate of Gonococci in polimorphonuclear leucocytes. L. Med. Microbiol. 31; 501.
- 223.- Senff, L.M., Sowyer, W.E., Hask, R.A. (1977). Effect of Gonococci on Nitroxide spin-labeled membranes of human blood cells. (abstract No. D 48). In abstracts of annual Meeting of American Society of Microbiol. Washington, D.C. 77.
- 224.- Nogueira, N., and Cohn, Z. (1976). Trypanosoma cruzi: Mechanisms of entry and intracellular fate in mammalian cells. J. Exp. Med. 143; 1402.
- 225.- Tenner-Racs, K., Racs, P., Myruic, Q.N., Fainter, L. (1972) Interaction of normal and activated alveolar macrophages of the rabbit with. Mycobacterium bovis (BCG) and Mycobacterium smegmatis in vitro and in vivo. (abstract 80). J. Reticuloendothelial. Soc. 22. (supl). 41 A.
- 226.- Armstrong, J.A., D'Arcy-Hart, P.C. (1971). Response of cultures macrophages to Mycobacterium tuberculosis with observations of fusion of lysosome with phagosomes. J. Exp. Med. 134; 713.
- 227.- Armstrong, J.A., D'Arcy-Hart, P., (1975). Phagosomes-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. J. Exp. Med. 142.; 1.

- 228.- Goren, M.B. D'Arcy-Hart, P., Young, MR., Armstrong, J.A. (1976). Prevention of phagosome-lisosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of Mycobacterium tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113; 2213.
- 229.- Oram, F. (1934). Pneumococcus leucocidin. J. Immunol. 26; 133.
- 230.- Sharman, W., Jacob, F., Porstendorfer, J. (1976). The cytotoxic action of leucocidin from Pseudomona aeruginosa. In human polymorphonuclear leukocytes. J. Gen. Microbiol. 93; 303.
- 231.- Young, LS., Armstrong, D. (1972). Human immunity to Pseudomona aeruginosa
 I. In vitro interaction of bacteria polymorphonuclear leukocytes, and serum factors. J. Infect. Dis. 126; 257.
- 232.- Smith, M.R., Wood, W.D., Jr. (1969). Heat-labile opsonins to pneumococcus. I. Participation of complement. J. Exp. Med. 130; 1209.
- 233.- Johnston, R.B.Jr., Klempner, M.R., Alper, C.A., Rosen, F.S. (1969). The enhancement of bacterial phagocytosis by serum. The role of complement components and two cofactors. J. Exp. Med. 129; 1275.
- 234.- Johnson, F.R., Agnello, V., Williams, R.C., Jr. (1972). Opsonic activity in human serum deficient in C2. J. Immunol. 109; 141.
- 235.- Smith, M.R., Shin, H.S., Wood, W.B. Jr. (1969). Natural immunity to bacterial infection the relations of complement to heat-labile opsonins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 63; 1151.
- 236.- Jeter, W.S., McKee, A.P., Mason, R.J. (1961). Inhibition of immune phagocytosis of Diplococcus pneumoniae by human neutrophil with antibody agains complement. J. Immunol. 86. 386-391.
- 237.- Von Behren, L.A., Caudhary, S., Khardori, N., Rabinovich, S., Shu, M.D. and Tewari, R.P. (1983). Effect of silica susceptibility of mice to experimental histoplasmosis. J. Reticuloendothelial Society. 34:99.
- 238.- Turner-Warwich, M. (1980). Mecanismos de defensa pulmonares. En: Inmunología del pulmón. Turner-Warwich, M. Ed. El Manual Moderno. p.p. 172.
- 239.- Van Loveren, H., Hilgers, J., De Bakker, J.M., De Weger, R.A., Brederoo, p. and Den Otrer, W. (1983). Macrophagelike cell lines: Endogenous peroxidatic activity, cell surface antigens. and colony-stimulating factor production. Journal Reticuloendothelial Society 33: 221.

- 240.- Douglas, D.S. (1982). Células que intervienen en las respuestas inmunitarias. *Inmunología Clínica*. H. Hugh Fudenberg 3a. ed. p. 110.
- 241.- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eison, H. N., Gineberg, H,S., Wood, W,B.(1976) Algunos hongos patógenos y enfermedades micóticas. En: *Tratado de microbiología*. Davis, B.D.-Dulbecco, R. Ed. Salvat cap. 36. p. 1000.
- 242.- Miller, G.L., Kazemi, M. (1983). Enfermedades micobacterianas y micóticas. En: *Manual Clínico de Neumología*. Ed. Mc. Graw Hill. cap. 10 p. 209.
- 243.- Miller, G,L., Kazemi, H. (1983). Enfermedades pulmonares en el paciente inmunocomprometido. En: *manual clínico de Neumología*. Ed. Mc. Graw Hill. cap. 9. p. 187.

