



11281
19
①

**"RESPUESTA INMUNE EN LA
HISTOPLASMOSIS: POSIBLES MODELOS
DE REGULACION"**

T E S I S

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias Biomédicas
(Inmunología)**

QUE PRESENTA

M. EN C. MARIA LUCIA TAYLOR

División de Estudios Superiores. Coordinación de Maestrías y Doctorados
Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina U.N.A.M.

México, D. F.

1986

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL.

	Pág.
1.- Resumen.	1
2.- Características generales de la histoplasmosis.	1
3.- Características clínicas de la histoplasmosis.	3
4.- Respuesta celular en la histoplasmosis.	4
4.1. Respuesta celular en humanos.	5
i.- Observaciones clínicas.	5
ii.- Observaciones <u>in vitro</u> e <u>in vivo</u> .	5
4.2. Respuesta celular en modelos animales.	7
5.- Actividad de los macrófagos.	8
6.- Respuesta humoral.	16
7.- Mecanismos de regulación.	19
7.1. Fenómeno de supresión.	19
7.2. Supresión en la infección histoplasmosa.	21
7.3. Participación de las células supresoras.	26
7.4. Participación de anticuerpos.	28
8.- Relación entre el mecanismo de regulación de la respuesta inmune y la patogenia de la histoplasmosis.	30
8.1. Posibles modelos de regulación de la respuesta inmune en la histoplasmosis.	31
9.- Comentarios.	39
10.- Summary.	40
11.- Bibliografía.	41

INDICE DE FIGURAS.

	Pág.
Fig. 1. Fase micelial de <u>Histoplasma capsulatum</u>	55
Fig. 2. Fase levaduriforme de <u>H. capsulatum</u>	56
Fig. 3. Radiografía de una histoplasmosis pulmonar crónica grave	57
Fig. 4. Macrófago parasitado con levaduras de <u>Histoplasma capsulatum</u>	58
Fig. 5. Microfotografía electrónica de macrófagos peritoneales de ratón a los 5 minutos de una infección continua con <u>Histoplasma</u>	59
Fig. 6. Microfotografía electrónica de macrófagos peritoneales de ratón a las 24 hrs de una infección continua con <u>Histoplasma</u>	60
Fig. 7. Secuencia fotográfica de la fagocitosis de <u>Mycobacterium tuberculosis</u> y de levaduras de <u>Histoplasma</u> marcados con isotiocianato de fluoresceína	61
Fig. 8. Número de macrófagos con fusión fagosoma-lisosoma (FFL) según la dosis y el tiempo de infección	62
Fig. 9. Frecuencia de fusión fagosoma-lisosoma (FFL) en macrófagos fagocitando levaduras vivas o muertas	63
Fig. 10. Frecuencia de fusión fagosoma-lisosoma (FFL) en macrófagos infectados con cepas de <u>Histoplasma</u> con distintos grados de virulencia	64

	Pág.
Fig. 11. Movilización de proteínas de membrana de macrófagos por la infección <u>in vitro</u> con <u>Histoplasma capsulatum</u>	65
Fig. 12. Distribución gráfica de la DL ₅₀ con cepas de <u>Histoplasma capsulatum</u> en ratones BALB/c.....	66
Fig. 13. Efecto de la transferencia pasiva de anticuerpos anti- <u>Histoplasma</u> en la resistencia a la infección histoplasmosa...	67
Fig. 14. Efecto de la transferencia pasiva de anticuerpos en la hipersensibilidad tardía de ratones infectados con <u>Histoplasma capsulatum</u>	68
Fig. 15. Modelo teórico de la acción de los anticuerpos sobre la respuesta celular en la histoplasmosis. Parte (A).....	69
Fig. 16. Modelo teórico de la acción de los anticuerpos sobre la respuesta celular en la histoplasmosis. Parte (B).....	70

INDICE DE TABLAS.

Pág.

Tabla 1. Estudio comparativo de la actividad de antígenos crudos y purificados de <u>Histoplasma</u> en la reacción de fijación del complemento frente a sueros de pacientes con histoplasmosis y coccidioidomicosis.....	71
Tabla 2. Comparación de la actividad de antígenos crudos y purificados de <u>Histoplasma</u> y <u>Blastomyces</u> por la prueba de hemaglutinación....	72
Tabla 3. Comparación de la actividad de antígenos crudos y purificados de <u>Histoplasma</u> y <u>Blastomyces</u> por la prueba de fijación del complemento.....	73
Tabla 4. Cambios en la resistencia a la infección histoplasmosa por la transferencia pasiva de células de bazo de ratones menores de 1 mes	74
Tabla 5. Cambios en la resistencia a la infección histoplasmosa por la transferencia pasiva de células adherentes y no adherentes de bazo de ratones menores de 1 mes.....	75
Tabla 6. Posible acción reguladora dependiente de la concentración de anticuerpos y su interacción con el hongo <u>H. capsulatum</u> !.....	76

1. RESUMEN .

La histoplasmosis, al presentar la característica de parasitosis intracelular preferencial del sistema fagocítico mononuclear, origina lesiones granulomatosas típicas y constituye un buen modelo para el estudio del mecanismo inmune mediado por células.

En este trabajo se revisa el papel de la respuesta inmune en la histoplasmosis a través de la interacción linfocitos T-macrófagos, tanto en el humano como en modelos animales. Se establecen las bases actuales del conocimiento de la respuesta humoral y los posibles mecanismos de regulación inmune en esta enfermedad. Por último, se plantea un modelo teórico de regulación de la respuesta celular mediada por anticuerpos y se reafirma además, la relación entre inmunidad y patogenia en este proceso infeccioso.

2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA HISTOPLASMOSIS.

Dentro de las infecciones por hongos, las sistémicas son las más graves y de difícil diagnóstico. Frecuentemente llegan a producir la muerte de los pacientes ya que los medicamentos que se emplean no siempre tienen la efectividad deseada además de que, en ocasiones, la terapéutica es tardía pues se instala cuando el padecimiento ya se encuentra muy diseminado.

La histoplasmosis es la micosis sistémica más importante en el mundo y la de mayor trascendencia en el Continente Americano y en México. Una de sus fases es la histoplasmosis pulmonar primaria que constituye un serio problema de Salud Pública, tanto por la elevada frecuencia de los brotes

epidémicos como por la gravedad del cuadro clínico. Esta micosis puede ser considerada como ocupacional ya que afecta a diferentes trabajadores, entre ellos a los mineros, que se exponen al agente etiológico al penetrar en viejas minas. Algunas de estas minas aún poseen ricas vetas minerales que podrían ayudar a la economía mexicana y posibilitarían así la creación de abundantes fuentes de trabajo (1).

El agente causal de la histoplasmosis, el hongo dimórfico Histoplasma capsulatum, se distribuye ampliamente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, principalmente en América; en México se le encuentra en todo el territorio nacional, circunscrito casi siempre a cavernas, minas, túneles y casas abandonadas, donde existe guano de murciélago.

Al ser adquirida la infección en recintos cerrados llenos de aerosoles de esporas se incrementa la gravedad del cuadro clínico, lo que implica una elevada morbilidad, haciendo de la histoplasmosis pulmonar primaria de México una de las de mayor tasa de letalidad en el mundo.

La histoplasmosis no es considerada una enfermedad rara en México, ya que al poseer la República más de 2,000 minas sin explorar, un gran número de bocaminas indígenas y miles de cavernas de todos tamaños, asegura una morbilidad alta entre los individuos que frecuentan este tipo de recintos; espeleólogos, excursionistas, recolectores de guano, gambusinos, geólogos, antropólogos, etc. Aunque se tienen datos de la existencia de brotes epidémicos en todos los estados del país, con excepción de Tlaxcala y Baja California Sur, los estados que presentan mayor frecuencia de brotes son aque-

llos que debido a la estructura geológica de su suelo poseen mayor número - de cavernas y minas abandonadas: Guerrero, Michoacán, Querétaro, Hidalgo, Jalisco, San Luis Potosí, Guanajuato, Tamaulipas, Morelos, Chiapas y Península de Yucatán (2). *H. capsulatum* tiene como habitat natural, en su forma micelial, suelos con alto contenido de nitrógeno como la tierra contaminada con excretas de aves y guano de murciélago. Las esporas de la fase micelial del hongo (Fig. 1), son capaces de penetrar por vía respiratoria al individuo que visita los lugares contaminados, adquiriendo así la histoplasmosis, enfermedad granulomatosa que puede manifestarse desde formas muy leves como catarro común hasta síntomas muy severos. Al parecer, las esporas micelianas al ser inhaladas se convierten, dentro de los macrófagos alveolares, en la forma parasitaria del hongo, o sea las levaduras (Fig. 2), replecándose en el interior de estas células del huésped y permitiendo el establecimiento de la infección.

3. CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA HISTOPLASMOSIS.

En la histoplasmosis se reconocen principalmente dos fases: la infección primaria y la enfermedad evolutiva o diseminada. La primera con un tipo asintomático y otro sintomático; la segunda también con dos tipos clínicos, el agudo y el crónico. En la mayoría de los casos se adquiere la infección en forma subclínica, por lo que se incluye en el tipo asintomático. Los casos con manifestaciones, o sea los incluidos en el tipo sintomático, presentan como formas clínicas: la leve que simula un ataque gripal, con malestar general; la moderada, que toma un aspecto de neumonía atípica con fiebre, hallazgos radiológicos acentuados y serología positiva intensa; la

forma clínica grave que se presenta con fiebre y está caracterizada por la seriedad de la infección, serología positiva muy alta, lesiones cavitarias o tumorales encapsuladas con una imagen radiológica sumamente peculiar (Fig. 3) semejante a la de una infección hematógena producida por Mycobacterium tuberculosis (1-4).

4. RESPUESTA CELULAR EN LA HISTOPLASMOSIS.

Algunas infecciones, en particular las intracelulares, estimulan preferencialmente una respuesta inmune celular en el huésped. Esta respuesta, dada por la participación de diferentes subpoblaciones de linfocitos T con distintas funciones, se caracteriza por un mosaico de actividades biológicas dirigidas por los mediadores de la respuesta celular, las linfoquinas, que tienen acción sobre muchas células, especialmente sobre los macrófagos. La respuesta celular como elemento de defensa no es un fenómeno aislado, se encuentra relacionada con las demás funciones y componentes de la respuesta inmune, por lo que su efectividad depende de la óptima interacción de sus componentes.

Dentro de las infecciones clásicamente conocidas y aceptadas como prototipo de infección inductora de la respuesta inmune celular, las producidas por hongos constituyen ejemplos importantes, siendo la histoplasmosis el modelo más interesante.

Histoplasma capsulatum, es un parásito intracelular del sistema fagocítico mononuclear (Fig. 4). Induce lesiones granulomatosas en las que la reacción tisular está dada por el predominio de macrófagos en la respuesta inflamatoria de las lesiones, aunado a la presencia de linfocitos.

Considerando que la respuesta inmune mediada por células es el mecanismo primordial en la defensa de este padecimiento, muchos investigadores han tratado de aclarar el papel de ésta en la histoplasmosis, tanto a nivel de observaciones clínicas como por investigaciones en modelos experimentales.

4.1. Respuesta celular en humanos.

i.- Observaciones clínicas.

La administración de drogas inmunosupresoras, la terapia con radiaciones así como la presencia de alteraciones patológicas de tipo degenerativo o maligno, aumentan el riesgo de cursar con una infección grave al exponerse estos individuos al hongo (5-8). Las inmunodeficiencias celulares y las ocasionadas por las linforeticulosis malignas (linfomas) están asociadas con frecuencia a la histoplasmosis (9, 10).

La función protectora de la respuesta mediada por células en la histoplasmosis se apoya en el trabajo de Biggar et al. (11), quienes observaron en un individuo hipogammaglobulinémico una resolución favorable de la infección, lo que sugiere que los anticuerpos no participan en la protección desarrollada por el huésped hacia esta enfermedad y que la resolución se debe probablemente a una adecuada respuesta inmune celular.

ii.- Observaciones in vitro e in vivo.

La actividad de la respuesta inmune celular se puede detectar a través de diferentes pruebas in vitro. Una de las más precisas y más utiliza

das es la transformación de linfocitos de pacientes histoplasmosos en presencia de antígeno como la histoplasmina, que es un filtrado del cultivo constituido por productos y componentes del hongo (12-14).

El estado de sensibilización desarrollado por la infección histoplasmosa puede ser demostrado in vivo mediante pruebas cutáneas. Esta prueba es más cualitativa que cuantitativa y su utilidad está dirigida principalmente a estudios epidemiológicos. Sin embargo, ésta es una prueba auxiliar muy útil para establecer el pronóstico de la enfermedad ya que una buena respuesta cutánea y una baja respuesta humoral, frecuentemente se relacionan con un buen pronóstico (15, 16). Por otro lado, la conversión de individuos histoplasmina-negativos a histoplasmina-positivos permite establecer el diagnóstico del contacto con el hongo, o bien expresar el cruce inmune con otras nosologías que comparten estructuras antigénicas similares (15, 16).

Dentro del panorama de la actividad celular en la histoplasmosis humana cabe mencionar el trabajo de Stobo (17) en un grupo de pacientes con la fase diseminada de la enfermedad. Mediante pruebas cutáneas y por la transformación de linfocitos con mitógenos y el antígeno específico, se detectó un abatimiento de la respuesta inmune celular. Esta baja o ausencia de respuesta celular en los pacientes estudiados por Stobo coincide con una síntesis normal de inmunoglobulinas. El autor identifica en este efecto inhibitorio la participación de células T supresoras y en trabajos posteriores compromete además la ingerencia de células adherentes supresoras (17, 18).

Las observaciones anteriores en humanos nos llevan a considerar el papel fundamental de la respuesta mediada por células en esta infección; pero la búsqueda de evidencias directas ha conducido al desarrollo de la investigación en animales.

4.2 Respuesta celular en modelos animales.

Los apoyos más directos sobre la participación de la respuesta mediada por células en la defensa contra la histoplasmosis provienen de diferentes investigaciones experimentales.

El uso de suero anti-linfocítico (SAL), previo al desafío con el hongo, favorece el establecimiento de la infección en ratones, la cual progresa más rápidamente en comparación con la adquirida por ratones no tratados con este suero (19, 20). Se ha observado que el tratamiento de animales con agentes citotóxicos predispone a la infección experimental con histoplasma (20, 21).

Se ha estudiado la actividad de algunas linfocinas en la histoplasmosis experimental como por ejemplo, el factor inhibidor de la migración de los macrófagos obtenidos de ratones inoculados con levaduras de H. capsulatum (22), constituyendo esta linfocina un indicador útil de la manifestación de la respuesta celular en modelos animales.

La transferencia pasiva del estado inmune con células es un argumento importante para definir el papel de la inmunidad celular. Tewari et al (23, 24) han logrado proteger ratones singénicos, transfiriendo células esplénicas o de exudado peritoneal obtenidas de animales inmunizados con el hongo vivo o con ribosomas del mismo y sensibles al tratamiento con suero anti-theta y complemento. Otra prueba más de la participación de la respuesta mediada por células en la histoplasmosis, es la infección de ratones atímicos congénitos (nu/nu) con histoplasma capsulatum, los cuales desarrollan un proceso severo y fatal comparado con los ratones normales (25, 26).

Un dato interesante sobre la respuesta mediada por células en la histoplasmosis, fué el obtenido por Burt y Smith (27) quienes encontraron durante el transcurso de la infección, una correlación entre la aparición de la inmunidad protectora, evaluada en ratones por la cuantificación del hongo en tejido a través de unidades formadoras de colonias (UFC) y el desarrollo de hipersensibilidad tardía, así como de rosetas T específicas para el antígeno. Ellos observaron que la protección y la respuesta inmune celular decrecían a partir de los 28 días post-infección.

5. ACTIVIDAD DE MACROFAGOS.

El macrófago como célula integrada a las funciones de defensa celular a través de un mecanismo de activación mediado por linfocitos T, es uno de los pilares de la defensa celular. No obstante, los estudios acerca de los mecanismos responsables de la participación de estas células en la histoplasmosis son escasos y poco esclarecedores.

La administración de sílica, un agente tóxico para macrófagos aumenta la diseminación y la gravedad del cuadro infeccioso en ratones (28).

El comportamiento de los macrófagos frente a la infección con Histoplasma ha sido particularmente estudiado por Howard et al., quienes inicialmente describieron las condiciones de infección in vitro de células levaduriformes del hongo en histiocitos de ranas y de ratones normales. Determinaron la viabilidad del hongo, su multiplicación intracelular con un tiempo de generación de 10.3 a 11hrs en células de ratón a 37°C en condiciones de fagocitosis de hasta 24hrs(29,30) y el efecto de la temperatura en la parasitosis intramacrofágica (31). El destino del hongo en los

macrófagos provenientes de animales inmunizados fué inicialmente descrito - por Hill y Marcus (32) quienes encontraron inhibición del crecimiento intracelular de Histoplasma, observando que el anticuerpo no ejercía efecto sobre la ingestión y la digestión intracelular del hongo. Howard et al. describieron una inhibición del crecimiento del hongo con macrófagos de ratones normales cultivados en presencia de linfocitos provenientes del exudado peritoneal de ratones inmunizados con dosis subletales de Histoplasma - - (33-35). Al utilizar los productos de la estimulación de los linfocitos inmunes con el antígeno, o sea las linfocinas, no observaron el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células fúngicas (35). Sin embargo, en experimentos posteriores, Lu-Hsieh y Howard (36) lograron activar a los macrófagos con linfocinas demostrando esta activación por la ausencia del crecimiento del hongo, cuando los macrófagos normales fueron incubados con linfocinas. Estos autores identificaron al interferón gamma como una de las linfocinas más capaces para activar macrófagos y eliminar con ello al Histoplasma (36-38). Estas observaciones apoyan la importancia del papel que -- tiene la interacción linfocitos T-macrófagos en la respuesta inmune celular contra la histoplasmosis.

Existen dudas acerca del funcionamiento de esta interacción, así como de los cambios moleculares y fisiológicos que presentan tanto el fagocito como el parásito. ¿Por qué hay restricción del crecimiento del parásito pero no muerte intracelular? ¿Cuáles son los componentes del hongo que influyen en los distintos pasos de su fagocitosis?. Algunas informaciones sobre la fagocitosis de Histoplasma, están relacionadas con estos dos problemas básicos. Sánchez y Carbonell (39) encontraron que las células completas de la

fase levaduriforme del hongo son mejor fagocitadas in vitro por macrófagos normales e inmunes que los protoplastos de éstos, lo que sugiere un papel importante de la pared celular en la estimulación fagocítica, quizá por opsonización con C₃b. Además puede ser que los anticuerpos obtenidos contra la pared celular, favorecen la fagocitosis del hongo (39).

Se ha investigado la actividad microbicida de las células fagocíticas sobre este hongo. Sin embargo, se conoce más de los mecanismos antifúngicos de los polimorfonucleares que de los macrófagos (40,41).

Aunque no está claro el papel de los polimorfonucleares en el proceso infeccioso producido por Histoplasma, se ha observado que el sistema oxidativo de la mieloperoxidasa (MPO) tiene un efecto letal sobre las conidiosporas y las blastosporas de H. capsulatum (42). La acción de esta enzima es más crítica en las blastosporas que en las microconidias. En base a estos hallazgos, Howard et al. discriminaron diferentes cepas de H. capsulatum con distinta susceptibilidad a la MPO, relacionando que un mayor nivel de catalasa en el hongo le confería mayor resistencia a la fagocitosis por los polimorfonucleares (41, 42). No obstante, en trabajos posteriores observaron que la virulencia de las cepas de H. capsulatum, no se asociaba con los niveles de catalasa, ya que cepas de baja virulencia desarrollaban una actividad de catalasa alta y viceversa (43).

Las proteínas catiónicas de los polimorfonucleares también tienen efecto fungicida sobre H. capsulatum (41, 43). Se han aislado de los extractos de polimorfonucleares de humanos por lo menos tres proteínas que presentan una acción anti-Histoplasma. Se desconoce el efecto de las proteínas catiónicas de los neutrófilos y se plantea que puedan entrar a

los macrófagos y dirigirse al fagolisosoma (43). Se ha especulado que las proteínas catiónicas u otras sustancias anti-fúngicas pudieran adherirse a las levaduras de H. capsulatum y favorecer su destrucción después de haber sido fagocitadas, o bien, que estas sustancias pudieran ser fagocitadas por los macrófagos e incorporadas después a los fagolisosomas (43).

Otra enzima estudiada por su efecto antifúngico es la lisozima, la cual muestra una acción importante en ciertas especies de Candida (44) y en Coccidioides immitis (45). En los experimentos realizados con esporas de H. capsulatum se ha demostrado que la lisozima no juega un papel importante en el crecimiento intracelular de este hongo (43).

Se ha visto que la estancia intrafagocítica inhibe la síntesis de proteínas de Histoplasma (46). Estudios en macrófagos alveolares de conejo mostraron que éstos poseen una actividad adversa sobre el crecimiento de ciertos hongos: Candida, Cryptococcus e Histoplasma. Los resultados obtenidos muestran que el crecimiento y la síntesis de proteínas de estos hongos, se inhiben con extractos lisosomales de los macrófagos alveolares y el mecanismo que proponen, involucra un efecto selectivo sobre el transporte de aminoácidos a través de la membrana de las células fúngicas (47). Grenson et al. (48, 49) identificaron una permeasa general de aminoácidos (PGA) en Saccharomyces y Candida, la cual se encuentra alterada, modificando el transporte y la consecuente incorporación de varios aminoácidos a las células de estos hongos, con excepción del transporte de prolina y ácido glutámico. En H. capsulatum se obtuvo un efecto similar con extractos lisosomales de macrófagos alveolares y, a diferencia de los anteriores, la restricción del transporte también se manifiesta para la prolina (50).

Además de esta permeasa general, se descubrieron permeasas específicas para Arg, Lys, Met y Prol. Se postula que este extracto lisosomal interfiere con las permeasas específicas para los aminoácidos, sin alterar el transporte de azúcares, nucleótidos u otras moléculas (50).