EFFECTS OF HISTOPLASMA CAPSULATUM PRODUCTS ON THE
FUNCTIONAL ACTIVITY OF ALVEOLAR MACROPHAGES

ABSTRACT. The possibility that *Histoplasma capsulatum* may induce modifications in the functional activities of alveolar macrophages through products of either secretion or lysis was examined. Distinct amounts of histoplasmin (HP), the filtrate of cultures of *H. capsulatum*, were added to monolayer cultures of alveolar macrophages of Wistar rats and the effects of the filtrate on the viability, the ingestion rate, random migration, adhesive properties and microbial killing capacity of the macrophages were evaluated. This product did not produce clear cytotoxic or cytopathogenic effects at any dose tested. The endocytic rate was enhanced when HP (0.2 µg) was added to cultures (15×10^5 adhered cells). This effect was due to the recruitment of non-phagocytosing cells to the endocytic activity. Alveolar macrophages that had remained non-adherent after 3 h of incubation adhered to glass slides after HP was added to the medium. Dose-dependent inhibition of random migration of macrophages was produced with addition of HP. However, the microbial killing capacity was not modified significantly at any dose of the *H. capsulatum* product. The possible role of these effects as a part of a mechanism of evasion of non-immune defenses of the host in the early stages of respiratory infection produced by this fungus is discussed.

Key words: Alveolar macrophages - *H. capsulatum* - Histoplasmosis - histoplasmin-pulmonar macrophages.

INTRODUCTION.

The first step in the pulmonary infection caused by the intracellular fungus *Histoplasma capsulatum*, after the spores have been inhaled and have reached the alveoli, is their encounter with alveolar macrophages (27). These host cells are able to take in, digest and carry away all phagocytosable particles that have made contact with the alveolar wall (25). If the inhaled particle is toxicogenic in nature, any consequent damage to the alveolar architecture and cells may lead to the penetration and the installation of such a particle in the lung interstitium, thus inducing inflammation (13). In the case of non-toxicogenic microorganisms, the mechanism responsible for these initial steps of the infection (colonization, penetration, and installation) have not been clearly explained, since alveolar macrophages should be capable of eliminating all these microbial agents. Even when these organisms are capable of survival within the macrophages, normal mechanical clearance capacity of the alveolar macrophages should with intact host defences be able to remove all invading organisms, so that these parasitic cells can not penetrate and install themselves in the host (8,9).

Histoplasma capsulatum is a non-toxicogenic intracellular fungus (19), (20) that produces and secretes various substances which seem to have been studied only as antigens or immunogens (20, 23). It is reasonable to think that some of these products play a role in the biology of the host-parasite relationship. The interaction between the alveolar macrophages and the fungus is a crucial step in determining whether the fungus will be eliminated or will penetrate, thus starting an infectious process, regardless of the subsequent production of mycotic disease or only active immunization.

In this study, the ability of some products of the fungus to modify alveolar macrophages function, as a mean to evade the host defence, was examined. Products obtained from the culture filtrate of *H. capsulatum* were studied to test if these products were able to modify some functional activities of rat alveolar macrophages *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats weighing 150 to 180 g were obtained from our animal colony and were maintained on Purina pellets and water *ad libitum*.

H. capsulatum products

The culture filtrate of the mycelial phase of *H. capsulatum*, strain 5028, grown in a chemically defined medium (21), was kindly supplied by Dr. Lucia Taylor from the Department of Human Ecology, National University of Mexico. This product, named histoplasmin (HP), was prepared as described elsewhere (21) and was dialyzed extensively against phosphate-buffered salined (PBS), sterilized by membrane filtration (Millipore Co., Bedford MASS), diluted in Hank's balanced salt solution (HBSS) and stored at 4°C until used. The protein content of HP was determined by the method of Lowry *et al.* (14).

Since the culture medium contained only low molecular weight substance [salts, sugars and asparagine (21)] which were eliminated by dialysis, HBSS was used in control samples.

Cells and culture conditions

Alveolar macrophages were obtained by bronchoalveolar lavage with PBS containing 0.02% ethylenediaminetetraacetate (EDTA) according to the technique described by Stuart *et al.* (22). The cells were washed three times by centrifugation at 300 x g in PBS and were then resuspended in culture medium (RPMI 1640 medium, supplemented with fetal calf serum, and penicillin, 100 units/ml;

all from GIBCO Laboratories, Grand Island, New York). The cells were incubated (37°C ; humidified 5% CO₂-air) in flat-bottom glass tubes each containing a circular glass coverslip to allow the cells to adhere. The number of adhered cells varied in each experiment (5 to 6 x 10⁵); 500 µl of culture medium was used per tube. After 3 h in culture, non-adherent cells were removed by washing the monolayer with culture medium. The remaining adherent cells were cultured in the conditions required for each study in the presence of different amount of HP at a final volume of 25 µl per tube. Cell viability was determined by trypan blue dye exclusion. The percentage of recovered cells after culturing with HP was calculated as the difference between the number of cells attached to the slide before and after incubation.

Macrophage function studies

The endocytic capacity of alveolar macrophages was studied by adding to the macrophage monolayer 50 µl of a suspension of live yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* (Z-37, Cooper Linsler Ltd. México) in HBSS at a yeast-macrophage proportion of 10:1. After the cultures were incubated for 1 h, the slides were washed with HBSS to eliminate the non-ingested yeasts, and were then stained with Giemsa Dye for microscopic observation. At least 300 macrophages were counted in each determination. The ingestion rate was evaluated by determining the number of yeast cells engulfed by each of 100 macrophages (phagocytic index), the percentage of macrophages which contains engulfed yeast cells, and the number (mean) of yeasts engulfed by each macrophage.

The adherence capacity was evaluated by determining the percentage of alveolar macrophages that remained attached to the glass slides after 1 h of incubation under culture conditions. This percentage was determined by counting the macrophages which were in the supernatant after incubation. These cells were counted by microscopic observation in hemocytometer

after first fixing the cells with 5% glutaraldehyde (Eastman Kodak N.Y.) and then staining them with crystal violet dye. Contaminating cells (lymphocytes, polymorphonuclear cells and erythrocytes) were excluded from counting by morphological criteria. The difference between the total number of plated macrophages minus the non-adherent ones allowed us to estimate the percentage of adhesion. In some experiments, the incubation was performed in the presence of EDTA at varied concentrations.

The random migration capacity of alveolar macrophages was assayed by using the microdroplet technique (1), which is used for determining migration inhibitory factors, with some modifications. In brief, adherent macrophages were detached from large plastic Petri dishes (Falcon Plastics, Oxnard, CA) with a rubber policeman and concentrated by centrifugation at $300 \times g$. Five μ l of the pellet were resuspended in 5 μ l of 1% agarose which was prepared by mixing, when both solutions were at 40°C, equal volumes of 2% agarose (Sigma. Chemical Co., St. Louis, MO) which had been dissolved in boiling distilled water and culture medium (2x). One μ l of this suspension was placed on the bottom of the wells of culture plates (Falcon), allowed to settle, and then 100 μ l of culture medium was added to each well. The plates were incubated for 15 h under culture conditions. After this time, the supernatant of each well was carefully removed and the remaining adherent material was stained with Giemsa dye. The cells that migrated from the gel droplet to the wall of the well in four directions were counted. This value was compared with the controls in which HP had not been added to the medium. The distance of migration was not used as parameter because the front did not vary with respect to the control.

For the microbial killing test, alveolar macrophages which had been cultured in flat bottom tubes in the presence or absence of HP for 1 h (without penicillin) were washed and added to 50 μ l of a suspension of 1×10^7 viable *Staphylococcus aureus* (strain 502 a) in HBSS. The mixture was incubated for 15 min and then washed thoroughly to remove non-ingested

bacteria. Thereafter, the monolayer was re-incubated for either 5, 30 or 60 min. After each period of incubations the phagocytic cells were killed by sudden temperature change (37 to -70°C) (26) and aliquotes of the whole lysate were seeded onto nutritive agar plates. The number of bacterial colonies were counted after incubation (37°C; 24 h). The results were expressed as the percentage of colonies counted at each time with respect to the number of colonies at time 0 (100%).

Statistical analysis

Differences in viability and in the endocytic capacity between control and experimental values were determined by the Student *t* test for independent samples (15). A *p* value of 0.01 or less were considered significant.

RESULTS

The possibility that, in the culture filtrate of *H. equitatum*, there may exist some cytotoxic or cytopathogenic products was examined by measuring the viability of macrophages (5×10^6 adhered cells per tube) cultured in the presence of HP. Figure 1 shows that at high concentrations of HP the viability decrease with the time as much as 25% with respect to control values. These values differed significantly only at 2 µg at 48 h. In addition, the percentage of cells that remained attached to the glass slide after 48 h incubation with the different amounts of HP was greater than 95% in all the cases. Therefore, cell destruction or detachment did not appear to be an effect of this substance.

Since after 12 h, the percentage of viable cells appeared to remain stable at every dose, at least until 40 h, a clear toxic effect could not be established. Nevertheless, the experiments measuring the functional activity were carried out in the presence of different concentrations of HP to test for a dose dependent response in each case. By microscopic

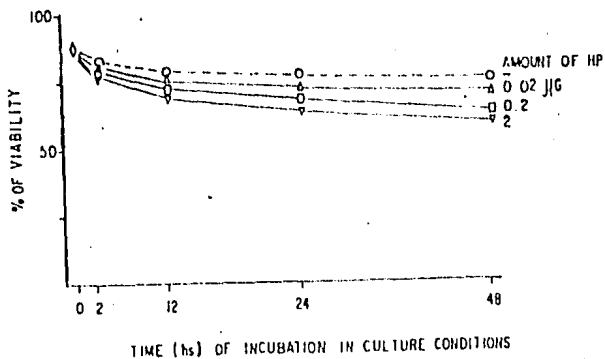


Fig. 1.

Effect of HP on the viability of rat alveolar macrophages during two days in culture. The amount of HP added to each culture (5×10^5 cells) was 0.02 μg (Δ), 0.2 μg (\square), 2 μg (∇), or none (\circ). The cell viability was determined by the trypan blue dye exclusion. Each point represents the mean of triplicate cultures of a representative experiment.

observation, cytopathic changes were not found at any dose.