Recientemente se ha planteado, que la capacidad de defensa del huésped o el grado de patogenicidad de la cepa de H. capsulatum, depende del tiempo de transformación de la fase micelial del hongo a la fase levaduriforme en el interior de las células fagocíticas. Esta conversión dimórfica in vivo (fase miceliana/fase levaduriforme) tiene un papel crítico en la resolución de la infección, puesto que la fase micelial se elimina más fácilmente. Mientras más lenta sea la conversión a la fase de levadura, mayores posibilidades de defensa para el huésped; por el contrario, una conversión rápida facilita la implantación del proceso infeccioso. Este estudio reveló que la conversión de la fase micelial a levaduriforme empezaba a las 6-7 hrs y se completaba a las 72 hrs de incubación a 37°C en macrófagos alveolares de ratones (51).

Debido a que la información sobre el fenómeno fagocítico en la histoplasmosis es escasa y dispersa, hemos desarrollado una línea de investigación en nuestro laboratorio, que ha aportado algunas observaciones interesantes. Inicialmente, establecimos las condiciones óptimas de infección del hongo in vitro utilizando como modelo de infección a los macrófagos peritoneales de ratones normales de la cepa singénica BALB/c. Este trabajo permitió establecer la dosis resolutive y la dosis no resolutive de infección in vitro de los macrófagos, después de 24 horas de cultivo con las células levaduriformes (fase parasitaria) del hongo (52).

Posteriormente nuestro estudio se extendió a la observación por microscopía electrónica y los resultados señalaron que en los primeros tiempos de infección no hay evidencia del hongo dentro del macrófago; además se observó una marcada actividad de la célula fagocítica debida a la presencia de pseudópodos, que sugieren la posible iniciación de la adhesión y posterior ingestión del hongo; sin embargo no se logró observar la partícula fúngica adherida a la superficie de la célula, posiblemente por el desprendimiento de ésta a causa de su manipulación (Fig. 5). Finalmente, durante los tiempos más largos de infección de 3 a 24 hrs, los macrófagos presentan gran actividad metabólica y parásitos en su interior en diferentes etapas de la infección (Fig. 6) (52-55). El marcaje del hongo y de Mycobacterium tuberculosis con isotiocianato de fluoresceína, utilizado éste último como cepa de referencia, durante una infección continua por 24 hrs, mostró abundante presencia de Histoplasma en los diferentes tiempos de infección, mientras que la cantidad de Mycobacterium fué escasa (Fig. 7) (52, 56).

Considerando que el hongo es capaz de sobrevivir dentro del macrófago y que ésto constituye un hecho fundamental en la implantación de la infección y que además desconocemos los mecanismos de escape del Histoplasma, nuestro trabajo se orientó hacia el estudio de uno de estos mecanismos, la inhibición de la unión fagosoma-lisosoma, que es común en otros microorganismos intracelulares como Mycobacterium tuberculosis, Chlamydia psittaci, Coccidioides immitis, Nocardia asteroides y Toxoplasma gondii (57-62). Inoculando intraperitonealmente levaduras del hongo en hamsters, Dumont y Robert (63) observaron por microscopía electrónica que a los 5 y 30 min después de la infección, ya se identifican uniones de fagosomas y lisosomas, pero a medida que avanza el

tiempo de infección las fusiones disminuyen. En tiempos más largos de infección se han detectado dos tipos de vacuolas fagocíticas, unas que carecen de fosfatasa ácida, lo que sugiere ausencia de unión fagolisosomal y otras que contienen esta enzima, lo que sugiere unión fagolisoma. La observación de estos últimos fagosomas permite proponer que la enzima proviene de fagocitos alterados que han sido fagocitados en conjunto con el hongo. Por lo tanto, proponen que la mayoría de los hongos se multiplican dentro de los fagosomas y que son continuamente refagocitados (63). Estos hechos dejan en entredicho la unión fagosoma-lisoma en macrófagos infectados con H. capsulatum.

El destino del hongo en estas células no es el de su destrucción, -- hay datos de que éste sobrevive y se multiplica en tales circunstancias (63). Estos hallazgos sugieren que el mecanismo de inhibición fagolisosomal pudiera estar operando cuando la infección no se resuelve (63). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Taylor et al.) utilizando el marcaje de lisosomas de macrófagos con naranja de acridina muestra el fenómeno de unión fagosoma-lisoma en macrófagos infectados con el hongo. Sin embargo, el índice de unión fagosoma-lisoma es menor a medida que aumenta la dosis y el tiempo de infección (64, 65) (Fig. 8). Además, al trabajar con cepas vivas y muertas del hongo, empleando la línea celular de macrófagos J-774.2, se encontró una marcada diferencia en cuanto a frecuencia de fusión fagolisoma con respecto a las células vivas y muertas de Histoplasma (Fig. 9). Los experimentos realizados con cepas de distinta virulencia no dieron resultados significativos -- que apoyen una diferencia en el comportamiento de ambas cepas con respecto a la promoción de fusiones fagolisomales (Fig. 10) (64, 65).

Recientemente Von Behrem et al. (66) plantearon que la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma no es un factor primario para la sobrevivencia de Histoplasma capsulatum dentro del macrófago. Ellos analizaron los resultados obtenidos de la infección por Histoplasma en macrófagos peritoneales de ratón tratados con naranja de acridina y en macrófagos sometidos a tinción para fosfatasa ácida, enzima utilizada como marcador de lisosomas. Encontraron una inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma cuando utilizaban la técnica de naranja de acridina en un 41% para levaduras vivas y 81% para levaduras muertas, mientras que en el estudio de microscopía electrónica utilizando el marcaje con fosfatasa ácida los resultados fueron antagónicos a los encontrados con naranja de acridina. Aunque Von Behrem (66) se apoye en los resultados obtenidos por microscopía electrónica para sugerir la ausencia de la inhibición de la fusión fagolisosoma en macrófagos infectados con Histoplasma, hay que tomar en cuenta que esta técnica, aunada a la utilización de una población heterogénea de macrófagos, como los peritoneales, tiene limitaciones similares a las descritas por Dumont et al. (63) quienes observaron que muchas de las fusiones procedían de macrófagos parasitados que habían sido refagocitados.

Los mecanismos de facilitación del proceso fagocítico de Histoplasma por sustancias opsonizantes son contradictorios. Se sabe que la fagocitosis en general se ve facilitada por receptores Fc y C_{3b} de los macrófagos, que pueden captar complejos inmunes o bien fagocitar componentes capaces de activar la vía alterna del complemento. En la infección histoplasmosa se ha descrito que los anticuerpos anti-pared incrementan la ingestión de levaduras del hongo (39) y también se ha visto que el hongo H. capsulatum es capaz de activar la vía alterna del complemento (67). Tales antecedentes nos in-

dujeron a investigar la participación de receptores Fc y C_{3b} en la fagocitosis de Histoplasma. Por ello, estudiamos los cambios que ocurren en los receptores de la membrana celular de los macrófagos y su posible papel en la fagocitosis del hongo. Nuestros resultados preliminares indican que el hongo opsonizado con IgG anti-Histoplasma presenta una cinética de internalización diferente a la del hongo sin opsonizar, sugiriendo la importancia de los receptores Fc. Las levaduras opsonizadas inducen una movilización de las proteínas de la membrana del macrófago marcadas con I¹²⁵ por la técnica de lactoperoxidasa. En cada tiempo de fagocitosis se procede a separar la fracción membranal de los macrófagos y determinar las cuentas totales de I¹²⁵ en un contador gamma, corrigiendo los valores con el número total de macrófagos obtenidos por incorporación de timidina H³. A los 15 min, hay una disminución de las marcas radioactivas, recuperándose las cpm a los 30 min después de la infección, mientras que las levaduras sin opsonizar siguen una cinética diferente (Fig. 11). Por autorradiografía en geles de poliacrilamida se ha detectado la aparición y desaparición de algunas proteínas de membrana del macrófago (PM entre 14 y -- 20 000 daltons) que pudieran estar comprometidas en la internalización del hongo (60). En la actualidad nuestros estudios están encaminados a aclarar la importancia de estos receptores utilizando una modificación del ensayo inmuno enzimático.

6. RESPUESTA HUMORAL.

Aunque sea indiscutible la participación de la respuesta inmune celular en la defensa del huésped contra la histoplasmosis, es necesario establecer la función de los anticuerpos específicos en esta enfermedad. Su papel como elemento protector parece ser poco probable como se deduce de los antecedentes citados previamente en relación a la respuesta inmune.

A pesar de su poca importancia en la defensa contra esta enfermedad

no se debe de olvidar que para el diagnóstico, los anticuerpos de clase -- IgM aglutinantes e IgG precipitantes, son apoyos auxiliares en la detección de una fase aguda o la fase temprana de la enfermedad (69, 70), siendo que los fijadores de complemento de clase IgG principalmente aparecen de 2 a 4 semanas después de la infección y son variables en su magnitud, dependiendo del antígeno de Histoplasma utilizado (fase micelial o fase levaduriforme) (70, 71).

Por otro lado, hay que destacar el valor pronóstico de la respuesta inmune humoral en la histoplasmosis, ya que está perfectamente establecida la relación: respuesta humoral baja/respuesta celular alta, buen pronóstico; respuesta humoral alta/respuesta celular baja, mal pronóstico (15,16).

Sin embargo, la respuesta humoral, aunque útil en el diagnóstico, presenta limitaciones debido al uso de antígeno con alta variabilidad y - reactividad cruzada, que es tan común en los hongos. Muchos investigadores se han dedicado a la búsqueda de antígenos con mejor especificidad y sensibilidad, que permitan un diagnóstico más preciso. La necesidad de contar con antígenos más puros para la detección temprana de la histoplasmosis, es apremiante, debido al aumento de brotes epidémicos de esta enfermedad (1,2). Nosotros hemos implementado un servicio de diagnóstico y de producción de antígeno a partir de cepas autóctonas que han contribuido al trabajo médico a través de un diagnóstico rápido y seguro, utilizando antígenos crudos de Histoplasma (histoplasmina) o bien, un complejo polisacárido-proteína extraído por tratamiento con fenol y etanol seguido de desprotenización por pronasa y - Sevag, que presenta la ventaja de desarrollar menor grado de cruce con productos de otros hongos que presentan similitudes con H. capsulatum --

(tabla 1, 2 y 3) (72-75). Los antígenos crudos en particular, han sido útiles para los estudios de prevalencia de asociaciones infecciosas en una población determinada (76). Este servicio de inmunodiagnóstico y de producción de antígenos ha crecido en los últimos años y hemos logrado atender - 100 análisis anuales en promedio, además de suplir la demanda de antígenos para varias dependencias de salud del país, y también se han enviado a Centro y Sudamérica.

El análisis de los anticuerpos desarrollados durante el curso de la histoplasmosis fué estudiado por varios investigadores. Se observó una ligera elevación de IgA y niveles normales de IgM e IgG en pacientes histoplasmosos (77). Se encontró un aumento marcado de los niveles de la IgA sérica en la forma crónica y ligera elevación durante la fase aguda de la enfermedad, mientras que los anticuerpos de las clases IgG e IgM se presentaron normales (70, 78, 79). Las inmunoglobulinas específicas de la clase IgE también fueron identificadas con un ligero aumento en suero de pacientes con histoplasmosis (80).

Los mecanismos por los cuales los anticuerpos actúan en la eliminación de un parásito se relacionan con la capacidad para opsonizarlos y promover su fagocitosis con eficiencia, ya sea coadyuvando con el sistema del complemento para facilitar la fagocitosis a través de C3b o induciendo la lisis y subsecuente eliminación del parásito. Además, el anticuerpo puede provocar un daño directo al parásito o utilizar los mecanismos de citotoxicidad con la participación de células como las asesinas (K) y macrófagos. En la histoplasmosis, se ha visto que los anticuerpos pueden promover la fagocitosis del hongo pero no influyen en la digestión intracelular de Histo-

plasma(33,39).El complemento no ha sido asociado con ningún daño en la pared celular del hongo aunque se sabe que este hongo es capaz de activar la vía alterna (67). Con respecto a los mecanismos de citotoxicidad no se ha podido comprometer a ninguno de los tipos celulares que participan en la citotoxicidad mediada por anticuerpo. Así mismo no se tiene evidencia de que el anticuerpo promueva un daño directo a la célula fúngica. Este evento es considerado poco común entre los hongos aunque se ha visto que las IgGs - anti-Candida causan una disminución en la filamentación de las blastoconidias que está asociada con una depresión de la respiración fúngica (81).

Hay que destacar que algunos factores humorales de índole no inmunoglobulínicos, por ejemplo la transferrina presente en el suero, puede dañar al hongo directamente o por lo menos limitar la tasa de su crecimiento (82). Este hecho tiene relación con la capacidad de virulencia de la cepa de Histoplasma, dada por la habilidad de adquirir hierro dentro del huésped para su crecimiento. La adquisición de este elemento por el Histoplasma puede ser limitada por la presencia en el huésped de proteínas capaces de unirse al hierro como la transferrina y la lactoferrina.

7. MECANISMOS DE REGULACION.

7.1 Fenómeno de supresión.

Los mecanismos inmunorreguladores son fundamentales para la expresión de la respuesta inmune. Estos permiten que la estimulación inmune participe eficazmente en la defensa del huésped sin que se presente una respuesta deficiente ni que se alcancen niveles exagerados de sensibilización tanto celular (hipersensibilidad celular tipo IV) como humoral (hipersensi

bilidad I, III), los cuales podrían contribuir en forma importante a la patogenicidad de la enfermedad.

Entre los elementos propios del sistema inmunológico que actúan en la regulación inmune están las células asesinas naturales (NK), células adherentes, células T cooperadoras y T supresoras, además de algunos productos elaborados por estas células como interleucina 1, factor cooperador, factores supresores e interleucina 2, siendo importante señalar también los productos finales de la respuesta inmune humoral como los anticuerpos.

Con respecto a las células T, los avances inmunológicos de los últimos 15 años se caracterizaron por delimitar los fenómenos cooperativos y los supresores. Se describieron la cooperación y la supresión así como las células involucradas en estos eventos. Se caracterizaron sus funciones en la regulación inmune. Recientemente, se postularon algunas células adherentes en fenómenos similares (efecto supresor); sin embargo, a los anticuerpos sólo se les asignaba una función protectora en procesos fundamentalmente extracelulares.

Considerando la importancia de los fenómenos regulatorios, que son en última instancia los que determinan la intensidad y duración de la respuesta inmunológica, es pertinente conocer lo que ocurre en la infección histoplasmosa; aclarando que se ha identificado en ella la participación de células T supresoras, macrófagos supresores y se intenta aclarar la función de los anticuerpos. Con respecto a las interleucinas no existen antecedentes sobre la participación de las células productoras de interleucina ni tampoco las receptoras para estas moléculas en la infección producida por H. capsulatum.

7.2 Supresión en la infección histoplasmosa.

Los mecanismos regulatorios que afectan la respuesta inmune celular son especialmente importantes, destacándose por su participación en el desarrollo del cuadro infeccioso aquéllos de índole supresivo.

Es conocido que individuos vacunados contra el sarampión y la viruela presentan anergia temporal a la histoplasmina (83). Se describieron muchos eventos supresivos asociados con la histoplasmosis. Sin embargo, - tienen particular interés los casos de resolución desfavorable de esta enfermedad, donde ocurren en el huésped estados supresivos "ocasionales y naturales" en los individuos que cursan con una infección severa y que no - presentan defectos en la respuesta inmune ni se encuentran bajo terapia -- inmunosupresora.

El hecho de que la infección histoplasmosa se relacione ocasionalmente con estados de supresión en el huésped, nos induce a pensar en los siguientes planteamientos: ¿existe un estado supresivo, provocado por la infección histoplasmosa? por otro lado, ¿sería posible que la infección - potencializara un estado de supresión previo?. Los estudios realizados por Artz y Bullock (84, 85) utilizando un modelo murino, demuestran una correlación entre la fase aguda de la infección por Histoplasma y la existencia de una marcada supresión de la inmunidad celular, así como de la respuesta primaria de anticuerpos. Inicialmente ellos observaron una depresión de linfocitos en las zonas paracorticales de los órganos linfoides de ratones infectados (84). Esta supresión se detectó no sólo con antígenos del hongo, sino también con eritrocitos de borrego, lo que indica su inespecifi-

ficidad. Se observó además únicamente en los animales que recibieron hongo vivo, no así en los animales que fueron inoculados con hongo muerto (85). Estos hallazgos, apoyan la existencia de un estado supresivo generado por el proceso infeccioso (86, 87).

La observación de que la susceptibilidad a la infección en algunos individuos se encuentra aumentada, sin que el individuo muestre inmunosupresiones inducidas o debidas a inmunodeficiencias, nos sugiere la existencia de un estado supresivo circunstancial previo a la infección. Se ha visto que grupos de individuos normales expuestos al hongo bajo idénticas condiciones, sin considerar la dosis y la virulencia de la cepa, desarrollan diferentes cuadros clínicos de la histoplasmosis. Es importante considerar que los factores genéticos, nutricionales, hormonales y de fatiga entre otros, actúan en la expresión de la susceptibilidad de cada individuo. Estos distintos factores probablemente manifestarían su efecto a través de una vía común capaz de promover una baja en la defensa del individuo. Una de las maneras de producir cambios en la resistencia, sería alterando el equilibrio del sistema inmune modificando sus mecanismos de regulación y promoviendo en un momento dado una incapacidad para defenderse, lo que podría coincidir con la infección. Estos sujetos por lo tanto, presentarían mayor susceptibilidad a infectarse y un curso más crítico de la enfermedad. Las evidencias experimentales que apoyan esta hipótesis son pocas. Se han detectado cambios en la población linfocítica de diferentes animales, incluyendo al hombre, que reflejan las diferencias de sexo, edad y estímulo hormonal que pudieran estar actuando indirectamente en la resistencia. En la histoplasmosis experimental, Saslaw y Schaefer observaron que los ratones hembras de la --

cepa Suiza (albina) desarrollaban mayor resistencia a la infección y que la edad del animal era un factor de cambio en la susceptibilidad al desafío -- con el hongo (88, 89). Hay que señalar que estos hechos no se pueden generalizar ya que se han detectado diferentes comportamientos en otras cepas de animales (90-93).

La variación de la población linfoide en los animales es un hecho conocido (94-106). Se sabe por ejemplo que ratones de menos de cuatro semanas presentan un predominio de células supresoras (102, 103), mientras que para edades más avanzadas (mayor de 12 meses) la información acumulada es contradictoria, variando los resultados con la cepa y la especie animal (94, 95, 98). Se puede esperar que la población linfoide en cuanto a número y tipos de células, sufra modificaciones inducidas por distintos mecanismos de regulación interna a lo largo de la vida del animal, y posiblemente estos cambios condicionen algunas variaciones en la susceptibilidad y resistencia del animal a infecciones.

Taylor et al, observaron que en la cepa singénica BALB/c, las hembras desarrollan una marcada resistencia a la infección con H. capsulatum, así como que en los animales de menos de 1 mes y de más de 1 año de edad la susceptibilidad a la infección se encuentra aumentada (Fig. 12) (107). Nuestros resultados sugieren una ligera disminución en el número de linfocitos y una mayor destrucción de los macrófagos peritoneales en los ratones de menos de 1 mes y de más 1 año de edad. Esto podría incidir desfavorablemente en estos animales cuando están bajo el desafío con el hongo vivo, en comparación con los ratones más resistentes o sea los de 3 a 4 meses de edad (107). Los ratones machos de la cepa BALB/c menores o hasta de 1 mes constituyen un mode

lo experimental apropiado para el manejo de la infección histoplasmosa murina, debido a su alta susceptibilidad a la infección, particularmente cuando se compara con otras cepas de ratones como la CD-1 y la C57 que desarrollan mayor resistencia (datos no publicados). Al estudiar la alta susceptibilidad de los ratones BALB/c machos menores de 1 mes, fué posible comprobar que éstos presentaban un estado supresivo y que este estado era transferible por células de bazo a ratones singénicos adultos de la misma cepa y sexo, que bajo condiciones normales resistían al desafío con el hongo (tabla 4) (108). Nuestros últimos estudios utilizando suero antimacrófago obtenido en conejos y un monoclonal anti Thy 1.2 añadidos de complemento, nos sugieren que tanto las células adherentes como los linfocitos T participan de este efecto supresivo (tabla 5). En el presente, se plantea que el mecanismo supresor en bazo de ratones neonatos es producido por células dependientes de timo (100, 102-104).

La proporción de células linfoides en algunas cepas de ratones varía con la edad (96-101), aunque esta observación no ha sido generalizada para todas las especies de animales. Sin embargo, es posible extrapolar estos hechos a los cambios generados en la susceptibilidad del hombre según las modificaciones presentes en las diferentes etapas del desarrollo del individuo.

Con respecto al sexo y su relación con procesos infecciosos, la información científica está más relacionada a la facilitación del crecimiento del parásito por posibles efectos hormonales y existen pocos datos respecto a cambios en la respuesta inmune. El sexo femenino ha mostrado mayor capacidad de respuesta, en comparación con el sexo masculino, en cuanto a la for

mación de anticuerpos después de la inmunización con varios antígenos y en cuanto al rechazo de aloinjertos de piel, así como de la respuesta a tumores. Esas diferencias están bajo control genético, pero las hormonas sexuales pueden tener un efecto directo (109, 110).

Con relación al papel del sexo en la defensa de procesos parasitarios, Kittas y Henry demostraron una mayor resistencia a la infección toxoplasmática en ratones gonadectomizados que en ratones normales de ambos sexos (111). La administración del hexoestrol indujo una atrofia tímica casi total y una involución parcial del tejido linfoide. Ratones infectados con Toxoplasma gondii y tratados posteriormente a la infección con hexoestrol mostraron un aumento en la mortalidad, probablemente como resultado de una depresión en la inmunidad mediada por células causada por esta hormona (111).

Los andrógenos son inhibidores de la respuesta inmune humoral; en contraste, los estrógenos aumentan la fagocitosis y la actividad de linfocitos B. Los estrógenos pueden tener un efecto supresivo sobre la inmunidad mediada por células que es más marcado en el sexo femenino, especialmente en mayores de 12 años (112, 113).