The effect of HP on the adherence property of alveolar macrophages was examined by determining the percentage of macrophages in the suspension that had adhered to glass slides in the presence of different amounts of this substance after 3 h of culture. Figure 2 shows that an increase adherence was obtained. In the control, $39.5 \pm 2.7\%$ (S.E.M.) of the plated macrophages remained non-attached. This adherent promotor effect lead to almost all the non-adherent macrophages becoming attached. At 2 μg of HP per culture, a small decrease in this effect was observed. In order to obtain information about the nature of the molecules involved in this increased adhesiveness, the role of divalent cations was examined. Therefore the cultures were incubated in the presence of EDTA and HP at different concentrations. Figure 3 shows that the chelating agent inhibited adherence. This inhibition was dose-dependent and affected even the adherence which had been enhanced by HP.

The random migration capacity was drastically diminished in the presence of HP (Fig. 4). This decrease correlated with the amount of HP added to the cultures.

Figure 5 shows the modifications in the ingestion rate of alveolar macrophages in the presence of different concentrations of HP in the culture. An enhancement of this activity, maximal at 0.2 μg per culture (5.6×10^5 adhered cells), was found; at higher concentrations of HP, smaller increments were observed. This enhancement in the phagocytic index (Fig. 5a) was due to the increment in the percentage of engulfing cells (53% in controls; Figure 5b) rather than to an augmentation in the endocytic capacity of the ingesting cells. The number of yeast cells taken in by each phagocytosing alveolar macrophage increased slightly and non-significantly at 0.2 μg of HP per culture (Fig. 5c).

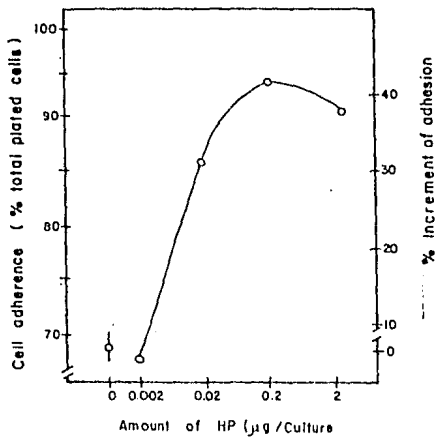


Fig. 2.

Effect of HP on the adherence of alveolar macrophages to glass under culture conditions. The percentages of recruited macrophages which adhered in addition to those which adhered in controls are shown. Each point represents the mean of three different experiments, each carried out in triplicate.

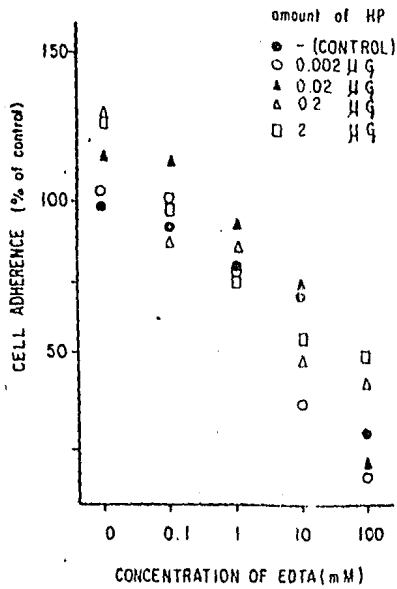


Fig. 3. Adherence of alveolar macrophages to glass in the presence of different concentrations of HP and EDTA in culture. Each point represents the mean of triplicate cultures of a representative experiment.

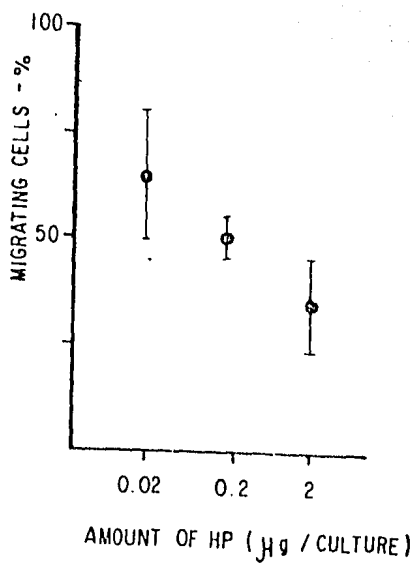


Fig. 4. Migration capacity of alveolar macrophages in the presence of HP in culture. The mean \pm SD of the percentage of cells that migrated from the cell containing gel droplet, relative to the control cultures without HP, are shown.

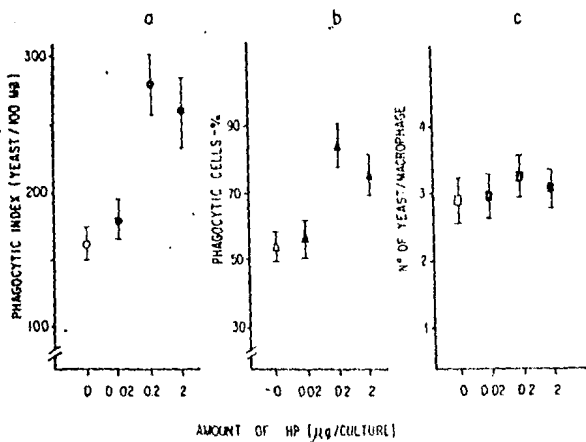


Fig. 5.

Effects of different amounts of HP on the endocytic capacity of alveolar macrophages in culture: a) The number of yeast cells engulfed by 100 macrophages; b) the percentage of macrophages that contain engulfed yeasts; and c) the number of yeasts contained in each phagocytosing macrophage.