Respecto a la relación entre sexo y enfermedades por hongos se ha observado que la frecuencia de estas infecciones varía en función de la edad y raza. El estudio de la incidencia de Pityrosporum sp. en niños de raza caucásica y raza negroide, antes y después de la pubertad, demostró mayor frecuencia de levaduras en los caucásicos que en los negroides, así como en niños mayores o sexualmente maduros (114).

En la infección experimental por Cryptococcus neoformans en ratones

hembras o machos adultos Swiss-Webster, se observó que la media de sobrevivencia en días (MSD) fué más larga en las hembras que en los machos, lo que sugiere una mayor resistencia de las hembras a la infección experimental con Cryptococcus (115).

En los hongos existe una estimulación por hormonas sexuales como el 17 β estradiol, la progesterona y la testosterona en el crecimiento de Coccidioides immitis. Posiblemente estas hormonas aumentan la predisposición a la enfermedad, así como la diseminación de la coccidioidomicosis -- (116). En las mujeres embarazadas la diseminación del hongo es' especialmente notable, mientras que las mujeres no embarazadas son menos susceptibles que los hombres a la diseminación extrapulmonar de esta infección -- (116).

7.3 Participación de células supresoras.

La presencia de las células supresoras en individuos con histoplasmosis ha sido señalada anteriormente en humanos (17). En el modelo animal, Bullock et al., han dado un énfasis especial a la participación de células supresoras en la histoplasmosis. Ellos identificaron que en la etapa -- temprana de la infección están involucradas células adherentes al nylon -- (117,118) y que el tratamiento con indometacina de células de bazo de ratón infectado no modifica in vitro la supresión mediada por células T ó por las células adherentes al nylon. En contraste, el tratamiento de las células de bazo con ciclofosfamida elimina completamente la actividad de las células T supresoras, mientras que las células adherentes no son alteradas (119).

Un verdadero balance regulatorio ha sido observado durante el transcurso de la infección histoplasmosa murina, al estudiar ratones sensibles ($C_{3}H/HeJ$) y resistentes ($C_{57}BL/6$). La primera cepa de ratones produce un factor supresor elaborado por las células de bazo con fenotipo $Thy1.2^{+} Ly 2^{+} I-J^{+}$ y los ratones resistentes producen un factor cooperador producido por células con marcadores $Thy 1.2^{+} Ly 1^{+}$ (118,120). Se caracterizaron las células blanco del factor supresor, las cuales presentaban un fenotipo de $Thy 1.2^{+} Ly 1^{+} 2^{+} I-J^{+}$ lo que sugiere que estas células funcionan como supresoras de segundo orden (120).

Considerando el papel regulador de estas células es posible pensar que debido a cambios en los mecanismos de regulación, la enfermedad puede progresar o incluso quedar compartimentalizada, como se ha observado en un caso de meningitis por Histoplasma sin diseminación, en el que se detectaron células T supresoras hiperactivas en líquido cefalorraquídeo exclusivamente (121). De ahí que las alteraciones en la respuesta de defensa celular podrían deberse a múltiples fallas en los mecanismos de regulación, dadas por células supresoras y quizá por los anticuerpos. Por otro lado, se sabe que la activación de la población supresora en forma específica puede ser promovida por la presencia de antígeno soluble o por complejos antígeno-anticuerpo. Aunque no se hayan obtenido evidencias sobre la detección de antígenos solubles circulantes de Histoplasma, es factible que esta vía de activación de una población supresora se desarrolle, ya que se ha establecido la asociación con complejos inmunes circulantes en la histoplasmosis (122). Además, el hecho de que la supresión inmunológica pueda ser específica, induce a investigar la posibilidad de que algún producto del hon-

go tenga un efecto inmunosupresor a semejanza de microorganismos como el -- Trypanosoma, el Plasmodium y otros (123,124).

Los estudios realizados con fines de identificar el compromiso de células linfocíticas, como las células asesinas naturales (NK) en el proceso infeccioso dado por el hongo H. capsulatum en ratones bg/bg que son animales que presentan un defecto fundamentalmente en células NK y en macrófagos, demostraron que a pesar de que estos ratones resuelven mejor la infección histoplasmosa que los ratones atímicos nu/nu, son más susceptibles - que los ratones normales (125). Shegematsu et al. sugieren que estas células juegan un papel en la defensa contra la infección debido a que los esplenocitos de ratones CBA/J fueron capaces de presentar un efecto citotóxico in vitro contra las levaduras de Histoplasma, así como contra células YAC-1 marcadas con Cr⁵¹. Experimentos subsecuentes utilizando ratones depletados de células NK por tratamiento con suero anti-asialo GM₁ mostraron que estos animales al ser infectados, desarrollaron una rápida diseminación del hongo (126).

7.4 Participación de anticuerpos.

La participación de los anticuerpos como "moléculas reguladoras" no es novedosa, sobre todo en su acción sobre células B, ya que desde 1960 se conocía el fenómeno de inhibición de anticuerpos por un mecanismo de retroalimentación (127, 128).

Por otro lado, la información de la actividad de los anticuerpos sobre la respuesta inmune celular ha sido más reciente, a través del estudio de anticuerpos anti-idiotipo de reacción cruzada, capaces de inhibir la respuesta cutánea a antígenos hapténicos como el p-azofenilarsenato -

(129) y la fosforilcolina: (130). Se ha visto también que en un sistema - - acarreador-hapteno, el anticuerpo anti-hapteno de la subclase IgG2 es capaz de suprimir la respuesta cutánea hacia el acarreador globulina gamma. bo vina (GGB) (131).

En otras enfermedades intracelulares hay evidencias que apoyan el - concepto de que los anticuerpos actúan sobre la respuesta celular. La relación de los títulos de anticuerpos con el pronóstico de la enfermedad podría representar un importante argumento hacia el papel modulador de estas moléculas. Esta relación ha sido establecida en distintos padecimientos micóticos en especial en la histoplasmosis, coccidioidomicosis y blastomicosis (3, 4).

En la histoplasmosis, observaciones in vitro indican que la presencia de los anticuerpos anti-H. capsulatum inhiben el fenómeno de transformación linfocítica inducido por el antígeno histoplasmina (132). Además, en un estudio de pacientes histoplasmosos, se plantea una interacción entre ambas respuestas inmunes por un mecanismo de fluctuación, caracterizado por - variaciones en la expresión de ambas respuestas inmunes en estos individuos, coincidiendo que en los periodos en que una respuesta es baja, la otra aumenta en magnitud y viceversa (133).

Taylor et al. obtuvieron resultados que sugieren que los anticuerpos juegan un papel modulador en la expresión de la hipersensibilidad - de tipo tardía en ratones sensibilizados con Histoplasma (134) y regulan - la expresión de la respuesta celular en animales infectados con el hongo - (135). Por otra parte, se pudo comprobar que la transferencia pasiva de - - anticuerpo anti-Histoplasma inhibe in vivo la respuesta de defensa celular

(Fig. 13), así como la expresión de la respuesta tardía en ratones infectados, participando en este efecto las IgG anti-Histoplasma (Fig. 14) (136).

El suero inmune inhibe el fenómeno de la transformación linfocítica inducida por el antígeno específico o por mitógenos en padecimientos como - histoplasmosis, tuberculosis, lepra, coccidioidomicosis y paracoccidioidomycosis (79, 132, 137-142). Además, algunos trabajos muestran la influencia de otros factores séricos, no inmunoglobulínicos, sobre manifestaciones in vitro de la respuesta inmune mediada por células (143-146).

Es posible que los anticuerpos no actúen aisladamente, sino que su efecto regulador esté dirigido por complejos antígeno-anticuerpo, ya que la presencia de éstos ha sido identificada y afecta la inmunidad celular en -- los procesos tumorales, en la histoplasmosis, tuberculosis, lepra y coccidioidomicosis (147, 122, 148-151).

8. RELACION ENTRE EL MECANISMO DE REGULACION DE LA RESPUESTA INMUNE Y LA - PATOGENIA DE LA HISTOPLASMOSIS.

En la histoplasmosis, así como en otros tipos de infecciones intracelulares, la patogenia y la inmunidad no se pueden considerar temas separados dada la complejidad de la defensa del huésped y la naturaleza controvertida del mecanismo de agresión del agente infeccioso.

Considerando todo lo expuesto es posible proponer que en condiciones de inmunocompetencia, el aparato inmune es capaz de resolver una infección por Histoplasma mediante la eliminación del hongo a través de sus efectos celulares. Sin embargo, en los casos en que la infección provoca daño tisular severo y sostenido, el aparato inmune carece de eficiencia en la -

eliminación del microorganismo y produce lesiones compatibles con las observadas en la hiperactivación de la respuesta inmune celular (hipersensibilidad retardada).

Frente a un sistema inmune sin alteraciones detectables y en presencia de una histoplasmosis severa, se debería pensar en la existencia de mecanismos que le permitan al hongo evadir los efectores inmunológicos, o sea, poca antigenicidad del microorganismo, recambio antigénico, enmascaramiento de determinantes antigénicos, resistencia a la lisis por digestión en fagocitos y actividad antifagocítica, entre otros. Alternativamente, es importante considerar la existencia de mecanismos que permitan modificar los sistemas de regulación de la respuesta inmune. Existe la posibilidad de que la falla en la eliminación del hongo provenga de una alteración en la regulación de la respuesta inmune, dando como consecuencia una incapacidad para resolver la infección.

8.1. Posibles modelos de regulación de la respuesta inmune en la histoplasmosis.

Para entender las alteraciones en la regulación, debemos resumir los conceptos actuales que se han postulado para mantener el equilibrio y por tanto la eficiencia de la respuesta inmune.

1. La interacción macrófago-linfocito T.- La fagocitosis del antígeno en la fase aferente de la respuesta inmune, así como su digestión posterior y exposición en la superficie de la membrana de los macrófagos, en asociación con antígenos codificados por genes ligados al complejo mayor de histocompatibilidad, permite la activación de los linfocitos T ayudadores (Ta)

de los T efectores (Te) (152, 153). En cambio la activación de los linfocitos T supresores (Ts) no siempre requiere la presentación del antígeno por los macrófagos. Asimismo, la presencia de antígeno soluble estimula la población T supresora (específica) con variaciones en la magnitud y/o calidad de la respuesta (154, 155).

2. Actividad de las células supresoras.- El balance entre las interacciones Ts-Te/linfocitos B y Ta-Te/linfocitos B, contribuye a mantener el equilibrio de la respuesta inmune. Una alteración en estos mecanismos desencadena fenómenos autoinmunes por ausencia o falla en la supresión, así como por la incapacidad de responder en forma adecuada (exceso de supresión). Por otro lado, se ha establecido que las células supresoras también influyen en la producción preferencial de una determinada clase o subclase de inmunoglobulinas, y en la afinidad de la reacción con el antígeno, lo que incide lógicamente en la calidad de la respuesta (156, 157).

3. El papel de los anticuerpos.- Estas moléculas pueden ejercer un papel modulador básicamente por tres mecanismos: i.- a través de un proceso de inhibición de los linfocitos B por retroalimentación; proceso que aún está poco aclarado (127, 128). ii.- eliminando o enmascarando al antígeno, lo que no permite la activación o reactivación de las células efectoras o reguladoras (158, 159). iii.- a través de una interacción directa de los anticuerpos específicos con los receptores para el antígeno en los linfocitos, de acuerdo con la hipótesis de la red de Jerne por anticuerpos anti-idiotipo (160, 161). El anticuerpo anti-idiotípico que reacciona con determinantes ubicados en el sitio activo de los anticuerpos (idiotipo), donde está el punto de combinación con un determinante del antígeno específico -

puede también reaccionar con los receptores de superficie para el antígeno, situados en los linfocitos que poseen determinantes análogos, de ahí que - los anti-idiotipos pueden tener por lo tanto actividad antireceptora. Los complejos antígeno-anticuerpo son particularmente eficaces para inducir la producción de anticuerpos anti-idiotípico (162). Estos anticuerpos pueden reaccionar con los linfocitos B y T (163,164) y la clase y subclase de sus inmunoglobulinas influye en el resultado de la interacción; en algunos sistemas modelo el anticuerpo anti-idiotipo heterólogo IgG1 activa los linfocitos B y la célula cooperadora T (164) mientras que se ha demostrado que el anticuerpo heterólogo IgG2 suprime las reacciones inmunológicas específicas (165). El anticuerpo anti-idiotipo puede inactivar las células T in vivo (166) y también se sabe que la reactividad del injerto frente al huésped (respuesta celular) disminuye específicamente en los animales activamente inmunizados para producir anticuerpos anti-idiotípicos (167,168).

Los antecedentes citados apoyan la función reguladora de las moléculas de anticuerpo, tanto por mecanismos que implican especificidad como por mecanismos de reactividad cruzada.

De acuerdo a lo anterior, se propone que la respuesta inmune en la histoplasmosis no es eficiente debido a fallas en algún sitio del sistema inmunológico, ya sean inducidas por el hongo sobre la regulación o promoviendo un escape de los efectores. En la infección histoplasmosa se postula que en los casos donde se manifiesta la enfermedad, la interacción linfocito T-macrófago está alterada y que ésta alteración se manifiesta en el huésped a través de la incapacidad de destruir al hongo (hiporreactividad inmune celular) o de promover la destrucción de sus tejidos por la violencia -

de la respuesta inmunitaria, en donde el proceso de hipersensibilidad tardía (hiperreactividad inmune celular) es responsable en parte, de la destrucción de células y tejidos. Esto se apoya en el hecho de que se desconoce el mecanismo de patogenicidad característico de H. capsulatum, ya que en los procesos de infección de macrófagos in vitro donde hay sobrevivencia del hongo in tracelularmente, no se ha podido identificar ningún componente especial del hongo comprometido con su poder agresor. Además, se sabe que los macrófagos inmunes son capaces de fagocitar más activamente los hongos y que éstos no son destruidos en su totalidad intracelularmente (33-36).

Por lo expuesto, se proponen en este trabajo los siguientes mecanismos por los cuales los anticuerpos anti-Histoplasma estarían inhibiendo la respuesta celular en la histoplasmosis: A) por efecto anti-idiotipo dando --reacción cruzada con idiotipos presentes en los linfocitos (Fig.16); B) A través de los sitios de reconocimiento para los receptores Fc (FcR) en superficies celulares (Fig.16). Con respecto al primer mecanismo se proponen tres alternativas. 1) El anticuerpo formado contra el antígeno presenta reacción - cruzada, actuando como anticuerpo anti-idiotipo al reconocer los determinantes idiotípicos presentes en los receptores del antígeno de los linfocitos T efectoras de la respuesta celular. 2) El anticuerpo anti-Histoplasma induce la formación de anticuerpos anti-idiotipo, los cuales podrían reconocer - los idiotipos del anticuerpo anti-Histoplasma y determinantes similares - - presentes en los receptores celulares de células T efectoras. Colizzi et al. (169) encontraron en otro modelo intracelular que los anticuerpos auto-anti-idiotipo producidos en la infección con BCG, inhiben la capacidad de transfe rencia pasiva de la intrademorreacción al antígeno específico dada por las

células inmunes donadoras, en ratones receptores normales desafiados con PPD. lo que constituye un claro apoyo a este planteamiento; 3) Los anticuerpos anti-Histoplasma que dan reacción cruzada o bien los auto-anti-idiotipos formados durante la infección, reconocen los determinantes idiotípicos de los receptores de las células T supresoras activándolas; éstas a su vez actúan sobre los linfocitos T efectoras disminuyendo su función y por tanto la respuesta celular es deficiente. Se ha encontrado que la intradermorreacción de ratones BALB/c a un hapteno específico (fosforilcolina), puede ser suprimida por la transferencia pasiva del anticuerpo anti-idiotipo T-15 (producido contra la fosforilcolina unida a la proteína de mieloma TE PC-15) o bien por el anti-hapteno que expresa también el idiotipo dominante T-15 (130). El suero anti-idiotipo induce la actividad de las células T supresoras específicas para el idiotipo, las cuales actúan suprimiendo tanto la fase inductora como la efectora de la intradermorreacción al hapteno. Sy et al. (125, 170-172) han estudiado el mecanismo por el cual los idiotipos regulan la función de las células T en la hipersensibilidad retardada al hapteno p-azofenilarsenato. Sus datos muestran que las dosis de anticuerpos anti-idiotipo que fueron administradas después de la estimulación antigénica inducen la formación de células T supresoras que inhiben la respuesta de hipersensibilidad tardía. En este caso el sistema de supresión idiotípica está mediado por células T supresoras que pueden funcionar por la acción de un complejo inmune idiotipo-anti-idiotipo. Esos mismos autores (173) mostraron que las células T supresoras de segundo orden, las cuales expresan receptores anti-idiotipo, son inducidas por células T supresoras con marcadores I-J⁺. Ellos sugieren que estos dos tipos de células T se estimulan mutuamente y que las células T de segun-

do orden pueden tener receptores anti-idiotipo capaces de unirse al idiotipo. Por tanto, la supresión idiotípica puede ser directa o indirecta, en este caso por medio de células supresoras de segundo orden, dependiendo del estímulo inicial.

Otros investigadores (174, 175) han demostrado que la porción Fc de los anticuerpos anti-idiotipo es necesaria para suprimir la respuesta inmune, lo que sugiere que la supresión vía anti-idiotipo puede ser mediada por la + interacción del anti-idiotipo con el receptor para el antígeno y con el receptor Fc, o bien por el cruce de ambos receptores sobre la superficie del linfocito.

Los posibles modelos de interferencia de los anticuerpos anti-histoplasma en la respuesta celular donde participan los receptores Fc presentan también diferentes opciones (Fig. 16): 1) Que existan receptores en los linfocitos y macrófagos supresores para la porción Fc del anticuerpo, la cual se uniría a estas células promoviendo la supresión de los linfocitos T efector; este modelo encuentra apoyo en el trabajo de Moretta et al. (176). - 2) Otra posibilidad aunque más remota, es que los linfocitos T efector activados, tuvieran receptores para Fc además del receptor para el antígeno, de ahí que al unirse el anticuerpo podrían enmascarar a los receptores para el antígeno, o bien provocar cambios membranales en los linfocitos que evitarían que estas células llevaran a cabo la estimulación por el antígeno. Los complejos antígeno-anticuerpo son las formas ideales para producir una "intromisión ilícita" de los anticuerpos auto-anti-idiotipos. Se ha propuesto que es bajo esta forma que dichos anticuerpos interfieren con la acción de los linfocitos T; Hayward et al. (177) sugieren que la inmunosupresión encontrada

in vitro al poner en contacto linfocitos T y complejos inmunes, es provocada por la interacción de la porción Fc de las inmunoglobulinas presentes en los complejos inmunes con los receptores Fc de los linfocitos supresores, desencadenándose así el efecto supresor. Además, tanto los complejos inmunes que contienen IgG como los que contienen IgM pueden provocar que las células T in vitro adquieran actividad supresora (177).

Por último, es posible plantear en la histoplasmosis, que la concentración del anticuerpo juega un papel importante en la acción y expresión de la respuesta celular, según su relación con el antígeno (Tabla 6).

Las investigaciones realizadas hasta el momento sobre el papel de -- los anticuerpos en la respuesta celular han permitido plantear los modelos - de acción anteriores, donde se asocian los anticuerpos con los mecanismos de regulación de la respuesta inmune celular. Reconocemos el hecho de que estos modelos son hipotéticos y aún presentan interrogantes que hay que resolver; algunos se apoyan en datos experimentales, sin embargo, faltan más conocimientos que permitan fundamentar directamente estas hipótesis en el modelo - de la infección por Histoplasma capsulatum.

Con el interés de someter a la comprobación algunos de los planteamientos señalados en los modelos de regulación por anticuerpos, se sugieren a continuación los siguientes proyectos de investigación:

1.- Obtención de anticuerpos anti-idiotipo (Anti-id) por la inmunización de animales con anticuerpos monoclonales para H. capsulatum.

2.- Determinación de la actividad de los anticuerpos anti-idiotipo obtenidos, en la evolución del proceso infeccioso de animales infectados con el hongo.

3.- Caracterización de la interacción del anti-id y de anticuerpos anti-Histoplasma con poblaciones celulares enriquecidas de células adherentes y linfocitos T; buscando identificar una función supresora como resultado de estas interacciones, en un sistema específico y en sistemas no relacionados.

4.- Observación del papel de los fragmentos Fc de los anticuerpos anteriormente citados en la respuesta de los animales a la infección histoplasmosa, desarrollada post-inmunización con anticuerpos anti-id o anti-histoplasma con o sin la porción Fc.

Estos planteamientos representan algunas de las perspectivas futuras de investigación para dar continuidad a esta línea de trabajo experimental.

9. COMENTARIOS.

Toda la información presentada permite elucubrar sobre los factores que intervienen en las alteraciones de la respuesta inmune celular en la histoplasmosis. Se señalan algunas consideraciones:

1.- La persistencia del antígeno en el huésped puede ser un factor de sobreestimulación de la respuesta inmune celular que favorezca una activación capaz de superar la barrera de ayuda o beneficio (hiperreactividad inmune celular).

2.- La existencia de defectos en los diferentes mecanismos de regulación de la respuesta inmune, en especial de la respuesta mediada por células, favorece la implantación de la infección. Estos defectos pueden ser -- causados por una posible hiperactivación de células T supresoras que determine una relación desfavorable en la defensa de la respuesta celular, por la vía de una interacción T supresora-T efectora (T_s - T_e) (hiporreactividad celular); alternativamente se postula que los anticuerpos anti-idiotipo -- formados durante la infección o los complejos Ag-Ac ó bien el anticuerpo anti-Histoplasma por cruce inmune dando actividad de anti-idiotipo, pueden actuar inhibiendo directamente a la célula T efectora de la respuesta celular o estimulando las células supresoras, que a su vez actúen sobre las T efectoras.

Es evidente que aún quedan muchos puntos por aclarar acerca de la fenomenología inmune en este modelo infeccioso. Nuestro interés sobre los aspectos de regulación inmune se debe a que creemos que en este tipo de infecciones las acciones de nivelación de una respuesta celular adecuada se ejercen a través de un mecanismo modulador, que evita posibles daños al huésped.

10. SUMMARY.

Because of its characteristic intracellular parasitosis, its affinity for the phagocytic mononuclear system and the resulting typical granulomatous lesions, the histoplasmal infection constitutes a good model for the study of the cell-mediated immune mechanism.

In this study, the role of the immune response in histoplasmosis through the T lymphocyte-macrophage interaction, both in human and animal models is revised. Furthermore, the basic knowledge concerning humoral response and the possible mechanisms for immune regulation in this disease have been established. Finally a theoretic model concerning the regulation of the cell mediated response by antibody, reaffirming the relationship between immunity and pathogenesis in this infectious process is presented.

11. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Velasco C O, González Ochoa A. Primary pulmonary epidemic histoplasmosis in an abandoned mine. *Mykosen*, 1977; 20: 393-9.
- 2.- Velasco C O. Aspectos epidemiológicos de la histoplasmosis en México. *Neumol Cir. Tórax. Mex.* 1985. En prensa.
- 3.- Rippon W J. Histoplasmosis. In: *Medical mycology*. 1st ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1974; 321-47.
- 4.- Emmons C W, Binford C H, Utz J P, Kwong-Chung K J. Histoplasmosis. In: *Medical mycology*. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger 1977; 305-41.
- 5.- Murray P J S, Sladden R A. Disseminated histoplasmosis following long term steroid therapy for reticulosarcoma. *Br Med J* 1965; 2: 631-2.
- 6.- Kauffman C A, Israel K S, Smith J W, White A C, Schwarz J, Brooks G F. Histoplasmosis in immunosuppressed patients. *Am J Med* 1978; 64: 923-32.
- 7.- Park R K, Oltz R W, Carey T B. Unusual cutaneous infections associated with immunosuppressive therapy. *Arch Derm* 1967; 95 345-50.
- 8.- Cox F, Hughes W T. Disseminated histoplasmosis and childhood leukemia. *Cancer* 1974; 33: 1127-33.
- 9.- Ende N, Pizzolato P, Ziskind J. Hodgkin's disease associated with histoplasmosis. *Cancer* 1952; 7: 763.
- 10.- Nelson N A, Goodman H L, Oster H L. The association of histoplasmosis and lymphoma. *Amer J Med Sci* 1957; 233: 56.
- 11.- Biggar W D, Meuwissen H T, Good R A . Successful defense against *Histoplasma capsulatum* in hypogammaglobulinemia. *Arch Intern Med* 1971; 128: 585-7.
- 12.- Chaparas S D, Sheagren J N, De Meo A, Hedrick S. Correlation of human - skin reactivity with lymphocyte transformation induced by mycobacterial antigens and histoplasmin. *Am Rev Respir Dis* 1970; 101: 67-73.
- 13.- Alford R H, Goodwin R A. Variation in lymphocyte reactivity to histoplasmin during the course of chronic pulmonary histoplasmosis. *Am Rev Respir Dis* 1973; 108: 85-92.
- 14.- Meredith T A, Smith R E, Braley R E, Witkowsks J A, Kaethe S M. The prevalence of HLA-B7 in presumed ocular histoplasmosis in patients with peripheral atrophic scars. *Am J Ophthalmology* 1978; 86: 325-8.
- 15.- Youmans G P. Histoplasmosis, coccidioidomycosis, blastomycosis. In: Youmans G P, Paterson P Y, Sommers H M, eds. *The biologic and clinical basis of infectious diseases*. 2nd ed. Philadelphia: W B Saunders, 1980: 404-27.

- 16.- Dick G. Histoplasmosis. In: Dick G, ed. Aspects of infectious diseases. England M T Press Limited. International Medical Pu. 1979; 41-5.
- 17.- Stobo J D, Paul S, Van Scoy R E, Hermans P E. Suppressor thymus-derived lymphocytes in fungal infection. J Clin Invest 1976; 57: 319-28.
- 18.- Stobo J D. Immunosuppression in man; suppression by macrophages can be mediated by interactions with regulatory T lymphocytes. J Immunol 1977; 119: 918-24.
- 19.- Adamson D M, Cozad G C. Effect of anti-lymphocyte serum on animals experimentally infected with Histoplasma capsulatum or Cryptococcus neoformans. J Bacteriol 1969; 100: 1271-6.
- 20.- Berry C L. Modification of the host response in experimental histoplasmosis. J Pathol 1969; 97: 653-64.
- 21.- Cozad G C, Lindsey T J. Effect of cyclophosphamide on Histoplasma capsulatum infections in mice. Infect Immun 1974. 9: 261-5.
- 22.- Sharma D, Chaudhary S., Burt W E, Tewari R M. Characteristics of delayed hypersensitivity and macrophage migration inhibitor factor in mice immunized with ribosomes or live yeast cells of Histoplasma capsulatum. In: Kuttin E S, Baum G L, eds. Human and animal mycology: proceedings of the 7th Congress of ISHAM, Jerusalem, Israel, March 11-16, 1979. New York: Elsevier/North Holland, 1980; 89-92.
- 23.- Tewari R P, Sharma D, Solotorvsky H, Lafemina R, Balint J. Adoptive transfer of immunity from mice immunized with ribosomes of live yeast cells of Histoplasma capsulatum. Infect Immun 1977; 15: 785-99.
- 24.- Tewari R P, Sharma D K, Mathur A. Significance of thymus-derived lymphocytes on immunity elicited by immunization with ribosomes or live yeast cells of Histoplasma capsulatum. J Infect Dis 1978; 138: 605-13.
- 25.- Williams D M, Graybill J R, Drutz D J. Histoplasma capsulatum infection in nude mice. Infect Immun 1978; 21: 973-7.
- 26.- Williams D M, Graybill J R, Drutz D J. Adoptive transfer of immunity to Histoplasma capsulatum in athymic nude mice. Sabouraudia 1981; 19: 39-48.
- 27.- Burt W R, Smith R A. Studies on experimental murine histoplasmosis: host protection and cellular immunity. Can J Microbiol 1983; 29: 102-7.
- 28.- Von Behren L A, Chaudhary S, Khardoni N, Rabinovich S, Shu M D, Tewari R P. Effect of silica on the susceptibility of mice to experimental histoplasmosis RES; J Reticuloendothel Soc 1983; 34: 99-111.
- 29.- Howard D H. Intracellular behavior of Histoplasma capsulatum. J. Bacteriol 1964; 87: 33-38.

- 30.- Howard D H. Intracellular growth of Histoplasma capsulatum. J Bacteriol 1965; 89: 518-23.
- 31.- Howard D H. Effect of temperature on the intracellular growth of Histoplasma capsulatum. J Bacteriol 1967; 93: 438-44.
- 32.- Hill G A, Marcus S. Study of cellular mechanisms in resistance to systemic Histoplasma capsulatum infection. J Immunol 1960; 85: 6-13.
- 33.- Howard D H, Otto V, Gupta R K. Lymphocyte-mediated cellular immunity in histoplasmosis. Infect Immun 1971; 4: 605-10.
- 34.- Howard D H. Further studies on the inhibition of Histoplasma capsulatum within macrophages from immunized animals. Infect Immun 1973; 8: 577-81.
- 35.- Howard D H. Experiments on lymphocyte mediated cellular immunity in murine histoplasmosis. Infect Immun 1977; 16: 226-31.
- 36.- Wu-Hsieh B, Howard D H. Inhibition of growth of Histoplasma capsulatum by lymphokine stimulated macrophages. J Immunol 1984; 132: 2593-7.
- 37.- Wu-Hsieh B, Zlotnik A, Howard D H. T-cell hybridoma-produced lymphokine that activates macrophages to suppress intracellular growth of Histoplasma capsulatum. Infect Immun 1984; 43: 380-5.
- 38.- Howard D H and Wu-Hsieh B. Gamma interferon activated intracellular inhibition of Histoplasma capsulatum. Abstracts 9th International Congress ISHAM May.19-29, Atlanta, Georgia USA. 1985; 55-5. Georgia U.S.A.
- 39.- Sánchez S B D, Carbonell L M. Immunological studies in Histoplasma capsulatum. Infect Immun 1975; 11: 387-94.
- 40.- Howard D H. Fate of Histoplasma capsulatum in guinea pig polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun 1973; 8: 412-19.
- 41.- Howard D H. The role of phagocytic mechanisms in defense against Histoplasma capsulatum. In: Mycosis Scientific Publications No. 304. Pan American Health Organization, Washington, D.C. 1975; 50-9.
- 42.- Howard D H. Comparative sensitivity of Histoplasma capsulatum conidiospores and blastospores to oxidative antifungal systems. Infect Immun 1981; 32: 381-7.
- 43.- Howard D H, Dabrowa N. Antifungal systems derived from phagocytic cells. In: Baxter M, ed. Human and animal mycology: proceedings of the 8th Congress of ISHAM, Massey University, Palmerston North, New Zealand. 1982; 82-7.

- 44.- Kamaya T. Lytic action of lysozyme on Candida albicans. Mycopathol Mycol Appl 1970; 42: 197-207.
- 45.- Collins M, Pappagianis D. Effect of lysozyme and chitinase on the spherules of Coccidioides immitis in vitro. Infect Immun 1973; 7: 817-22.
- 46.- Howard D H, Otto V. Protein synthesis by phagocytized yeast cells of Histoplasma capsulatum. Sabouraudia 1969; 7: 186-90.
- 47.- Peterson E M, Calderone R A . Inhibition of specific aminoacid uptake in C. albicans by lysosomal extracts from rabbit alveolar macrophages. Infect Immun 1978; 21: 506-13.
- 48.- Grenson M. Multiplicity of the aminoacid permeases in Sacharomyces cerevisiae II. Evidence for a specific lysine-transporting system. Biochem Biophys Acta 1966; 1270: 339-45.
- 49.- Grenson M, Hou C, Crabbeel M. Multiplicity of the aminoacid permeases in Sacharomyces cerevisiae IV. Evidence for a general aminoacid permease. J Bacteriol 1970; 103: 770-7.
- 50.- Calderone R A, Peterson E M. Inhibition of amino acid uptake and incorporation into Histoplasma capsulatum by lysosomal extract from rabbit alveolar macrophages. J Reticuloendothelial Soc 1979; 26: 11-9.
- 51.- Kimberlin C L, Hariri A R, Hempel H O, Goodman N L. 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 1981; 34: 6-10.
- 52.- Taylor M L, Rico Galindo B, Benítez M T, Díaz Sánchez G, Castro A M, Polito Alarcón G, Toriello C. Infección in vitro de Histoplasma capsulatum en macrofagos peritoneales de ratón. Bol Soc Mex Mic 1984; 19: 327-42.
- 53.- Díaz Sánchez G, Castro A M, Rico Galindo B, Reyes Montes M R, Toriello C, Taylor M L. Fagocitosis de Histoplasma capsulatum. I Congreso Nacional de Micología. 26-30 octubre, Xalapa, Ver. 1982; 52.
- 54.- Castro A M, Benítez M T, Rico Galindo B, Toriello C, Taylor M L. Seguimiento de la fagocitosis in vitro de Histoplasma capsulatum en macrófagos peritoneales de ratón por microscopía electrónica XIV Congreso Nacional de Microbiología. 24-28 abril 1983. Chihuahua, Chih. 1983; 38.
- 55.- Taylor M L, Polito Alarcón G, Castro A M, Espinosa M E, Casasola J, Goodsaid F. Estudio de la fagocitosis de H. capsulatum con macrófagos peritoneales de ratón utilizando técnicas de fluorescencia. V Congreso Nacional de Inmunología. 9-12 octubre 1983; México, D.F. 1983; 66
- 56.- Castro A M, Benítez M T, Polito Alarcón G, Espinosa Schoelly M E, Toriello C, Taylor M L. Fagocitosis de Histoplasma capsulatum: Estudio in vitro. II Reunión de Alumnos de Maestría y Doctorado en Biomedicina. 27-28 octubre. 1983 Palacio de la Antigua Escuela de Medicina, México, D.F. 1983; 16

- 57.- Brown C A, Draper P, D'Arcy-Hart P. Mycobacteria and lysosomes: a paradox. *Nature* 1969; 221: 658-60.
- 58.- Goren M B, D'Arcy-Hart P, Young M R, Armstrong J A. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of Mycobacterium tuberculosis. *Pathology* 1976; 73: 2510-14.
- 59.- Friis R R. Interactions of L cells and Chlamydia psittaci; entry of the parasite and host response to its development. *J Bacteriol* 1972; 111: 706-10.
- 60.- Beaman L, Holmberg C A. In vitro response of alveolar macrophages to infection with Coccidioides immitis. *Infect Immun* 1980; 28: 594-600.
- 61.- Davis Scibienski C, Beaman B L. Interaction of alveolar macrophages with Mycardia asteroides: immunological enhancement of phagocytosis, phagosome-lysosome fusion and microbicidal activity. *Infect Immun* 1980; 30: 578-37.
- 62.- Jones T C, Hirsch J G. The interaction between Toxoplasma gondii and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J Exp Med* 1972; 136: 1173-94.
- 63.- Dumont A, Robert A. Electron microscopic study of phagocytosis of Histoplasma capsulatum by hamster peritoneal macrophages. *Laboratory Invest* 1970; 23: 278-86.
- 64.- Espinosa Schoelly M E, Castro A M, Benítez M T, Polito Alarcon G, Goodsaid F, Toriello C, Taylor M L. Estudio de la relación macrófago Histoplasma capsulatum in vitro. VI Congreso Centroamericano y II Nacional de Microbiología. 5-9 diciembre 1983, Guatemala CA, 1983; C-17.
- 65.- Espinosa Schoelly M E, Goodsaid F, Iturbe Ramírez R, Taylor M L. Fagocitosis de Histoplasma capsulatum: Detección de fusión fagosoma-lisosoma. VI Congreso Nacional de Inmunología. 6-9 octubre 1985. México, D.F. 1985; 060.
- 66.- Von Behren L A, Rabinovich S, Tewari R P. Evaluation of phagosome-lysosome fusion in mouse peritoneal macrophages after exposure to yeast cells of Histoplasma capsulatum. Abstract 9th International Congress of ISHAM, may 19-24 Atlanta Georgia, USA. 1985; R10-4.
- 67.- Ratnoff E D, Pepple J M and Winkelstein J A. Activation of the alternative complement pathway by Histoplasma capsulatum. *Infect Immun* 1980; 30:147-9.
- 68.- Rico Galindo B, Goodsaid F, Casasola J, Taylor M L. Papel de las proteínas membranales de macrófagos en el proceso fagocítico de Histoplasma capsulatum VI Congreso Nacional de Inmunología. 6-9 oct. 1985. México, D.F. 1985;093.

- 69.- Hermans P E, Markowitz H. Serum antibody activity in patients with histoplasmosis as measured by passive hemagglutination. *J Lab Clin Med* 1969; 74: 453-63.
- 70.- Chandler W Jr., Smith T K, Newberry W M Jr., Chin T D Y, Kirkpatrick H. Immunology of the mycoses. II. Characterization of the immunoglobulin and antibody responses in histoplasmosis. *J Infect Dis* 1969; 119: 247-54.
- 71.- Baum G L, Daniel T M, Rice E H. Immunoglobulin characterization of complement fixing antibodies in histoplasmosis infection. *Chest* 1973; 64: 16-21.
- 72.- Taylor M L, Bojalil L F. Inmunología de la histoplasmosis: aislamiento de un complejo polisacárido-proteína con actividad inmuno-específica a partir de *Histoplasma capsulatum*. *Arch Invest Med* 1977; 8: 91-102.
- 73.- Taylor M L, Reyes Montes M R, Lachica A, Eslava Campos C, Olvera J, Maxwell R. Immunology of histoplasmosis. Humoral and cellular activity from a polysaccharide-protein complex and its deproteinized fraction in experimentally immunized mice. *Mycopathologia* 1980; 71: 159-66.
- 74.- Reyes Montes M R, Martínez A, Toriello C, Taylor M L: Antigens from *Histoplasma* and *Blastomyces dermatitidis*. I. Immunological comparative studies from polysaccharide-protein complexes of both fungi. *Mycopathologia* 1982; 78: 17-23.
- 75.- Toriello C, Rosas J L, Martínez A, Reyes Montes M R, Latgé J O, Taylor M L. Biochemical studies of polysaccharide protein antigens from fungi causing systemic mycosis. In: Baxter M, ed. Human and animal mycology; proceedings of the 8th Congress of ISHAM. Massey University, Palmerston North, New Zealand. 1982; 220-4.
- 76.- Becerril M, Acosta G, Casasola J, Rebora Gutiérrez F, Díaz Gómez M L, Velasco Castrejón O, Taylor M L, Toriello C. Investigación de la respuesta inmune a antígenos fúngicos en pacientes de un hospital de enfermedades respiratorias. *Rev Mex Mic* 1985; 1: 211-26.
- 77.- McKelvey E M, Fahey J L. Immunoglobulin changes in disease. Quantitation on the basis of heavy polypeptide chains IgG (γG), IgA (γA) and IgM (γM) and of light polypeptide chains, type K (κ) and type L (λ). *J Clin Invest* 1965; 44: 1778-87.
- 78.- Walter J E. Significance of antibodies in chronic histoplasmosis by immunoelectrophoretic and complement fixation test. *Am Rev Respir Dis* 1969; 99: 50-8.
- 79.- Cox R A. Immunologic studies of patients with histoplasmosis. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120: 143-9.
- 80.- Cox R A, Douglas A R. Immunoglobulin E in histoplasmosis. *Infect Immun* 1980, 29: 290-3.

- 81.- Grappel S F, Calderone R A. Effect of antibodies on the respiration and morphology of Candida albicans. Sabouraudia 1976; 14: 51-60.
- 82.- Sutcliffe M C, Savage A S, Alford R H. Transferrin- dependent growth inhibition of yeast-phase Histoplasma capsulatum by human serum and lymph. J Infect Dis 1980; 142: 209-19.
- 83.- Hughes W T, Smith J S, Hikim M. Suppression of the histoplasmin reaction with measles and smallpox vaccines. Am J. Dis Child 1968; 116: 402-6
- 84.- Artz R P, Bullock W E. Immunoregulatory responses in experimental disseminated histoplasmosis: lymphoid organ histopathology and serological studies. Infect Immun 1979; 23: 884-92.
- 85.- Artz R P, Bullock W E. Immunoregulatory responses in experimental disseminated histoplasmosis: Depression of T-cell dependent and T-effector responses by activation of splenic suppressor cells. Infect Immun 1979; 23:893-902.
- 86.- Tewari R P, Khardori N, McConnachie P, VonBehren L A, Yamada T. Blastogenic responses of lymphocytes from mice immunized by sublethal infection with yeast cells of Histoplasma capsulatum. Infect Immun 1982; 36: 1013- 8.
- 87.- Nickerson D, Fairclough P; Immune responsiveness following intratracheal inoculation with Histoplasma capsulatum yeast cells. Clin Exp Immunol 1984;56: 337-44.
- 88.- Schaefer J, Saslaw S. Some factors affecting resistance of mice to experimental histoplasmosis. Proc Soc Exp Biol Med 1954; 85: 223-5.
- 89.- Saslaw S, Schaefer J. Relation of sex and age to resistance of mice to experimental Histoplasma infections . Proc Soc Exp Biol Med 1955; 90: 400-2.
- 90.- Salvin S B. Immunization of mice against Histoplasma capsulatum. J Immunol 1953; 70: 267-70.
- 91.- Salvin S B. Resistance to reinfection in experimental histoplasmosis. J Immunol 1955; 74: 214-21.
- 92.- Salvin S B. Further studies on immunization of mice against Histoplasma capsulatum. Am J Hyg 1955; 61: 72-81.
- 93.- Salvin S B. Resistance of animals and man to histoplasmosis. In: Sweany H C, ed. Histoplasmosis. Charles B. Thomas Springfield, Illinois. 1960; 99-112.
- 94.- Olson L, Claesson M H. Studies on subpopulations of theta bearing lymphoid cells. Nature New Biol 1973; 244: 50-1
- 95.- Barthold D R, Kysela S, Steinberg A D. Decline in suppressor T cell function with age in female NZB mice. J Immunol 1974; 112: 9-16.
- 96.- Brennan P C, Jorosiow S N. Age associated decline in theta antigens on spleen-thymus-derived lymphocytes of B6CF mice. Cell Immunol 1975; 15: 51-6.

- 97.- Segre M, Segre D. Humoral immunity in aged mice. I. Age-related decline in the secondary response to DNP of spleen cells propagated in diffusion chambers. *J. Immunol* 1976; 116: 731-4.
- 98.- Segre D, Segre M. Humoral immunity in aged mice. II. Increased suppressor T cell activity in immunologically deficient old mice. *J Immunol* 1976; 116: 735-8.
- 99.- Makinodan T, Albright J W, Good P I, Peter C P, Heidrick M L. Reduced humoral immune activity in long-lived old mice: an approach to elucidating its mechanisms. *Immunology* 1976; 31: 903-11.
- 100.- Skowron-Cendrzak A, Plak W. Suppression of local graft-versus host reactions by mouse fetal and newborn spleen cells. *Eur J Immunol* 1976; 6: 451-2.
- 101.- Krogsrud R L, Perkfus E H. Age-related changes in T-cell function. *J Immunol* 1977; 118: 1607-11.
- 102.- Mosier D E, Mathieson B J, Campbell P S. Ly phenotype and mechanism of action of mouse neonatal suppressor T cells. *J Exp Med* 1977; 146: 56-73.
- 103.- Argyris B F. Suppressor activity in the spleen of neonatal mice. *Cell Immunol* 1978; 36: 354-62.
- 104.- Myrgita R A, Goidl E A, Kontiainen S, Beverley P C L, Wigzell H. Adult murine T cells activated *in vitro* by α -fetoprotein and naturally occurring T cells in newborn mice: identity in function and cell surface differentiation antigens. *Proc Nat Acad Sci* 1978; 75: 2897-2904.
- 105.- Callard R E. Immune function in aged mice. III. Role of macrophages and effect of 2-mercaptoethanol in the response of spleen cells from old mice to phytohemagglutinin, lipopolysaccharide and allogeneic cells. *Eur J Immunol* 1978; 8: 697-705.
- 106.- Rodríguez G, Anderson G, Wigzell H, Peck A B. Non-T-cell nature of the naturally occurring spleen-associated suppressor cells present in the newborn mouse. *Eur J Immunol* 1979; 9: 737-46.
- 107.- Taylor M L, Reyes Montes M R, González G R, Casasola J, Hernández Ramírez A. Immune response changes with age and sex as factors of variation in the resistance to *Histoplasma* infection. In: Baxter M, ed. *Human and animal mycology: proceedings 8th Congress of ISHAM*. Massey University, Palmerston North, New Zealand, 1982; 260-264.
- 108.- Reyes Montes M R, Casasola J, Elizondo N E, Taylor M L. Relationship between age and cellular suppressive activity in resistance to *Histoplasma capsulatum* infection. *Sabouraudia J Med Vet Mycol* 1985; 23: 351-60.
- 109.- Kenny F G, Gray A J. Sex differences in immunological response studies of antibody production by individual spleen cells after stimulus with *Escherichia coli* antigen. *Pediat Rev* 1971; 5: 246-55.