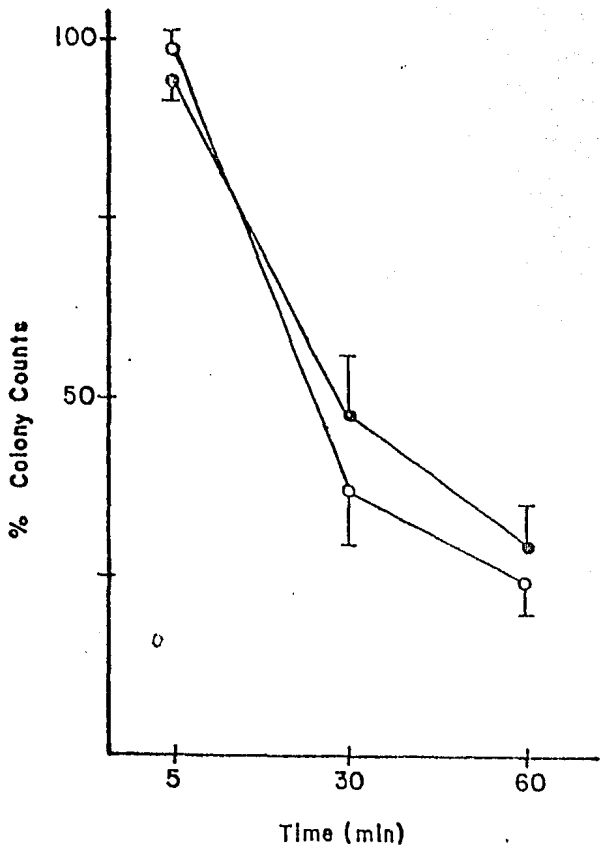


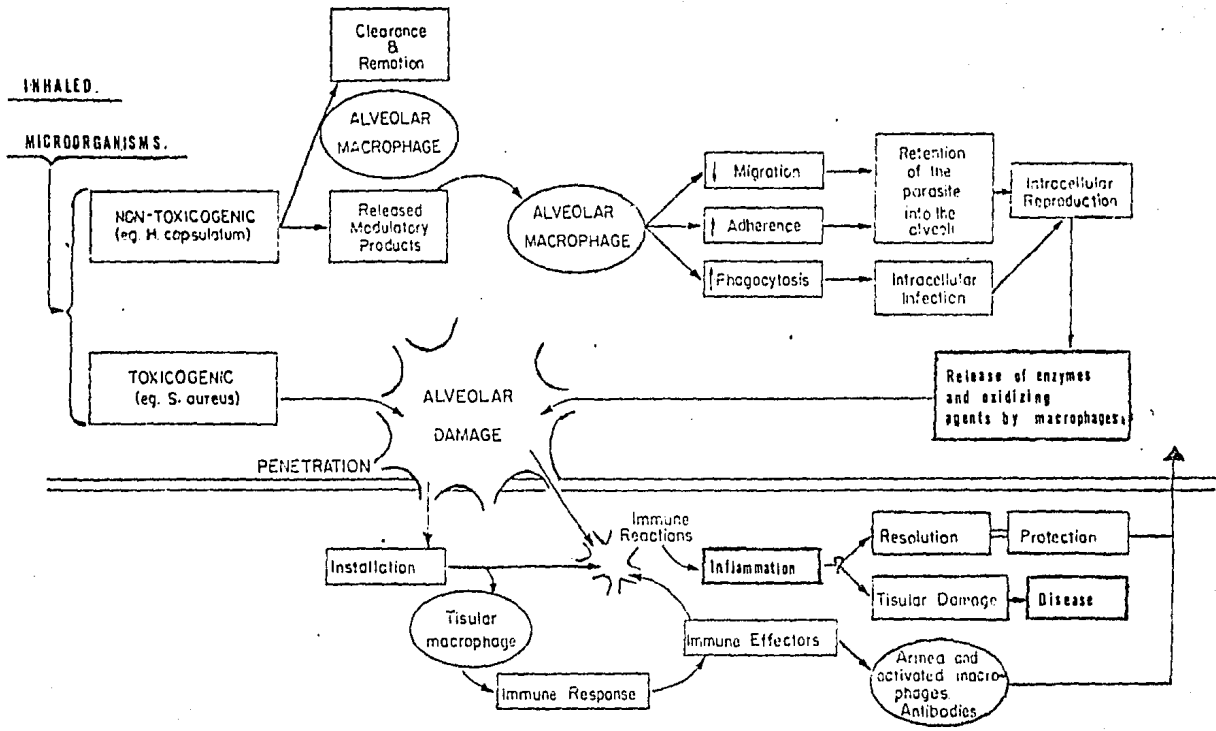
Fig. 6
 Measurement of the bacterial killing capacity of alveolar macrophages in the presence (-O-) or absence (-O-) of 0.2 µg HP/culture. HP was added to the culture and incubated by 1 h; thereafter the cells were washed and *S. aureus* were added. At different times there were determined the bacterial viability by counting the colonies recovered from the cultures after the macrophages were killed.