- 110.- Eidinger D, Garret T J. Studies in the regulatory effects of sex hormones on antibody formation and stem-cell differentiation. J Exp Med 1972; 136: 1098-1116.
- 111.- Kittas C, Henry L. Effect of sex hormones on the response of mice to infection with Toxoplasma gondii. Br J Exp Path 1980; 61: 590-600.
- 112.- Kotani M, Nawa Y, Fujii H. Inhibition by testosterone of immune reactivity and of lymphoid regeneration in irradiated and marrow reconstituted mice. Experientia 1974; 30: 1343-5.
- 113.- Dobson E L, Kelly L S. The combined stimulation of the reticuloendothelial system by estradiol and exotoxin. J Reticuloendoth Soc 1973; 13: 61.
- 114.- Noble W C, Midgley G. Scalp carriage of Pityrosporum species: the effect of physiological maturity, sex and race. Sabouraudia 1978; 16: 229-32.
- 115.- Muchmore H G, Scott E N, Felton F G, Fromtling R A. Sex differences in the virulence of C. neoformans for adult mice. In: Baxter M, ed. Human and animal mycology: proceedings 8th Congress of ISHAM. Massey University - Palmerston North, New Zealand 1982; 152-5.
- 116.- Drutz D J, Huppert M, Sun S H, McGuire W L. Human sex hormones stimulate the growth and maturation of Coccidioides immitis. Infect Immun 1981; 32: 897-907.
- 117.- Nickerson D A, Havens R A, Bullock W E. Immunoregulation in disseminated histoplasmosis: characterization of splenic suppressor cell populations. Cell Immunol 1981; 60: 287-97.
- 118.- Watson S R, Bullock W E. Immunoregulation in disseminated histoplasmosis: characterization of the surface phenotype of splenic suppressor T lymphocytes. Infect Immun 1982; 37: 940-5.
- 119.- Deepe Jr G S, Kravitz G R, Bullock W E. Pharmacological modulation of - suppressor cell activity in mice with disseminated histoplasmosis. Infect Immun 1983; 41: 114-20.
- 120.- Deepe Jr G S, Watson S R, Bullock W E. Cellular origins and target cell of immunoregulatory factors in mice with disseminated histoplasmosis. J Immunol 1984; 132: 2064-71.
- 121.- Couch J R, Abdow N I, Sagawa A. Histoplasma meningitis with hyperactive suppressor T cells in cerebrospinal fluid. Neurology 1978; 28: 119-23
- 122.- Bullock W E, Artz R P, Bhatena D and Tung K S K. Histoplasmosis: Association with circulating immune complexes, eosinophilia and mesangio- phatic glomerulonephritis. Arch Int Med 1979; 139: 700-2.

- 123.- Cunningham D S, Kuhn R E. *Trypanosoma cruzi* induced suppressor substances. II. Regulatory activity. *Immunogenetics*. 1980; 10: 557-72.
- 124.- Warren H S, Heidanz W B. Malarial immunodepression *in vitro*: adherent spleen cells are functionally defective as accessory cells in the response to horse erythrocytes. *Eur J Immunol* 1976; 6: 816-19.
- 125.- Patino M M, Graybill J R. Histoplasmosis in beige (bg/bg) mice. Abstracts 9th International Congress of ISHAM. Atlanta, Georgia USA. 1985; R4-6.
- 126.- Shigematsu M L, Lower F E, Tewari R P. Characterization of murine natural killer (NK) cell activity against yeast cell of *Histoplasma capsulatum*. Abstracts 9th International Congress of ISHAM. Atlanta, Georgia, USA. 1985; R10-3.
- 127.- Uhr J W, Bauman J B. Antibody formation. I. The suppression of antibody formation by passively administered antibody. *J Exp Med* 1961; 113: 935-57.
- 128.- Uhr J W, Moller G. Regulatory effect of antibody on the immune response. *Adv Immunol* 1968; 8: 81-127.
- 129.- Sy M S, Bach B A, Dohi Y, Nisonoff A, Benacerraf B, Greene M I. Antigen and receptor driven regulatory mechanisms. I. Induction of suppressor T cells with anti-idiotypic antibodies. *J Exp Med* 1979; 150: 1216-28.
- 130.- Yamamoto H, Katz D H. Effective suppression of hapten-specific delayed-type hypersensitivity (DTH) responses in mice by anti-idiotypic antibodies. In: Bach F H, Bonavida B, Vitetta E S, Fox C F, eds. T and B lymphocytes: Recognition and function. ICN. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. Vol. XVI. Academic Press. New York, 1979; 305-15.
- 131.- Neveu P J, Micusan V V, Fafard A, Borduas A G. Modulation of the immune response by passive antibodies. IV Effects of IgG₁ and IgG₂ anti-hapten antibodies. *Immunology*. 1978; 35: 129-32.
- 132.- Newberry Jr W M, Chandler Jr J W, Chin T D Y, Kirkpatrick C H. Immunology of the mycoses. I. Depressed lymphocyte transformation in chronic histoplasmosis. *J Immunol* 1968; 100: 436-43.
- 133.- Amil-Estrada E, Velasco Castrejon O, Estrada-Parra S. Aspecto inmunológico de la histoplasmosis pulmonar primaria. Resumen I Congreso Nacional de Inmunología, Oaxtepec, Mor. México. 1976; 52.
- 134.- Taylor M L, Eslava-Campos C, Hernández R A. Relation between cellular and humoral immune response in mice immunized with *Histoplasma capsulatum*. In: Kuttin E S, Baun G L, eds. Human and animal mycology: proceedings 7th Congress of ISHAM. Jerusalem, Israel. March 11-10, 1979. New York: Elsevier/North Holland, 1980; 97-101

- 135.- Taylor M L, Díaz S, González P A, Sosa A C, Toriello C. Relationship between pathogenesis and immune regulation mechanisms in histoplasmosis: A hypothetical approach. *Rev. Infect Dis* 1984; 6:775-82.
- 136.- Taylor M L, Hernández A, Elizondo N, Casasola J, Reyes Montes M R, Acosta G. Changes in the cellular immune response to murine histoplasmosis induced by antibody. *J Infect Dis* .Enviado a publicación.
- 137.- Taylor M L, Mejía López H, Vaca García O, Reyes Montes M R, Rubio Monteverde H, Villalba Caloca J, Cruz Chávez A, Cristerna Aguirre J M. Inmunorregulación de infecciones intracelulares. Papel de los anticuerpos en los modelos: tuberculosis e histoplasmosis. *Neumol Cir Torax Mex* 1984; 45:32-6.
- 138.- Heilman D H, Mc Farland W. Inhibition of tuberculin- induced mitogenesis in cultures of lymphocytes from tuberculous donors. *Int Arch Allergy* 1966; 30: 58-66.
- 139.- Potts R C, Sherif M M, Robertson A J, Gibbs J H, Brown R A, Swanson Beck J. Serum inhibitory factor in lepromatous leprosy: Its effect on the pre-S-phase cell cycle kinetics of mitogen stimulated normal human lymphocyte. *Scand J Immunol* 1981; 14: 269-00.
- 140.- Salazar Acosta C. Los anticuerpos como posible inmunomoduladores en la lepra. Tesis de post-grado en Dermatología, Leprología y Micología. Centro Dermatológico Pascua, S.S. A.N.A.L.A.C. México, D.F. Noviembre, 1983.
- 141.- Opeiz G, Scheer M I. Cutaneous sensitivity and *in vitro* responsiveness of lymphocytes in patients with disseminated coccidioidomycosis. *J Infect Dis* 1975; 32: 250-5.
- 142.- Musatti C C, Rezcallah M T, Mendez E, Mendez N F. *In vivo* and *in vitro* evaluation of cell mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cell Immunol* 1976; 24: 365-70.
- 143.- Ford W H, Caspary W A, Shenton B. Purification and properties of a lymphocyte inhibition factor from human serum. *Clin Exp Immunol* 1973; 15: 169-79.
- 144.- Glasgow A H, Nimberg R B, Menzies J O, Saporoschetz I, Cooperband S R, Schmid K, Mannick J A. Association of anergy with an immunosuppressive peptide fraction in the serum of patients with cancer. *N Engl J Med* 1974; 291: 1263-7.
- 145.- Mortensen R F, Gsmann A P, Gewurz H. Effects of C-reactive protein on the lymphoid system. I. Binding to thymus dependent lymphocytes and alteration of their functions. *J Exp Med* 1975; 141: 821-39.
- 146.- Hureita R A, Tomasi Jr T D. Suppression of the immune response by α -fetoprotein II The effect of α -fetoprotein on mixed lymphocyte reactivity and mitogen - induced lymphocyte transformation. *J Exp Med* 1975; 141: 269-86.

- 147.- Sjogren H O, Hellstrom I, Dansal S C, Hellstrom K E. Suggestive evidence that the "blocking antibodies" of tumorbearing individuals may be antigen antibody complexes. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1971; 68: 1372-5.
- 148.- Rojas- Espinosa O, Aguilar-Santelises M, Garcia G J E, Díaz Gómez M L, Zenteno-Morales A, Gutiérrez-Iñaro R M, Padilla-Serpa L A. Presence of circulating immune complexes in far advanced tuberculosis as detected by a complement consumption test. Abstracts 4th National Congress of Immunology and International Symposium on Immunobiology of Infectious and Parasitic Diseases, Oaxtepec, México. 1981; 139
- 149.- Moran C J, Ryder G, Turk J L, Waters M F R. Evidence for circulating immune complexes in lepromatous leprosy. *Lancet* 1972; 2: 572-3.
- 150.- Bjorvatn B, Barnetson R S, Kronvall G, Zubler R H, Carbert P H. Immune complexes and complement hypercatabolism in patients with leprosy. *Clin Exp Immunol* 1976; 26: 388- 96.
- 151.- Yoshinoya S, Cox R A, Pope R M. Circulating immune complexes in coccidioidomycosis. Detection and characterization. *J Clin Invest* 1980; 66: 655-63.
- 152.- Rosenthal A S, Lipsky P E, Sevach E M. Macrophage lymphocyte interaction and antigen recognition. *Fed Proc* 1975; 34: 1743-8.
- 153.- VonBoehmer H. Expression of receptor diversity in T lymphocytes In: Fougereau M, Dausset J, eds. *Immunology 80. Progress in immunology IV*. New York. Academic Press. 1980; 113-21.
- 154.- Wigzell H, Binz H. Lymphocytes receptors. In: Fougereau M, Dausset J, eds. *Immunology 80. Progress in immunology IV*. New York. Academic Press. 1980; 94-104.
- 155.- Okumura K, Takemori T, Tokuhisa T, Tada T. Specific enrichment of suppressor T cell bearing I-J determinants. *J Exp Med* 1977; 146: 1234-45.
- 156.- Pierre A, Bromberg S, Sy M S, Benacerraf B, Greene M I. Mechanism of regulation of cell mediated immunity. VI. Antigen density dependence of the induction of genetically restricted suppressor cell. *J Immunol* 1980; 124: 343-B.
- 157.- Gershon R K. Suppressor T cells; a mini-position paper celebrating a new decade In: Fougereau M, Dausset J, eds. *Immunology 80. Progress in immunology IV*. New York. Academic Press. 1980; 375-88.
- 158.- Hoffman M K. Antibody regulates the cooperation of B cells with helper cells. *Immunol Rev* 1980; 49: 79-91.
- 159.- Fitch F W. Selective suppression of immune response. *Progr Allergy* 1975; 19: 195-244.

- 160.- Jerne H K. Towards a network theory of the immune systems. *Ann Immunol Inst Pasteur* 1974; 125C: 373-89.
- 161.- Rodkey S L. Autoregulation of immune response via idiotype network interactions. *Microbiol Rev.* 1980; 44: 631-59.
- 162.- Mckearn T J, Stuart F P, Fitch F W. Anti-idiotypic antibody in rat transplantation immunity. *J Immunol* 1974; 113: 1876-82.
- 163.- Binz H, Wigzell H. Shared idiotypic determinants on B and T lymphocytes reactive against the same antigenic determinants. I. Demonstration of similar or identical idiotypes on IgG molecules and T cell receptor with specificity for the same receptor alloantigens. *J Exp Med* 1975; 142: 197- 211.
- 164.- Eichmann K, Rajewsky K. Induction of T and B cell immunity by anti-idiotypic antibody. *Eur J Immuno* 1975; 5: 661-6.
- 165.- Eichmann K. Idiotypic suppression. II Amplification of a suppressor T cell with anti-idiotypic activity. *Eur J Immunol* 1975; 5: 511-7.
- 166.- Informe del Grupo Científico de la OMS. Acción patogena de los complejos inmunitarios. Ginebra. 1977; 3-63.
- 167.- Binz H, Linenmann J. Inhibition of local graft-versus-host reaction by anti-alloantibodies. *Nature* 1973; 246: 146-8.
- 168.- Mckearn T J. Antireceptor antiserum causes specific inhibition of reactivity to rat histocompatibility antigens. *Science* 1974; 183: 94-6.
- 169.- Colizzi V, Giuntini M, Garzelli C, Campa M, Falcone G. Auto anti-idiotypic antibodies inhibit T cell mediated hypersensitivity in BCG infected mice. *Cell Immunol* 1983; 80: 205-10.
- 170.- Sy M S, Bach B A, Brown A, Nizonoff A, Benacerraf B, Greene M I. Antigen and receptor driven regulatory mechanisms. II. Induction of suppressor T cells with idiotype - coupled syngeneic spleen cell. *J Exp Med* 1979; 150: 818-29.
- 171.- Sy M S, Moorhead J H, Clanton H N. Regulation of cell mediated immunity by antibodies: possible role of anti-receptor antibodies in the regulation of contact sensitivity to DNFB in mice. *J Immunol* 1979; 123: 2593-8.
- 172.- Sy M S, Brown A R, Benacerraf B, Greene M I. Antigen and receptor driven regulatory mechanism III Induction of delayed type hypersensitivity to azobenzeneearsonate with anti-cross reactive idiotypic antibodies. *J Exp Med* 1980; 151: 896-909.
- 173.- Sy M S, Dietz M H, Germain R N, Benacerraf B, Greene M I. Antigen and receptor driven regulatory mechanisms. IV. Idiotype bearing I-J⁺ suppressor T cell factors induce second order suppressor T cell which express anti-idiotypic receptor *J Exp Med* 1980; 151: 1183-95.

- 174.- Pawlak LL, Hart D A, Hisonoff A. Requeriment for prolonged suppressive of an idiotypic specificity in adult mice. J Exp Med 1973; 137: 1142-50.
- 175.- Kohler H, Richardson B C, Rowley D A, Smyr S. Immune response to phosphorylcholine. III Requeriment of the Fc portion and equal efectiveness of IgG subclasses in anti-receptor antibody-induced suppression. J Immunol 1977; 126: 233-8.
- 176.- Moretta L, Mingari M C, Moreta A, Haynes B F, Fanci A S. T cell Fc receptors as markers of funtional human lymphocyte subsets. In: Fougereaud M, Dausset J, eds. Immunology 80. Progress in immunology VI. New York. Academic Press. 1980; 228-30.
- 177.- Hayward A R, Layward L L, Moretta L, Dane I N, Lowton A R. Fc receptor heterogeneity of human suppressor T cells. J Immunol 1978; 121: 1-5.

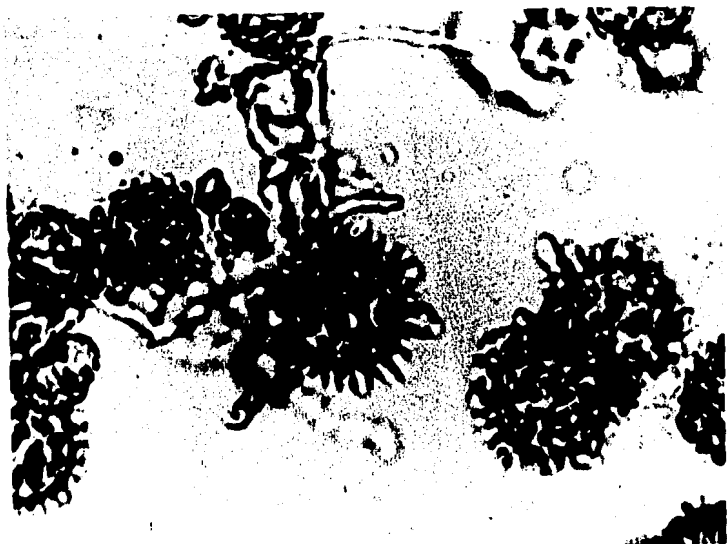


FIG. 1. FASE MICELIAL DE Histoplasma capsulatum. El hongo fué cultivado en medio de agar cerebro corazón a temperatura de 25°C. Se observan las macroconidias espiculadas de H. capsulatum

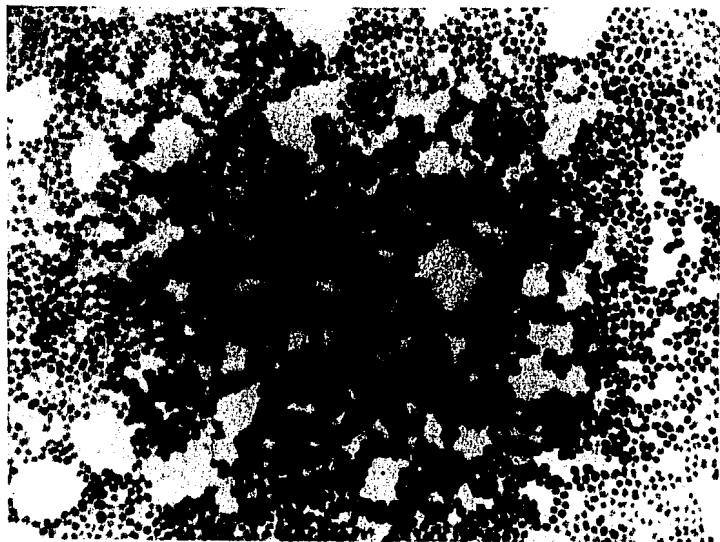


FIG. 2. FASE LEVADURIFORME DE *H. capsulatum*. Las levaduras fueron obtenidas por cultivo del hongo en medio de infusión cerebro corazón suplementado con cisteína y glucosa, seguida de incubación a 37°C. Para su observación las levaduras fueron teñidas con Wright (1250 x).

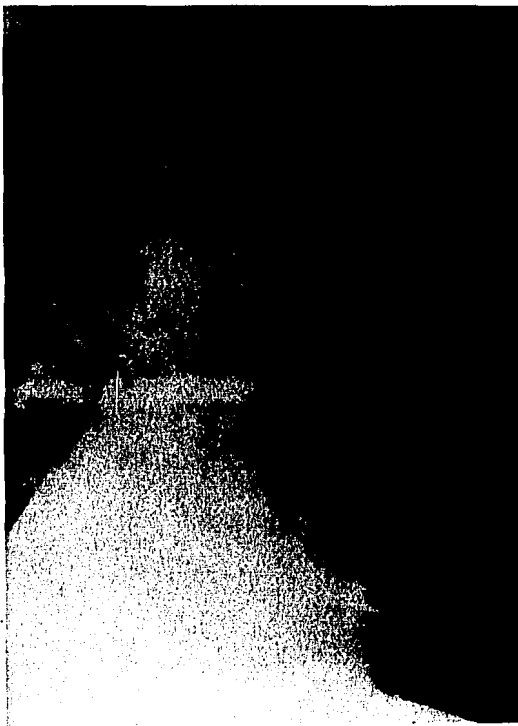


FIG. 3.- RADIOGRAFIA DE UNA HISTOPLASMOSIS PULMONAR CRONICA GRAVE.
Se observa lesión cavitaria encapsulada.

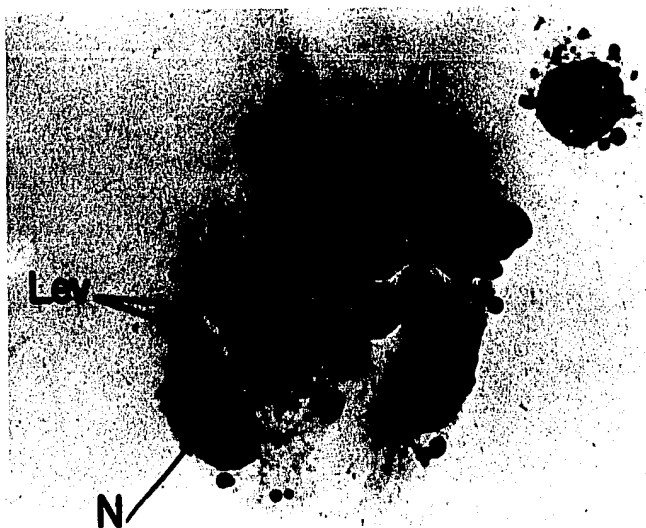


FIG. 4. MACROFAGO PARASITADO CON LEVADURAS DE Histoplasma capsulatum. Se obtuvieron los macrófagos de exudado peritoneal de ratón y se cultivaron a 37°C en medio de RPMI-1640 suplementado con suero fetal de ternera, piruvato, L-glutamina y antibióticos durante 24 hrs. Posteriormente se infectaron con levaduras de H. capsulatum. Después de 24 hrs de fagocitosis, las células se fijaron y tñieron con Wright (1250 x). Lev. - levadura; N - núcleo.



FIG. 5.- MICROFOTOGRAFIA ELECTRONICA DE MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON A LOS 5 MINUTOS DE UNA INFECCION CONTINUA CON HISTOPLASMA. Se observa ausencia de células del hongo.



FIG. 6.- MICROFOTOGRAFIA ELECTRONICA DE MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON A LAS 24 HRS DE UNA INFECCION CONTINUA CON HISTOPLASMA. Se identifica la ingestión de una hifa (parte miceliana) y levaduras en diferentes etapas de digestión en las vesículas fagocíticas.

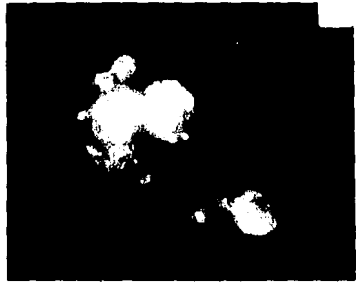
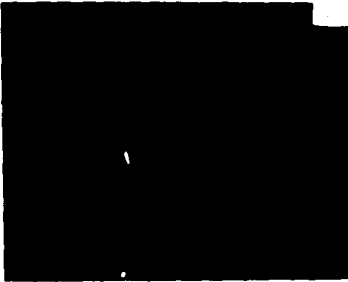
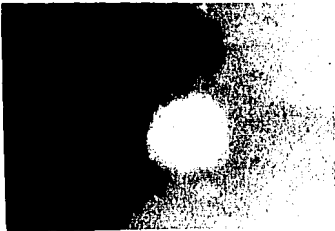


FIG. 7.- SECUENCIA FOTOGRAFICA DE LA FAGOCITOSIS DE Mycobacterium tuberculosis Y DE LEVADURAS DE Histoplasma MARCADOS CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCINA. A) Macrófagos solos; B) M. tuberculosis- 30 min de fagocitosis; C) H. capsulatum - 30 min de fagocitosis; D) M. tuberculosis 24 hrs de fagocitosis; E) H. capsulatum - 24 hrs de fagocitosis.

RELACION Mf / P
 TIEMPO DE INFECCION

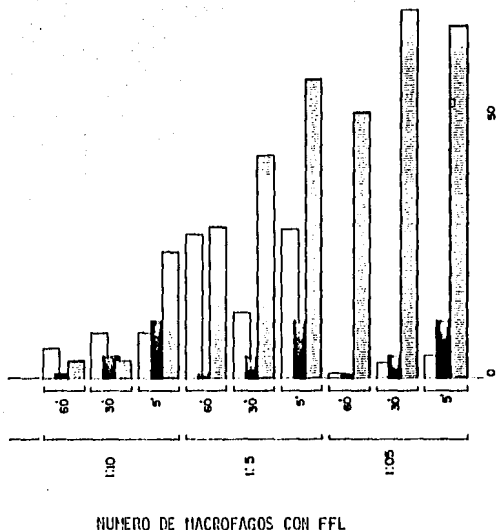


FIG. 8.- NUMERO DE MACROFAGOS CON FUSION FAGOSOMA-LISOSOMA (FFL) SEGUN LA DOSIS Y EL TIEMPO DE INFECCION. Macrófagos peritoneales de ratón BALB/c cultivados en RPMI- suplementado con suero, L-glutamina, piruvato y HEPES fueron marcados con naranja de acridina (5 µg/ml de RPMI pH 7.0). La infección se procedió sincronizando la adhesión de los parásitos a 4°C 1 h. Las dosis de infección fueron: 1×10^6 Mf/ 5×10^5 P; 1×10^6 Mf/ 5×10^6 P y 1×10^6 Mf/ 10×10^6 P. De cada tiempo y dosis de infección se contaron 100 macrófagos (■) Mf infectados con *H. capsulatum*; (■) Mf infectados con *M. tuberculosis* (cepa de referencia); (▨) Mf sin infectar. Mf= macrófago; P= parásito.

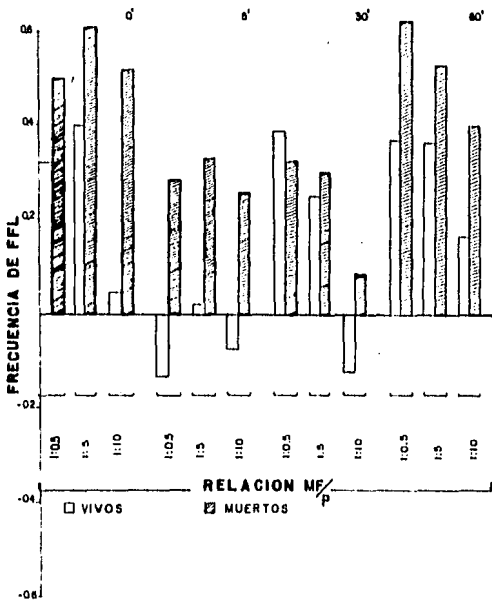


FIG. 9.- FRECUENCIA DE FUSION FAGOSOMA-LISOSOMA (FFL) EN MACROFAGOS FAGOCITANDO LEVADURAS VIVAS O MUERTAS. Macrófagos de la línea celular J774.2 cultivados en medio de Dulbecco modificado enriquecido con suero fetal de ternera, fueron puestos a fagocitar diferentes dosis del hongo, sincronizando la adhesión a 4°C por 1 h. Los macrófagos fueron previamente marcados con naranja de acridina (NA) y las frecuencias de FFL fueron calculadas según la fórmula A-B/C; donde A = No. de marcas fluorescentes por 100 macrófagos teñidos con NA y puestos a fagocitar el hongo en un tiempo X; B = No. de marcas fluorescentes por 100 macrófago teñidos con NA y sin fagocitar en un tiempo X; C = No. de levaduras adheridas por 100 macrófago sin NA en el tiempo X; Mf = macrófagos; P = parásito; X = tiempo de fagocitosis de 5', 30' y 60'. Los resultados expresan el promedio de 3 experimentos.

FRECUENCIA DE FFL

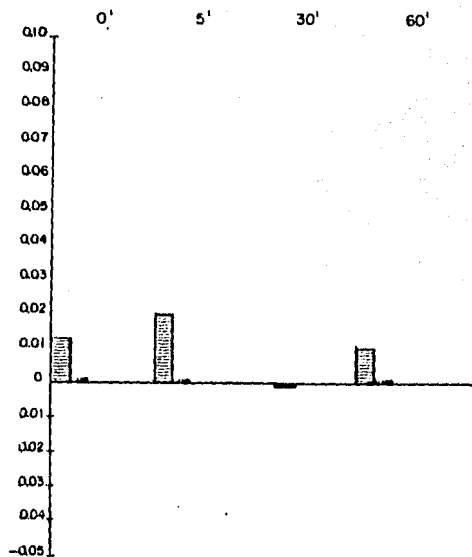


FIG. 10.- FRECUENCIA DE FUSION FAGOSOMA-LISOSOMA (FFL) EN MACROFAGOS INFECTADOS CON CEPAS DE HISTOPLASMA CON DISTINTOS GRADOS DE VIRULENCIA. Los macrófagos tratados con naranjina fueron infectados sincronizando la adhesión de los parásitos a 4°C por 1 h. Se utilizó una relación Mf/P de $1 \times 10^6/5 \times 10^6$. Para obtener los valores de frecuencia de FFL se aplicó la fórmula descrita en la figura 9. ■ Mf infectados con cepa de menor virulencia de *H. capsulatum* (No. 5037). □ Mf infectado con cepa de mayor virulencia de *H. capsulatum* (León Pérez).

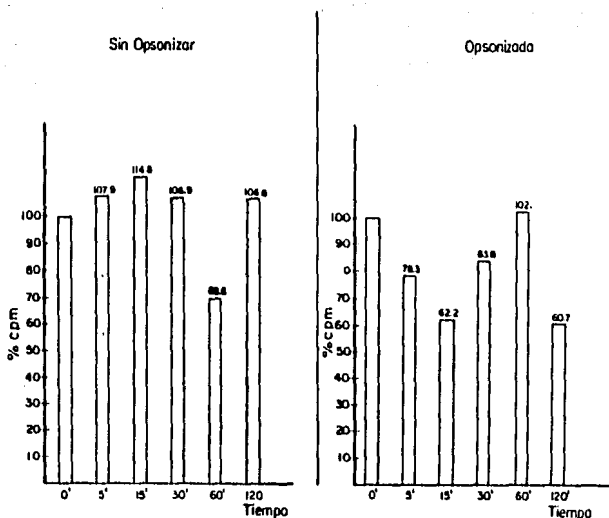


FIG. 11.- MOVILIZACIÓN DE PROTEINAS DE MEMBRANA DE MACROFAGOS POR LA INFECCION IN VITRO CON *Histoplasma capsulatum*. Se utilizaron macrófagos (1×10^6) de la línea celular J-774.2. Las levaduras (5×10^7) de *Histoplasma* (cepa 5037) se opsonizaron con IgG - anti-*Histoplasma* purificada por cromatografía de afinidad. La movilización de las proteínas macrófágicas se hizo por incorporación de 125 I utilizando la técnica de lactoperoxidasa y corrigiendo las cuentas totales en función de la cantidad de macrófagos determinada por incorporación de timidina H^3 .

DL 50-45 DIAS POST-INFECCION

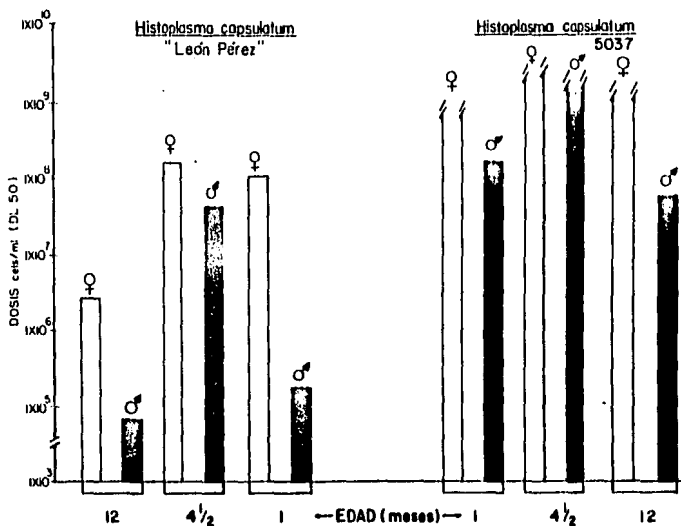


FIG. 12.- DISTRIBUCION GRAFICA DE LA DL₅₀ CON CEPAS DE *Histoplasma capsulatum* EN RATONES BALB/c. Se trabajó con ratones singénicos machos y hembras de diferentes edades; las cepas de *Histoplasma* fueron mantenidas en fase levaduriforme a 37° C en medio de BHI enriquecido con L-cisteína y glucosa. Para la determinación de la DL₅₀ se utilizó el método de Reed & Muench.

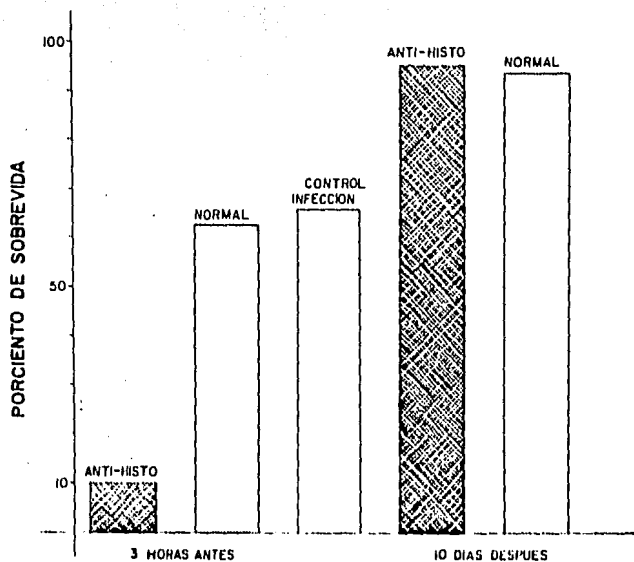





FIG. 13.- EFECTO DE LA TRANSFERENCIA PASIVA DE ANTICUERPOS ANTI-Histoplasma EN LA RESISTENCIA A LA INFECCION HISTOPLASMOSA. Se infectaron ratones machos adultos de la cepa singénica BALB/c con una dosis subletal de levaduras del hongo. Se transfirió suero anti-Histoplasma o suero normal 3 hrs antes o 10 días después de la infección. Se determinó la sobrevivencia de los animales.  suero anti-Histoplasma;  suero normal;  control de infección sin transferencia de suero.

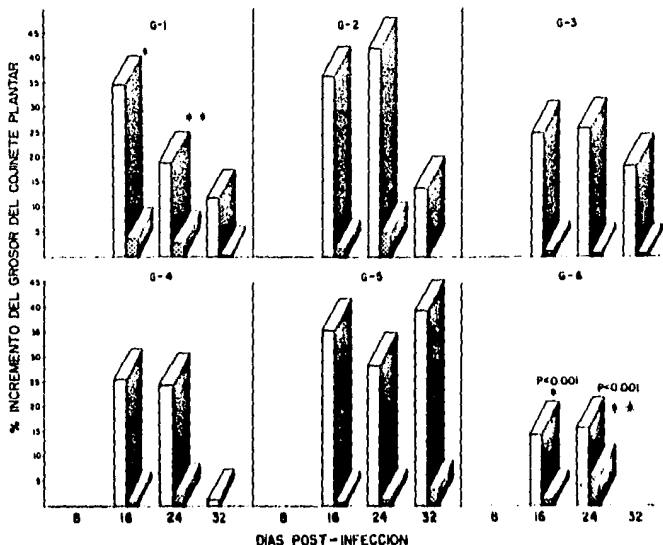
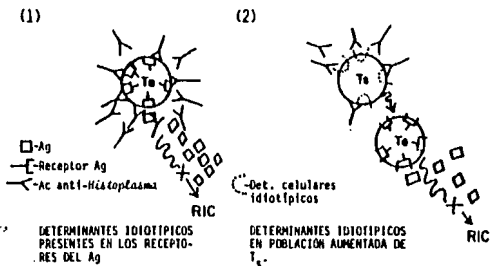


FIG. 14.- EFECTO DE LA TRANSFERENCIA PASIVA DE ANTICUERPOS EN LA HIPERSENSIBILIDAD TARDIA DE RATONES INFECTADOS CON *Histoplasma capsulatum*. Se transfirieron a grupos de ratones singénicos BALB/c anticuerpos a los 10 días después de la infección con el hongo. Se midió la hipersensibilidad tardia por la prueba de hinchazón del cojinete, - plantar utilizando la histoplasmina (30 ug proteína/ 0,05 ml) como antígeno de desafío. Se formaron seis grupos de transferencia a saber; G-1 control de infección sin transferencia; G-2 suero anti-Histoplasma; G-3 suero normal; G-4 suero anti-Histoplasma precipitado con sulfato de amonio; G-5 suero anti-*Mycobacterium* precipitado por cromatografía de afinidad, G-6 IgG anti-Histoplasma purificada por cromatografía de afinidad. Las proyecciones en perspectiva control sin infección. Las proyecciones en perspectiva representan la desviación standar. * ratones infectados; ** control sin infección.

POSIBLES MODELOS DE INTERFERENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI- *Histoplasma*
EN LA RESPUESTA CELULAR.

(A) POR EFECTO ANTI-IDIOTIPO- LOS ANTICUERPOS ANTI- *Histoplasma*
TIENEN REACCIÓN CRUZADA CON IDIOTIPOS PRESENTES EN LINFO-
CITOS.

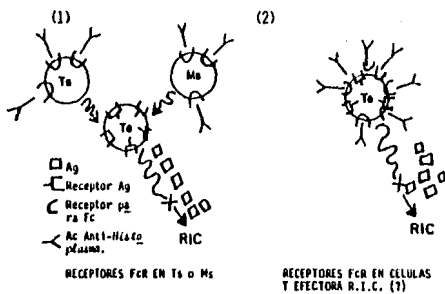


Abreviaturas: T_c = Célula T efectora de la respuesta celular; T_s = Célula T supresora.
RIC = Respuesta Inmune Celular.

FIG.15.- MODELO TEORICO DE LA ACCION DE LOS ANTICUERPOS SOBRE LA
RESPUESTA CELULAR EN LA HISTOPLASMOSIS. PARTE (A).

POSIBLES MODELOS DE INTERFERENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-Histoplasma EN LA RESPUESTA CELULAR.

(B) A TRAVÉS DE LOS SITIOS DE RECONOCIMIENTO PARA FcR DE LOS ANTICUERPOS ANTI-Histoplasma EN SUPERFICIES CELULARES.



Abreviaturas: Tc= Célula T efectora de la respuesta celular; Ts= Célula T supresora;
 Ms= Macrófago con actividad supresora.
 RIC= Respuesta Inmune Celular.

FIG. 16.- MODELO TEORICO DE LA ACCION DE LOS ANTICUERPOS SOBRE LA RESPUESTA CELULAR EN LA HISTOPLASMOSIS. PARTE (B).

TABLA 1.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD DE ANTIGENOS CRUDOS Y PURIFICADOS DE Histoplasma EN LA REACCION DE FIJACION DEL COMPLEMENTO FRENTE A - SUEROS DE PACIENTES CON HISTOPLASMOSIS Y COCCIDIOIDOMICOSIS.

SUERO	Títulos RFC 75 ug proteína/ml del antígeno				Títulos RFC 100 ug proteína/ml del antígeno			
	HP	CPP	CPPD	CD	HP	CPP	CPPD	CD
SH ₁	1:4	1:4	1:128	1:8	1:64	1:32	1:32	1:2
SH ₂	-	1:2	1:2	-	1:2	1:2	1:2	-
SH ₃	1:8	1:16	1:8	1:4	N O R E A L I Z A D O			
SH ₄	1:512	1:64	1:16	1:256	1:4096	1:4096	1:1024	1:8
SH ₅	1:2	1:32	1:16	1:2	1:8	1:8	1:16	1:2
SH ₆	1:4	1:16	1:4	-	1:8	1:4	1:8	1:2
SH ₇	1:8	-	1:16	1:4	1:8	1:4	1:16	1:4
SH ₈	1:2	-	1:4	1:2	-	-	1:4	-
SH ₉	1:4	1:2	1:2	1:8	1:2	1:2	1:2	-
SH ₁₀	1:16	1:8	1:16	1:8	1:16	-	1:16	1:8
SH ₁₁	1:2	1:2	1:2	1:2	1:4	-	1:4	-
SH ₁₂	1:2	-	1:2	-	1:8	1:8	1:8	1:16
SH ₁₃	N O R E A L I Z A D O				1:2	1:2	1:4	-
SC ₁	1:16	1:16	1:16	1:64	1:32	1:128	1:8	1:64
SC ₂	1:2	-	-	1:8	1:128	1:4	1:4	1:64
SC ₃	1:8	1:2	-	1:16	-	-	-	1:128
SC ₄	1:8	1:4	1:4	1:512	1:8	1:8	1:2	1:512
SC ₅	1:4	1:2	-	1:8	-	-	-	1:2
SC ₆	-	-	-	1:2	1:2	-	-	1:2
SC ₇	-	-	-	1:4	1:2	-	-	1:8
SC ₈	1:2	-	-	1:8	N O R E A L I Z A D O			
SN (1 a l 10)	N E G A T I V O				N E G A T I V O			

RFC- Reacción fijación del complemento 50% de hemólisis. SH - suero de histoplasmosis; SC- suero de coccidioidomicosis. HP- histoplasmina, CPP - complejo polisacárido proteína de Histoplasma, CPPD - complejo polisacárido proteína desproteínizado por pronasa y Sevag de Histoplasma; CD- coccidioidina.

TABLA 2.- COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE ANTIGENOS CRUDOS Y PURIFICADOS DE Histoplasma Y Blastomyces POR LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION

TIPO SUERO	TITULOS HEMAGLUTINANTES			
	Histoplasmina 51.3 ug/ml prot.	CPPD-Histo 60 ug/ml prot.	Blastomicina 48.5 ug/ml prot.	CPPD-Blasto 52.0 ug/ml prot.
Coccidiodomycosis (5)	1:512(1/5)	1:4(2/5)	(-) (5/5)	1:2 (1/5)
Paracoccidiodomycosis (7)	1:2(3/7)	(-) (7/7)	1:2 a 1:4(3/7)	1:8(1/7)
Blastomycosis (4)	1:4(1/4) 1:16(1/4)	1:4(2/4)	1:4(1/4) 1:64(2/4)	1:4(1/4) 1:64(2/4)
Histoplasmosis (28)	1:2 a 1:4(7/28) 1:8 a 1:512(11/28)	1:2 a 1:4(9/28) 1:256 a 1:512(6/28)	1:2 a 1:4(5/28) 1:8 a 1:128(17/28)	1:2(1/28)
Normal (7)	1:4(2/7)	(-) (7/7)	1:4(1/7)	(-)(7/7)

Se utilizaron sueros de pacientes con diagnóstico comprobado para cada una de las micosis señaladas. La hemaglutinación se realizó por el método de glutaraldehído y se leyó a las 2 y 24 hrs de reacción. La determinación de proteínas se hizo por la técnica de micro-Kjeldahl y la de Lowry. Las fracciones en los paréntesis indican el número de sueros con título hemaglutinante sobre el número total de sueros utilizados por cada micosis.

TABLA 3.- COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE ANTIGENOS CRUDOS Y PURIFICADOS DE Histoplasma
Y Blastomyces POR LA PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO.