The bacterial killing capacity in the presence of HP, determined *in vitro*, did not show significant difference with respect to the control without HP, regardless of length of incubation (Fig. 6). The results expressed as percentage of reduction with respect to the time 0, eliminated the variations expected in the increase in the phagocytic index, when the cells were stimulated by HP.

DISCUSSION

In the absence of a defined toxicogenic action, a possible mechanism by which *H. capsulatum* penetrates into and installs itself in the lung interstitium is that this microorganism may produce a biologically active substance(s) that may give an advantage to the parasite over its cellular host. In order to explore this possibility, we tested the effect of histoplasmin on the functional activity of alveolar macrophages. Since spores are the infective particles and are formed directly from the mycelium, we used histoplasmin produced by the mycelial form. We felt that this product was a good candidate since an individual infected with *H. capsulatum* produces antibodies that react with components of HP (20,23), showing that molecules are being produced and released by this fungus during the host parasite interaction *in vivo*.

Results showed that in the products of secretion and lysis obtained from cultures of this fungus there exist(s) a substance(s) that was (were) able to modify the functional activity of alveolar macrophages *in vitro*. A clear deleterious (cytotoxic or cytopathic) effect by HP on macrophages could not be established. Therefore, the lack of toxicogenicity as reported elsewhere (19) appears to be confirmed. However, the slight decrease in viability of cells in correlation with the amount of HP added to the culture remains to be explained. One possibility is that some products of autolysis of histoplasma may have a certain toxicity on the cells studied. This last possibility was suggested by the degenerative changes found when mononuclear cells are cultured within living *H. capsulatum* cells (2) or by



the damage detected in macrophages after phagocytosis of this fungus (6). Nevertheless, in this study, the functions were measured in relation to the dose of HP used. Therefore, this toxic effect may explain the diminution of certain activities at 2 µg/culture of HP.

The adherence promotion effect on cells which in control culture remained unattached indicated that this product was able to provoke non-inhibitory changes. As shown in figure 2, this effect appeared to be directly related to the dose of HP up to 0.02 µg; at higher doses, this promoter effect clearly decreased. This fact may be related with the slight decrease in cell viability detected at this dose, thereby indicating the existence of a certain cytotoxic effect. Since this effect could be reversed by EDTA it appeared that HP induces the production (or expression) and the activity of the surface molecules which are responsible for the adhesive properties of macrophages and use divalent cations as cofactors (3).

The diminution in the random migration capacity, even at non-toxic doses, could be associated with the increased adhesiveness of alveolar macrophages. The nature of the inhibition of the macrophage mobility appeared to be different from that of lymphokines, such as the macrophage migration inhibitory factor (MIF), because the distance of migration was not modified. In this study, the number of cells that succeeded in exiting from the gel droplet were reduced.

The induction to endocytic activity in the population of cells that under normal conditions are non-phagocytosing (at least in the first hour of culture) also differed from the effect exerted by other factors (such as lymphokines) which activates the metabolic capacity of macrophages such that a higher number of particles are endocytosed by each cell. Therefore, in the case reported here, a recruitment of alveolar macrophages to the endocytic activity appeared to be the final effect.

H. capsulatum cells were not used as the target cells for evaluation

of the endocytic and the bacterial killing capacity in these experiments, because we think it is possible that whole *H. capsulatum* may contain additional component which may further modify the parameters that were being measured in the work. In this regard, results from experiments in which the whole fungus was used, indicated that the intracellular infection *in vitro* provoked other additional modifications in the activity of the macrophage (Castro A.M. and Carvajal R.E., manuscript in preparation).

Whether these effects occur *in vivo* by release of the products either in the attack or during the infection is a central and very interesting question at present. Although it is difficult to know if the concentrations (0.02 - 2 µg/culture; 0.1 - 10 pg/cell) used in this *in vitro* model correspond to that present in each macrophage during the intracellular infection, it is possible that these effects may be relevant to pathogenesis when the dose of the infecting agent is sufficient and their products raised to the adequate levels. This is consistent with the fact that there is a linear correlation between the effects and the amount of the products. Likewise, this idea is in line with the relationship between the infective dose and the development of either a pathogenic process or an active natural immunization only. Therefore, the modifications found here could be interpreted as the mechanisms by which the fungus evades the first step of the host defense. The enhanced adhesion and the inhibition of the mobility might impair migration of the macrophages from the alveoli. The enhanced endocytic activity may be the factor that promotes an increase in ingestion of the fungus which in turn, promotes intracellular infection. In addition, it has been reported that normal macrophages cannot kill histoplasma cells (10,11); if it is true, an intracellular proliferation and thereafter colonization of the alveoli may be expected as a consequence of the intracellular infection. All these effects could facilitate penetration by retention of infected macrophages in the alveoli, which are known to release toxic oxidizing products and hydrolytic enzymes, thereby producing destruction of the alveolar wall and the initiation of the pneumonic infection (4). In fig. 6 we propose a model of macrophage modulation by microbial products leading to penetration of microorganisms to lung interstitium

across the alveolar barrier. These events remain to be established by experimental models *in vivo*.

Similar effects have been found for human blood monocytes in the presence of mycobacterial products (7,12). These effects on adherent cells have been associated with immunosuppressive phenomena. In the case reported here, this association is worthy of examination, considering both the adherent cell-mediated immunosuppressive phenomena that occurred during histoplasmosis (5,16,24) and after administration of HP in experimental animals (18) and that suppressive effects have been assigned to alveolar macrophages (17).

ACKNOWLEDGEMENTS

The writers thank Veronica Yakoleff for the revision of the manuscript, Leticia Romero for technical assistance, Rafael García for the generous supply of *S. aureus*, and Ma. Guadalupe Nava and Rosa Tamayo for their secretarial skills.

REFERENCES

1. Adelman H, Hasson M, Nalida M, Cohen M. Correlation between agarose microdroplet and capillary tube procedures as assays for migration inhibition of target cells. *J Immunol Meth* 1980. 34: 235-242.
2. Alford R H, Cartwright B B. Human lymphocyte blastogenesis induced by living and dead *H. capsulatum* yeast and soluble yeast autolysate. *Saboraudia* 1981. 19: 185-195.
3. Cohen A B, Cline M J. The human alveolar macrophages: isolation, cultivation *in vitro* and studies of morphological and functional characteristics. *J Clin Invest* 1971. 50: 1390-1398.
4. Cohen A B. Potential adverse effects of lung macrophages and neutrophils. *Fed Prod* 1979. 38: 2644-2677.
5. Deepe G S, Kravitz G R, Bullock W E. Pharmacological modulation of suppressor cell activity in mice with disseminated histoplasmosis. *Infect Immun* 1983. 41: 114-120.
6. Edwards G A, Edward R R, Hazen E L. Electron microscopic study of *Histoplasma* in mouse spleen. *J Bacteriol* 1959. 177: 429-438
7. Ellner J J, Spagnuolo P J, Schachter B. Augmentation of selective monocyte function in tuberculosis. *J Infect Dis* 1981. 144: 391-398.
8. Goldstein E, Lipfert W, Warshauer D. Pulmonary alveolar macrophage. Defender against bacterial infection of the lung. *J Clin Invest* 1974. 54: 519-528.
9. Hirsch J G. The phagocyte defense system. In: Smith H, Peace SH, eds, *Microbiopathogenicity in man and animals*. Cambridge: Cambridge University Press 1972. 59-70.

10. Howard D H. The role of phagocytic mechanism in defense against *Histoplasma capsulatum*. In: Mycosis Scientific Publications. Washington DC: Pan American Health Organization 1975. 304: 50-59.
11. Kimberline C L, Hariri AR R, Hampel H O, Coordman N L. Interaction between *Histoplasma capsulatum* and macrophages from normal and treated mice: comparison of the mycelial and yeast phases in alveolar and peritoneal macrophages. Infect Immun 1981. 34: 6-10.
12. Kleinhenz M E, Ellner J J, Spagnuolo P J, Daniel T M. Suppression of lymphocyte response by tuberculous plasma and mycobacterial arabinogalactan. Monocyte and indomethacin reversibility. J Clin Invest 1981. 68: 153-162.
13. Lipscomb M F, Onofrio J M, Nash E F, Pierce, A K, Toews G B. A morphologic study of the role of phagocytes in the clearance of *Staphylococcus aureus* from the lung. J Reticuloendoth Soc 1983. 33: 429-442.
14. Lowry O H, Rosebrough J J, Farr A L, Randell R J. Protein Measurement with the folin method serial reagent. J Biol Chem 1951. 193: 265-275.
15. Lutz W. Statistical methods as applied to immunological data. In: Weir DM, ed, Handbook of experimental immunology. Vol. III. Oxford: Blackwell Scientific Publishers 1978. A2.1-A2.29.
16. Nickerson D A, Havens R A, Bullock W E. Immunoregulation in disseminated histoplasmosis: characterization of splenic suppressor cell population. Cell Immunol 1981. 60: 287-297.
17. Pennline K J, Conrad R E, Gerber H R, Hersocwitz H B. Suppressive effect of alveolar macrophages on the *in vitro* immune response of rabbit lymphocytes. J Reticuloendoth Soc 1979. 26: 495-502.

18. Ruiz B H, Carvajal R E. Polyclonal activation properties and mitogenic effects of *Histoplasma capsulatum* products. *Mycopathologia* 1985. In press.
19. Salvin S B. Resistance of animals and man to histoplasmosis. In: Sweany HC, ed *Histoplasmosis*. Springfield, Illinois: Charles B Thomas, 1960: 99-112.
20. Schuvert J H, Lynch H H, Ajello L. Evaluation of agar-plate precipitating test for Histoplasmosis. *Am Rev Respir Dis* 1961 84: 845-849.
21. Smith C E, Whiting E C, E E, Rosenberg HG, Beard R R, Saite M T. The use of coccidioidin. *Amer Rev Tuberc* 1948. 57: 330-335.
22. Stuart A E, Habeshaw H A, Dawson A E. Phagocytes *in vitro*. In: Weir D M, ed, *Handbook of experimental immunology*. Vol. II. Oxford: Blackwell Scientific Publications 1978. 31.1-31.30.
23. Sweet G M, Cimprich R S, Cook A C, Sweet D E. Antibodies in histoplasma in mouse spleen. *J Bacterial* 1959; 177: 429-438.
24. Tewari R P, Khardory N, McConnachie L A, von Behren L A, Yamada T. Blastogenic response of lymphocytes from mice immunized by sublethal infection with yeast cells of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 1982. 36: 1013-1018.
25. Turner-Warwick M. Defense mechanism of the lung. In: *Immunology of the lung*. (Current topics in Immunology series). Chicago, Illinois: Year Book Medical Publishers Inc 1979. 118-147.
26. Van Furth R, Van Zwet T L, Leijh P C J. *In vitro* determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In: Weir D M, ed. *Handbook of experimental immunology*. Vol II. Oxford: Blackwell Scientific Publishers 1978. 32.1-32.19.