TIPO SUERO	TITULOS FIJADORES DE COMPLEMENTO			
	Histoplasmina 50% hemólisis	CPPD-Histo 50% hemólisis	Blastomicina 50% hemólisis	CPPD-Blasto 50% hemólisis
Coccidio- micosis (3)	1:2 (2/3)	1:2 (2/3)	1:2 (1/3)	(-) (3/3)
Paracoccidio- micosis (6)	1:64 a 1:256(6/6)	1:2 a 1:4(3/6) 1:8 a 1:128(3/6)	1:8 a 1:256(6/6)	1:16 a 1:256(6/6)
Blastomicosis (2)	1:2 (1/2)	1:2 a 1:4(2/2)	1:4(2/2)	1:4(1/2)
Histoplasmosis (25)	1:2 a 1:4 (7/25) 1:8 a 1:128(10/25)	1:2 a 1:4(14/25) 1:8 a 1:16(6/25)	1:2 a 1:4(10/25) 1:8 a 1:32(3/25)	1:2 a 1:4(10/25) 1:8 a 1:32(2/25)
Normal (7)	1:2(2/7)	(-) (7/7)	1:2 (1/7)	(-) (7/7)

Se realizó la microtécnica de reacción de fijación del complemento al 50% de hemólisis. Las fracciones en los paréntesis indican el número de sueros con títulos fijadores del complemento sobre el número total de sueros utilizados por cada micosis.

TABLA 4.- CAMBIOS EN LA RESISTENCIA A LA INFECCION HISTOPLASMOSA POR LA TRANSFERENCIA PASIVA DE CELULAS DE BAZO DE RATONES MENORES DE 1 MES.

DONADORES: EDAD Y POBLACION CELULAR TRANSFE- RIDA.	TRATAMIENTO (Rx) IRRADIACION (EDAD)	R E C E P T O R E S S I N G E N I C O S .					
		I N F E C C I O N			N O I N F E C C I O N		
		N U M E R O D E M U E R T O S			N U M E R O D E M U E R T O S		
		E X P E R I M E N T O			E X P E R I M E N T O		
		1	2	3	1	2	3
1 Mes (Bazo)	Rx 4.5	5 (9)*	7 (9)	7 (9)	0 (9)	0 (9)	0 (10)
1 Mes (Bazo)	-- 4.5	3 (9)	4 (10)	4 (10)	2 (9)	2 (9)	0 (10)
4.5 Meses (Bazo)	Rx 4.5	NR**	1 (9)	0 (10)	NR	0 (10)	0 (10)
4.5 Meses (Bazo)	-- 4.5	2 (9)	0 (10)	0 (10)	0 (9)	0 (9)	0 (9)
Ninguna	-- 4.5	0 (9)	2 (8)	0 (10)			
Ninguna	-- (1)	7 (8)	9 (10)	7 (9)			
Ninguna	Rx 4.5				9 (9)	9 (9)	9 (9)

Se utilizaron ratones singénicos machos de la cepa BALB/c. La transferencia se hizo a las 24 horas post-irradiación. El número de células donadoras transferidas fué de 1×10^7 células de médula ósea de animales adultos y 5×10^7 de células de bazo de ratones de 1 mes contenidas en 0.3 ml respectivamente y administradas por vía retroorbital. La dosis de irradiación fué de 700 rad. La infección con levaduras de *Histoplasma* cepa No. 5037 se realizó una semana post-irradiación. La dosis de infección fué de 4×10^6 levaduras/ml. Las células de médula ósea fueron transferidas solamente a los animales irradiadas (*) Los paréntesis contienen el número total de cada grupo de animales. (**) NR= no realizado.

TABLA 5. - CAMBIOS EN LA RESISTENCIA A LA INFECCION HISTOPLASMOSA POR LA TRANSFERENCIA PASIVA DE --
CELULAS ADHERENTES Y NO ADHERENTES DE BAZO DE RATONES MENORES DE 1 MES.

DONADORES	POBLACION CELULAR TRANSFERIDA (BAZO)	DOSIS DE CELULAS TRANSFERIDAS	% MUERTE (1)	CONTROLES	% MUERTE
1 mes	Adherente	1×10^7	50.0	Infección 4.5 meses	8.33
	No adherentes	1×10^7	84.6	Infección 1 mes	81.8
	Totales	5×10^7	62.5	Transferencia 4.5 meses No infectado.	0
	Rx 800 rads	1×10^7	40.0	Irradiación 4.5 meses	100
	No adherentes + SAM (2)	1×10^7	80.0		
	Totales + anti-theta	1×10^7	50.0		
	Totales + monoclonal anti-Thy 1.2	1×10^7	58.3		
4.5 meses	Totales	5×10^7	9.09		

Se utilizaron ratones machos singénicos BALB/c como receptores de las células transferidas. Los animales receptores fueron irradiados con 700 rads y transferidos 24 hrs después con células de médula ósea (1×10^7) de ratones adultos. Todas las transferencias se realizaron por vía retroorbital en un volumen de 0.3 ml. Las células tratadas con SAM, anti-theta y el monoclonal anti-Thy 1.2. fueron incubadas a 37° C con complemento, lavadas y ajustadas previa su utilización. Se infectaron los ratones a la semana post-transferencia con una dosis de 4×10^8 levaduras/ml de la cepa 5037 de *H. capsulatum*. (1) El porcentaje de muerte expresa los resultados de 3 experimentos utilizando un promedio de 7 a 8 ratones por cada lote experimental (2). SAM-suero antimacrófago obtenido en conejo.

TABLA 6. POSIBLE ACCION REGULADORA DEPENDIENTE DE LA CONCENTRACION DE ANTICUERPOS Y SU INTERACCION CON EL HONGO, H. capsulatum.

TITULOS DE ANTICUERPOS	ACCION	RESULTADO
Altos	Enmascaran determinantes antigénicos del hongo haciéndolos inaccesibles a la respuesta -- de los linfocitos.	Hiporreactividad celular. Regulación alterada. Daño.
No detectables ó nulo	No afectan al reconocimiento - del antígeno por los receptores de los linfocitos	Inmunidad celular regulada adecuadamente.
Bajos o no detectables	No existe ninguna inhibición - por parte del anticuerpo.	Hiperreactividad celular. (hipersensibilidad). Regulación alterada. Daño.

INFECCION *IN VITRO* DE *HISTOPLASMA CAPSULATUM* EN MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON

por Maria Lucia Taylor*

Blanca Rico Galindo*

María Teresa Benítez**

Gerardo Díaz Sánchez**

Ana María Castro*

Guadalupe Polito Alarcón* y

Conchita Toriello*

IN VITRO INFECTION WITH *HISTOPLASMA CAPSULATUM* IN MICE PERITONEAL MACROPHAGES

SUMMARY

The importance of the macrophage in the histoplasma infection, was investigated during an *in vitro* study of the binomial macrophage-fungus. Different techniques were used including optical microscopy, histochemical methods with fluorescein isothiocyanate and finally using electronic microscopy. The optimal resolution dose of the *in vitro* infection by the macrophages was estimated (5×10^3 yeasts/ 10^6 macrophages). With this dose a phagocytic time infection kinetic was obtained in order to determine the resolution of infection at different time intervals. The data observed with these methods suggest that the attachment, the ingestion time and in general the entire phagocytic process of *H. capsulatum*, develops a different kinetic than the microorganism used as control.

RESUMEN

Considerando que el papel del macrófago es fundamental en la evolución de la infección histoplasmosa, se estudió *in vitro* el binomio macrófago-hongo a nivel de microscopía óptica y por métodos histoquímicos. Se utilizó el isotiocianato de fluoresceína y se hicieron observaciones en microscopía electrónica. Se determinó la dosis óptima de resolución de la infección por los macrófagos (5×10^3 levaduras/ 10^6 macrófago), con la

- * Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M. 04510 México, D. F.
- ** Departamento de Histología y Unidad de Microscopía Electrónica, Facultad de Medicina, U.N.A.M. 04510 México, D. F.

cual se realizó una cinética de tiempo de fagocitosis para determinar la resolución de la infección en los distintos periodos de tiempo. Los datos obtenidos con los métodos empleados, sugieren que la adhesión, el tiempo de ingestión y en general todo el proceso fagocítico de *H. capsulatum* desarrolla una cinética diferente a la del control utilizado.

INTRODUCCION

La histoplasmosis constituye uno de los más interesantes prototipos de infección intracelular, en donde el parásito-hongo tiene predilección por las células del sistema retículo endotelial. El agente etiológico de la histoplasmosis, *Histoplasma capsulatum*, es un hongo dimórfico que crece en la naturaleza en forma miceliar, el cual presenta dos tipos de esporas esféricas: las macroconidias equinuladas (8-14 μm de diámetro), y las microconidias (2-4 μm de diámetro). Estas conidias constituyen la forma infectante, que al penetrar por vía respiratoria, producen la infección en un huésped susceptible. El hongo crece abundantemente en suelos ricos en nitrógeno y fósforo, proporcionados por el guano de murciélago o excretas de aves, encontrándose principalmente en casas, gallineros y minas abandonadas. (Rippon 1974, Emmons *et al.*, 1977).

Los cambios morfológicos que sufre el hongo en el huésped, al inicio de la infección, son desconocidos; al parecer este hongo se transforma en levadura en los macrófagos alveolares (Kimberlin *et al.*, 1981). Sin embargo, poco se conoce del momento y del sitio en que esta transformación ocurre.

Con frecuencia, la infección cura espontáneamente; los casos en los cuales la infección progresa sugieren que la sobrevida y multiplicación del *Histoplasma* en los macrófagos es un factor importante en el desarrollo del cuadro infeccioso.

Parece ser que los mecanismos del huésped para destruir al hongo presentan alguna alteración, sea porque existan fallas propias del fagocito o en otras ramas de la respuesta inmune, o bien, porque la relación entre el huésped y el parásito produzca un balance favorable al parásito en el momento en que ocurre la infección (dosis elevada del parásito, inmunosupresión ocasional o no del huésped, etc.) (Taylor *et al.*, 1984). Por consiguiente, la sobrevida y multiplicación del hongo dentro del fagocito por largo tiempo, constituye, sin duda alguna, una prueba de estas alteraciones.

Los estudios sobre el fenómeno fagocítico en la histoplasmosis son escasos. Uno de los eventos más conocidos relacionado con la fagocitosis de *Histoplasma*, es la participación de células T inmunes en la activación de macrófagos que favorece el proceso de eliminación del hongo (Howard, 1975; Howard y Otto, 1977; Wu-Hsieh y Howard, 1984). Por otro lado, se han identificado mecanismos fungicidas capaces de destruir al hongo, tanto en macrófagos como en polimorfonucleares (Howard y Dabrowa, 1982). Además, se ha estudiado la influencia de la pared celular del hongo en el fenómeno fagocítico (Sánchez y Carbonell, 1975), así como también se ha detectado que el hongo es capaz de activar la vía alterna del complemento, posiblemente facilitando el evento

fagocítico (Ratnoff *et al.*, 1980). El incremento de la ingestión del hongo por el macrófago del huésped, pero no su destrucción intracelular (digestión) en presencia de anticuerpos específicos ha sido estudiada por Sánchez y Carbonell (1975). Sin embargo, estos conocimientos no explican los casos especiales donde el hongo vence al sistema de defensa fagocitario. En tal situación, dos grandes incógnitas permanecen sin explicación en la relación huésped-parásito establecida en la enfermedad histoplasmosa: ¿cómo agrede el hongo al fagocito? y ¿cómo escapa el hongo a la muerte intramacrofágica?. Puesto que no se ha identificado ningún producto del hongo con actividad sobre el fagocito y siendo la fagocitosis la vía final de eliminación del parásito, es de fundamental importancia entender los eventos que ocurren entre el huésped y el parásito durante este fenómeno.

Este fenómeno no es aislado y depende directamente del funcionamiento óptimo e integral de la respuesta inmune. Tomando en consideración lo anterior, se presenta el estudio *in vitro* de la fagocitosis de *Histoplasma* en el modelo murino, a través de la relación que se establece entre el macrófago y el hongo. Por el momento, el trabajo se orientó hacia el estudio de la evolución de la infección en el tiempo, buscando poner en evidencia los cambios que ocurren en el parásito y en el huésped, dados por la relación establecida entre ambos. La dinámica y las diferentes etapas del proceso fagocítico en el tiempo, se estudiaron por observaciones en microscopía común, en microscopía electrónica y a través del marcado del hongo con un compuesto fluorescente (isotiocianato de fluoresceína).

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos: Se utilizó la cepa 5037 de *Histoplasma capsulatum*, mantenida en fase levaduriforme a 37°C, con agitación constante (150 rpm) en medio BHI (infusión de cerebro-corazón) (Bioxon), suplementado con glucosa (Merck) al 1%, L-cisteína monohidratada (Merck) al 0.1% y gentamicina (Lab. Scheramex) 25 µg/ml. Como testigo de infección relacionada se utilizó la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv.

Animales: Se emplearon ratones hembras normales, de 6 meses de edad, de la cepa singénica BALB/c mantenida con purina y agua acidulada (Purina de México) *ad libitum*, en la estación de animales del Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina, U.N.A.M.

Obtención de Macrófagos. Los macrófagos se obtuvieron por lavado peritoneal de las hembras normales, BALB/c. Los animales fueron sacrificados por descerebración y fijados en un soporte en posición dorsal, de manera que la parte podálica quedara frente al operador. Previa asepsia de la región abdominal, se expuso la cavidad peritoneal y con una jeringa hipodérmica de 10 ml, se hicieron varios lavados con solución balanceada de sales (SBS) adicionada de gentamicina (25 µg/ml), a pH 7.0. Las células obtenidas se centrifugaron y se incubaron durante 10 minutos con TRIS-cloruro de amonio al 0.85% a 37°C y posteriormente se lavaron 2 veces con SBS. Finalmente se contaron

en cámara de Neubauer, utilizando la técnica de exclusión de azul de tripano y se resuspendieron en medio RPMI-1640 (Gibco) en amortiguador HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N-2 ácido etanolsulfónico) (Gibco), suplementado con piruvato y glutamina (Gibco) y 20% de suero fetal de ternera (Difco) descomplementarizado a pH 7.0. Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml. Todo el procedimiento se realizó en estrictas condiciones de esterilidad, a 4°C.

Preparación del Inóculo. Las levaduras mantenida en el medio de cultivo, se lavaron de cinco a seis veces con solución salina estéril, se contaron en la región W de la cámara de Neubauer, de modo idéntico a la cuenta de células blancas. Los agregados de 5 células se tomaron arbitrariamente como una sola célula. Se ajustaron a una concentración de 2×10^7 levaduras/ml en SBS con gentamicina.

Cinética de Infección por Dosis. En tubos de vidrio de fondo plano de 7 cm de altura x 1 cm de diámetro, que contenían en el fondo, una lenteja de vidrio de aproximadamente 0.8 cm de diámetro por 0.2 mm de espesor, se colocó 1 ml de la suspensión de macrófagos. Se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO² durante 3 hrs, luego se lavaron 3 veces en SBS y se procedió a la infección. Esta se hizo diluyendo las levaduras ajustadas a 2×10^7 /ml para obtener las diferentes dosis, cada una en un volumen de 20 µl, conteniendo 3.5×10^4 , 7×10^4 , 1×10^5 , 1.35×10^5 , 1.7×10^5 , 2×10^5 , 2.4×10^5 , 3.2×10^5 , 4×10^5 y 5×10^5 células. Se distribuyeron las distintas dosis en cada tubo con cultivo de macrófago y se incubaron nuevamente durante 3 horas. Se lavaron 3 veces con SBS y se tiñeron con la técnica de Giemsa. Como controles se utilizaron tubos con macrófagos no infectados y tubos con macrófagos conteniendo 1×10^7 eritrocitos de carnero estériles, suspendidos y cuantificados en SBS. Todos los experimentos se hicieron por duplicado.

Cinética de Infección por Tiempo. Se siguió el mismo procedimiento que en la cinética de infección por dosis, utilizando también tubos por duplicado, los cuales después de la incubación de 3 hrs a 37°C en estufa al 5% de CO², se lavaron y se infectaron con 5×10^5 levaduras, incubando nuevamente. El primer par de tubos, a los 3 minutos de incubación, se lavó inmediatamente, el segundo a los 5 minutos y así sucesivamente a los 10 min, 30 min y , 3, 12, 24 y 48 horas, procediendo después de los lavados a teñirlos con la técnica de Giemsa. Para los controles se procedió de un modo idéntico que los de la cinética de dosis, únicamente procesando un par de controles por cada tiempo de incubación estudiado.

Determinación de la Cinética de Infección por Microscopía Electrónica. En 10 tubos de vidrio de fondo plano (7 cm de altura y 1 cm de diámetro) que contenían en el fondo un disco de filtro Millipore con poro de 0.45 µm, de 0.8 cm de diámetro, se colocó 1 ml de la suspensión de macrófagos obtenidos por la técnica descrita previamente. Se incubaron a 37°C en estufa de CO² al 5% durante 24 hrs. Luego se lavaron 3 veces con SBS y se procedió a la infección continua con 5×10^5 levaduras, incubándose a diferentes tiempos tal y como está descrito en la cinética de tiempo. Después de la incubación se

lavarón varias veces con SBS y se les agregó buffer de fosfatos pH 7.2, tres veces cada 10 minutos y se fijaron con glutaraldehído al 70% durante 30 minutos. Se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio durante 2 horas. La deshidratación se hizo con alcohol etílico de 60%, 70%, 80% y 90% durante 10 minutos cada uno; posteriormente con alcohol absoluto haciendo dos cambios de 20 minutos. Finalmente, la infiltración se llevó a cabo en Epón al 25%, 50% y 75% (diluido con alcohol absoluto) durante 24 horas cada cambio y luego se colocaron las muestras en Epón al 100% durante 2 horas. Por último, las muestras se desecaron y posteriormente se extrajo el Epón. Se colocaron en un porta-objetos y se procedió a tomar muestras (0.3 x 0.2 cm aproximadamente). Se colocaron en moldes, se agregó Epón al 100% y se polimerizó en estufa a 60°C durante 1 hora. Se hicieron cortes finos en el ultramicrotomo, se tiñeron con azul de toluidina y se observaron al microscopio óptico. Al localizar el material deseado, se hicieron cortes finos, se colocaron en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo durante 30 minutos y posteriormente con citrato de plomo 15 minutos. Se observó en microscopio de transmisión modelo Zeiss EM9-C2. Simultáneamente se trabajó con controles normales de macrófagos sin infectar.

Determinación de la Cinética de Infección por Microscopía de Fluorescencia. El marcado del microorganismo se hizo con isotiocianato de fluoresceína (ITF), en una relación de 50 μ l de ITF en dimetil sulfóxido por ml del paquete de microorganismo contenido en RPMI. Se incubó durante 2 hrs en agitación a temperatura de 4°C y a un pH 9.0. Se infectaron los macrófagos cultivados en lentes de vidrio (1 x 10⁶ células) a los 5, 15 y 30 minutos, 1, 24 y 48 hrs, con las células de microorganismos marcados con ITF, a una dosis de 5 x 10⁶ levaduras/ml de *H. capsulatum* y 5 x 10⁶ células/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (H37 Rv), usada como control de infección relacionada. Simultáneamente se procesaron controles de macrófagos sin infectar. La observación final se hizo por montaje de las lentes de vidrio con resina o con barniz de uñas y observación en microscopio de epifluorescencia.

RESULTADOS

Cinética de Infección por Dosis. A las dosis más bajas, de 3.5 x 10⁴ a 1.35 x 10⁵ fueron escasos los campos en los que se observaron levaduras. Los macrófagos presentaron un aspecto comparable al de los controles, por lo que se descartaron estas dosis en los experimentos posteriores. A las siguientes dosis: 1.7 x 10⁵ a 3.2 x 10⁵, ya fue posible observar un número cuantificable de levaduras posiblemente adheridas o en el interior de los macrófagos; éstos se observaron ligeramente vacuolizados. Sin embargo, a estas dosis todavía se encontraron campos desprovistos de levaduras.

A las dosis mayores de 4 x 10⁵ a 5 x 10⁵ fue posible observar, en forma abundante, al hongo en todos los campos. Los macrófagos se encontraron altamente vacuolizados. Por lo general, con la microscopía óptica fue difícil diferenciar levaduras adheridas de las fagocitadas (Fig. 1).

Cinética de Infección por Tiempo. En los primeros tiempos de infección (5 minutos

hasta 3 hrs) se encontraron abundantes levaduras adheridas a los macrófagos, al igual que en los espacios intermacrofágicos, las cuales desaparecieron a las 24 y 48 hrs de infección. Asimismo, en los primeros tiempos de infección se observó menor vacuolización que a las 24 y 48 hrs, en que los macrófagos estaban altamente vacuolizados (Tabla 1). El número de levaduras fagocitadas pareció ser igual en los diferentes tiempos estudiados según el índice fagocítico determinado para cada tiempo (Tabla 1). En los tiempos iniciales, las levaduras se observaron con mucha frecuencia en las células fagocíticas, mientras que en los tiempos finales, al parecer, se perdió la integridad de las células levaduriformes.

Determinación de la Cinética de Infección por Microscopía Electrónica. La cinética de infección *in vitro* con *Histoplasma capsulatum*, en macrófagos peritoneales de ratones normales a diferentes tiempos de exposición al hongo, nos indicó que a los 5 minutos de infección no hubo evidencias de gran cantidad del microorganismo dentro del macrófago, pero sí actividad de membrana dada por la formación de pseudópodos, siendo que algunas imágenes sugirieron que los pseudópodos se proyectaban hacia algunas partículas envolviéndolas y es posible, que debido al procesamiento del material éstas se desprenderían (Fig. 2). A las 3 hrs ya se encontró el hongo en el interior del macrófago (Fig. 3). La presencia de levaduras íntegras en el interior del macrófago, fue más frecuente en los primeros tiempos de infección e incluso a las 3 hrs, a partir de las cuales se incrementó el número de células levaduriformes en diferentes etapas de digestión. En algunos campos se observaron linfocitos adheridos a la superficie del macrófago y evidencias de su destrucción. En la Fig. 4 se muestra un macrófago con gran actividad metabólica y restos de una posible célula linfocítica.