27. Youmans G P. Histoplasmosis, Blastomycosis, Coccidioidomycosis. In:
Youmans G P, Paterson P Y, Sommer H P, eds, The Biologic and clinical
basiss of infectious diseases. Philadelphia: WB Saunders, 1980. 404-426.

DISCUSION Y PERSPECTIVAS

El análisis de la información revisada permite hacer una sistematización conceptual de la dinámica de la relación huésped-parásito en los periodos iniciales de la infección por Histoplasma capsulatum. De esta manera, se pudo disociar el estudio de los componentes de dicho proceso, considerando que éste es el producto de la interacción de por lo menos tres elementos: el agresor, H. capsulatum; el sitio de penetración, el alveolo; y la célula blanco, el macrófago.

Lo anterior conduce a considerar que las características anatómo-fisiológicas del alveolo brindan un microambiente peculiar a los protagonistas del choque (H. capsulatum vs. macrófago). La elevada presión parcial de O_2 , la ausencia de nutrientes propios de los espacios tisulares, el sustrato de adhesión de los macrófagos y el hecho mismo de que esta célula se encuentra fuera del medio interno hacen que dicha interacción posea características especialmente interesantes y dignas de estudio. Si se considera que la consecuencia natural de esta interacción es la eliminación del agente infectante, la inducción de la respuesta inmunológica y/o la infección no deberían llevarse a cabo, dadas las características antes mencionadas. Sin embargo estos dos últimos fenómenos sobrevienen a la llegada de las esporas de H. capsulatum, a pesar de la capacidad microbicida y de arrastre del macrófago. Lo anterior lleva a pensar que la penetración microbiana es un paso crucial en la determinación de los eventos subsiguientes. Este proceso es, además, doblemente relevante si se toma en cuenta que tal microorganismo, de manera similar a otros que carecen de actividad toxicogénica, no tiene mecanismos activos para llevarlo a cabo. Por tanto, elucidar la penetración microbiana por vía alveolar en una infección como ésta, es de esperar que permita entender aspectos fundamentales de la relación huésped-parásito.

Parece razonable pensar que al liberar este microorganismo productos en su microambiente, éstos tengan alguna función biológica en favor del parásito y no sean solamente moléculas que lo identifiquen ante los estudiosos de la inmunología. Una manera de abordar el estudio de la participación de estos productos en el proceso de penetración está dada por la observación de sus efectos sobre las células defensivas alveolares. Los re-

sultados de tal estudio muestran que H. capsulatum es capaz de modular la capacidad funcional de los macrófagos alveolares in vitro a través de materiales liberados. Esto sugiere que este microorganismo, sin tener una actividad toxicogénica definida es capaz de promover su penetración a los tejidos a través de la infección del macrófago y de la inmovilización y retención de éste en el sitio de penetración. Esto conduciría, a la larga, a la lisis y a la disrupción de la arquitectura alveolar por parte del macrófago. De esta forma, el microorganismo se instalaría en el medio ambiente interno y el desencadenamiento de la inmunización o de la infección solo dependería de la dosis o carga microbiana y de la capacidad inmunológica del huésped.

Existen otras infecciones que comparten ciertas características con la histoplasmosis, esto es: la naturaleza intracelular del parásito, su falta de actividad toxicogénica la utilización de la misma vía de penetración, la capacidad de inducción de lesiones del tipo granulomatoso, la presencia en el microbio de una pared resistente a la lisis por complemento, el hecho de que solo la inmunidad celular es la responsable de la defensa y que la humoral no tiene participación sino que, por el contrario, parece ser promotora de la supervivencia del agresor, etc. Entre estas infecciones se pueden citar a las causadas por Cryptococcus neoformans (241) Mycobacterium tuberculosis (242) y otros (243). Todo esto permite asumir que el mecanismo de penetración propuesto en este trabajo pudiera también participar en las infecciones citadas. Por tanto, parece importante acumular más evidencias sobre esta posibilidad. Entre las estrategias más pertinentes parece estar los estudios in vivo, tanto por vía inhalatoria como por vía parenteral, siguiendo a esto el estudio sistémico y regional de las funciones de los macrófagos.

De la misma manera, se deberán confirmar las conclusiones de este trabajo mediante experimentos in vivo que incluyan la inoculación de H. capsulatum y/o sus productos seguida de la medición de la actividad del Sistema Fagocítico Mononuclear. Finalmente se proseguiría con el aislamiento de la molécula o moléculas responsables de tales efectos.