A las 24 hrs se encontró gran cantidad de hongo, tanto íntegro como semidestruido, en el interior de fagosomas, observándose además muchos *debris* celulares. Asimismo, el número de vacuolas fagocíticas fue mayor en estos tiempos finales. Por otra parte, existió una aparente disminución de ingestión, que se manifestó por la escasez de pseudópodos (Fig. 5). La actividad celular en los tiempos finales se caracterizó por la presencia de poros nucleares, nucleolos, heterocromatina escasa y abundante eucromatina (Fig. 5). Una observación importante que llama la atención en esta serie de experimentos, es el gran número de mitocondrias en los tiempos iniciales en relación a los finales.

Determinación de la Cinética de Infección por Microscopía de Fluorescencia. En los diferentes tiempos experimentados, se observó mayor marca fluorescente en los macrófagos infectados con *H. capsulatum* que en los macrófagos con *M. tuberculosis* (Fig. 6). Asimismo, la marca de fluorescencia de *M. tuberculosis* se perdió rápidamente (Fig. 6). En los tiempos mas largos de infección, la marca fluorescente tendió a desaparecer aunque persistió con mayor frecuencia en los macrófagos infectados con *H. capsulatum*.

DISCUSION

La adherencia del hongo a la célula fagocítica se realiza posiblemente desde los

Tabla 1

Comportamiento a diferentes tiempos de la infección *in vitro* de macrófagos con *Histoplasma capsulatum*

CARACTERISTICAS OBSERVADAS	TIEMPOS DE INFECCION						
	5 min	30 min	1 hr	2 hrs	3 hrs	24 hrs	48 hrs
Presencia de fagocitosis	+	+	+	+	+	+	+
Macrófagos íntegros	+	+	+	+	+	++	++
Presencia de vacuolas cito- plásmicas	-	-	±	+	++	+++	+++
Índice fagocítico*	NR**	340/100	NR	315/100	258/100	250/100	265/100
Espacio intermacrofágico	presencia de lava- duras	340/100	NR	315/100	258/100	limpio	limpio
Levadura adherida macrófago	+++	-	-	-	-	-	-
Levadura dentro macrófago	+	+	+	+	+	+++	++++

* Fue calculado con el número total de levaduras presentes en una población de 100 macrófagos.

** No realizado

tiempos iniciales de infección, según las observaciones al microscopio óptico. Los resultados en microscopía electrónica indican que en los primeros tiempos hay gran cantidad de pseudópodos en los macrófagos infectados (Fig. 2), en comparación con los no infectados, lo cual sugiere contacto del macrófago con la levadura (posible adhesión), sin embargo, en estos mismos tiempos iniciales no hay evidencias de que el hongo se encuentre en el interior de los fagocitos. La presencia de vacuolas en los macrófagos infectados con diferentes dosis del hongo, así como en los tiempos largos de la infección, registrados en microscopía común, sugiere que los macrófagos se encuentran en gran actividad, sobre todo a la dosis máxima de infección 5×10^5 levaduras. Esto hace pensar que esta dosis no es masiva y que no impide la función fungicida de los macrófagos. Las imágenes de los tiempos largos de infección, sugieren la presencia del hongo en diferentes etapas de procesamiento, incluso se pudieron observar lavaduras aparentemente intactas.

En microscopía óptica es difícil diferenciar las levaduras fagocitadas de las adheridas. Hay imágenes que sugieren que existe ingestión temprana, sin embargo, esto se observó con mayor nitidez a partir de los 30 minutos de infección. Por otro lado, tanto por microscopía óptica como por microscopía electrónica (Fig. 3) se observa que existen muy pocos hongos dentro del macrófago, aún a las 3 horas de infección. Estos hechos hacen considerar que el proceso de fagocitosis del *Histoplasma* es lento.

El estudio de la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón con *Histoplasma capsulatum* en microscopía electrónica, sugiere que el fenómeno fagocítico para *Histoplasma* se procesa en tiempos diferentes a lo esperado para otros microorganismos intracelulares (*M. tuberculosis*, por ejemplo). Además, se ha visto que durante los tiempos de infección más largos, 3-24 horas, existe gran actividad metabólica de la célula fagocítica y parásitos en diferentes etapas de digestión. En el proceso de eliminación del parásito hay imágenes que sugieren unión fagosoma-lisosoma (Fig. 5).

En algunos campos por microscopía electrónica se pudieron observar interacciones linfocito-macrófago con aparente daño del linfocito. Estas imágenes son poco frecuentes en los controles sin infección, lo que sugiere un posible efecto citotóxico, mediado por el proceso infeccioso, de los macrófagos sobre otras células. El marcado con isotiocianato de fluoresceína del hongo y *Mycobacterium* (utilizado como cepa de referencia), mostró la presencia de *Histoplasma* en los diferentes tiempos de infección, mientras que *Mycobacterium* se encontró escasamente (Fig. 6).

De acuerdo a los datos anteriores, se considera que *H. capsulatum* y *M. tuberculosis* presentan diferencias durante el desarrollo del fenómeno fagocítico, debido probablemente a que exista un proceso de facilitación marcada para *H. capsulatum* en su entrada al macrófago, mientras que en *M. tuberculosis* tal mecanismo sea menos notorio, lo cual implicaría asumir que *M. tuberculosis* casi no es fagocitado, o bien que comparado con *H. capsulatum*, *M. tuberculosis* a la misma dosis entre más tempranamente y es rápidamente degradado, de ahí que no se detecte su presencia (apagamiento de la fluores-

encia), lo que podría sugerir que el apagamiento de este microorganismo se deba a su constante y rápida entrada al macrófago.

Los resultados preliminares de este estudio apoyan la idea de diferencias en el evento fagocítico entre los microorganismos intracelulares estudiados. Actualmente el trabajo está dirigido a detectar los cambios en la relación macrófago-hongo en una infección sincronizada, manejando cepas del hongo de diferente virulencia y dosis más críticas para la resolución del proceso infeccioso.

LITERATURA CITADA

- Emmons, C. W., H. Chester, Ch. P. Binford y K. J. Kwon-Chung, 1977. *Medical Mycology*. Lea & Febiger, Filadelfia.
- Howard, D. H., 1975. The role of phagocytic mechanisms in defense against *Histoplasma capsulatum*. In: *Mycosis*, Scientific Publication No. 304, Pan American Health Organization, Washington D. C. pp. 50-59.
- Howard, D. H. y V. Otto, 1977. Experiments on lymphocyte mediated cellular immunity in murine histoplasmosis. *Infect. Immun.* 16: 226-231.
- Howard, D. H. y N. Dabrowa, 1982. Antifungal systems derived from phagocytic cells. In: Baxter, M. (Ed.), *Proceedings VIII Congress International Society for Human and Animal Mycology*. Massey University, Palmerston North (Nueva Zelandia) pp. 82-87.
- Kimberlin, C. L., A. R. Hariri, H. O. Hempel y 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. Immun.* 34: 6-10.
- Ratonoff, W. D., J. M. Peppley y J. A. Winkelstein, 1980. Activation of the alternative complement pathway by *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 30: 147-149.
- Rippon, J. W. 1974. Histoplasmosis. *Medical mycology*. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. W. S. Saunders, Filadelfia, pp. 321-347.
- Sánchez, S. B. D. y L. M. Carbonell, 1975. Immunological studies on *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 11: 387-394.
- Taylor, M. L., S. Diaz, P. A. González, C. A. Sosa y C. Toriello, 1984. Relationship between pathogenesis and immune regulation mechanism in histoplasmosis: A hypothetical approach. *Rev. Infect. Dis.* 6: (en prensa).
- Wu-Hsieh, B. y D. H. Howard, 1984. Inhibition of growth of *Histoplasma capsulatum* by lymphokine-stimulated macrophages. *J. Immunol.* 132: 2593-2597.

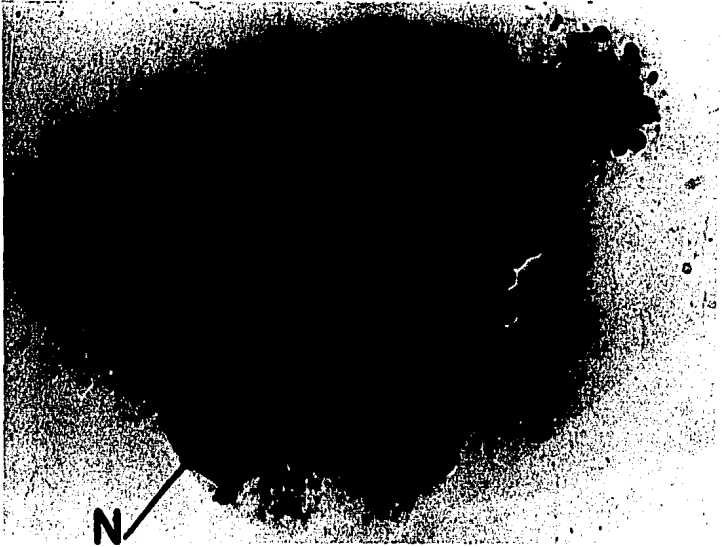


Fig. 1 Macrófagos infectados con levaduras de *H. capsulatum*. Se trabajó con 1×10^6 macrófagos y 5×10^6 levaduras. Postinfección las células fueron teñidas con Giemsa. Se observa la típica imagen de la falsa cápsula del hongo. Lev = levadura. N = núcleo.

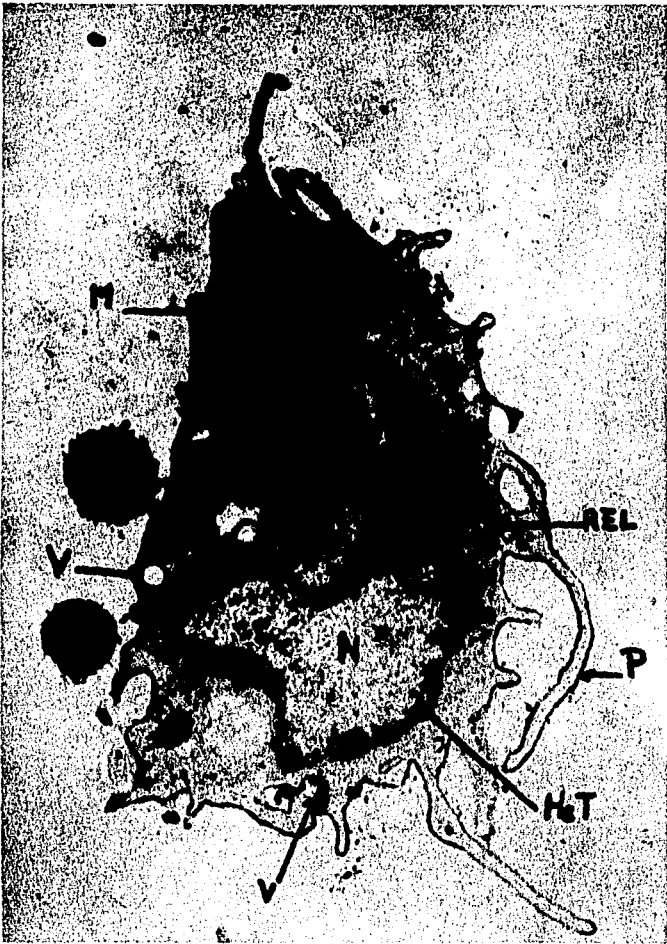


Fig. 2 Micrografía electrónica (4500X). Macrodiplosis infectados con *H. copulatum* a los 5 minutos de infección. N = núcleo, M = mitocondria, REL = retículo endoplásmico liso, V = vacuola, P = pseudópodo, Het = heterocromatina.



Fig. 3 Micrografía electrónica (9000X). Macrófago a las 3 horas de infección, con una levadura en su interior. N = núcleo, M = mitocondria, Lev = levaduras.

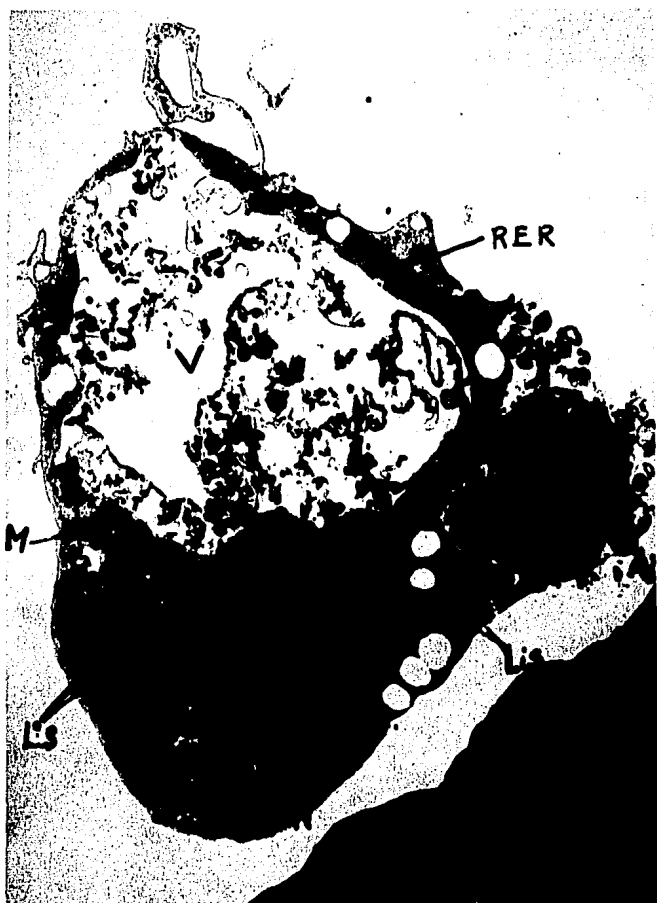


Fig. 4 Micrografía electrónica (4500X). Macrófago a las 24 horas de infección, mostrando una gran vacuola con abundante *debris* celular y probable destrucción de un linfocito. V = vacuola, RER = retículo endoplásmico rugoso, M = mitocondria, Lis = lisosomas, Lin = linfocito, N = núcleo, PN = poro nuclear.



Fig. 5 Micrografía electrónica (4500X). Macrófago a las 24 horas de infección mostrando diferentes grados de digestión del hongo. RER = retículo endoplásmico rugoso, P = pseudópodo, N = núcleo, Nu = nucleolo, PN = poro nuclear, V = vacuola, Lev = levaduras.

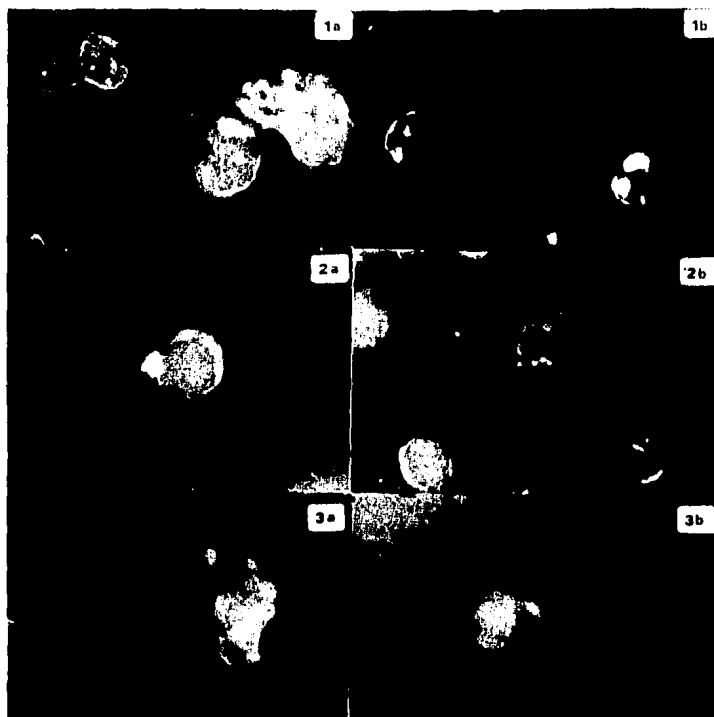


Fig. 6 Micrografías ópticas de *H. capsulatum* y *M. tuberculosis* marcados con isotiocianato de fluoresceína, a diferentes tiempos de infección: 1) 0 minutos, 2) 5 minutos, 3) 15 minutos, a) *H. capsulatum* y b) *M. tuberculosis*.

**archivos de
investigación
medica**

**Reimpreso
(Reprint)**

8 | 2 | 1977

IMSS

inmunología de la histoplasmosis: aislamiento de un complejo polisacárido -proteína con actividad inmunoespecífica a partir de *histoplasma capsulatum*

MARIA LUCIA TAYLOR
LUIS E. BOJALLI

Maria Lucía Taylor, Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Luis E. Bojalli, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

Recibido: 22 de octubre 1976

Aceptado: 25 de noviembre 1976

Solicitud de sobretiros (request for reprints): M. en C. María Lucía Taylor, Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, UNAM, México 20, D.F., México.

Se aisló un complejo polisacárido-proteína (CPP) de una cepa de *Histoplasma capsulatum*, con muy buena especificidad en inmunodifusión en gel (IDG). Por acción de la enzima β -glucosidasa se observó pérdida de actividad en IDG del antígeno estudiado, en tanto que el tratamiento con calor y enzima proteolítica (pronasa) no alteró la actividad del antígeno CPP. Ello sugiere que la especificidad de éste reside en la fracción polisacárido.

La electroforesis en gel de poliacrilamida del antígeno CPP produjo una sola banda, revelada solamente por el reactivo de Schiff (PAS), lo que indica su probable grado de pureza. [Arch. Invest. Méd. (Méx.) 8: 91, 1977.]

Los cuadros clínicos originados por el hongo *Histoplasma capsulatum* pueden ser graves, hasta mortales en algunas ocasiones. Las pruebas inmunológicas a las que se suele recurrir para la histoplasmosis (^{1,2}), presentan gran número de limitaciones, debidas principalmente a la naturaleza de los antígenos tradicionalmente utilizados (³⁻¹⁰) y a una amplia gama de reacciones cruzadas con otros géneros y especies de hongos causantes de cuadros nosológicos semejantes (¹¹⁻²⁰).

La estructura antigénica de *Histoplasma capsulatum* ha sido ampliamente estudiada. De los trabajos publicados hasta la fecha, quizás el único que presenta un antígeno

con buen grado de especificidad para *H. capsulatum*, es el de Heiner (21), quien aisló de la histoplasmina bruta dos fracciones antigénicas específicas denominadas antígeno *H* y antígeno *M*. Estos antígenos fueron posteriormente purificados por Dickerson y Busey (22), quienes comunicaron que tanto la fracción *H* como la fracción *M* eran proteínas. En 1972, Ehrhard y Pine (23,24), buscando en cultivos de *H. capsulatum* las condiciones ideales para la producción de los antígenos *H* y *M*, encontraron que la aparición de estos dependía tanto de la cepa utilizada como de otros factores, tales como temperatura, pH, inóculo de fase levaduriforme, cultivo en agitación y otros. En el año de 1974, Bradley *et al* (25) obtuvieron más información acerca de estos antígenos: tanto el antígeno *H* como el *M* tienen peso molecular aproximado de 200 000 daltons; aunque son una mezcla de proteínas y carbohidratos es la fracción proteica la parte más importante de estos antígenos.

De los trabajos publicados se desprende que:

1. La actividad inmunológica de la histoplasmina es variable, dependiendo de la cepa de origen y de las condiciones del cultivo.

2. Las reacciones cruzadas con sueros de enfermos infectados con hongos que producen cuadros clínicos semejantes constituyen un problema para el diagnóstico etiológico diferencial de estas enfermedades.

3. Los antígenos *H* y *M* de Heiner, con todo y ser relativamente específicos, se hallan sujetos a una serie de variaciones que hasta el momento no ha sido posible controlar, por desconocerse casi en absoluto la fisiología de estos organismos.

4. Existe gran preocupación por encontrar antígenos más estables y específicos para *Histoplasma*; así, es frecuente hallar trabajos que indican actividad antigénica de alguna fracción proteica (5, 26-28), otros en que se señala que la actividad antigénica reside en fracciones de polisacáridos (29, 30) y otros más que mencionan que la actividad antigénica reside en complejos polisacárido-proteína (31-33). Es decir, prevalece la necesidad de obtener un antígeno específico y estable, como problema urgente a resolver en el estudio médico y biológico de estos hongos. Por tal virtud, se diseñó una investigación orientada al aislamiento de un antígeno más eficiente para el diagnóstico diferencial de la histoplasmosis, teniendo en cuenta: a) que las fracciones antigénicas de *H. capsulatum*, por hallarse parcialmente purificadas, contienen proporciones variables de proteínas y polisacáridos (22, 25, 27, 30, 33); y b) que el componente celular con mayor característica antigénica en estos y otros microorganismos es la pared celular (25, 34-36), constituida principalmente por polisacáridos y glicoproteínas.

Este trabajo describe los resultados obtenidos con un complejo polisacárido-proteína (CPP) aislado de *Histoplasma*.

Material y métodos

Cepas utilizadas. *Histoplasma capsulatum*, cepa número 2256 del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de México (ISET); *Coccidioides immitis*, cepa número 218 de ISET; *Blastomyces dermatitidis*, cepa sin número de ISET y *Paracoccidioides brasiliensis*, cepa número 5510 de ISET. Las cepas fueron mantenidas en medio de Sabouraud sólido.

Método de inmunización. Los sueros hiperinmunes de *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces* y *Paracoccidioides* fueron obtenidos por inoculación en conejos. La dosis inoculada fue de 3 mg de peso seco de micelio muerto con formol, con o sin adyuvante le Freund, administrando a cada animal cuatro dosis, a razón de una cada semana, usando como vía de administración el cojinete plantar.

Sueros utilizados. Se estudiaron en total 46 especímenes. A los que fueron enviados sin preservador se les adicionó una gota de Merthiolate ® diluido 1:10 000 por cada mililitro de suero. Los sueros de origen humano provinieron de casos comprobados de histoplasmosis, coccidioidomicosis y blastomicosis y fueron obtenidos por cortesía del doctor Oscar Velasco del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales. Las características de los sueros utilizados están descritos en la tabla I.

Análisis químicos. La cantidad de proteínas contenida en el antígeno fue determinada por absorción a 280 nm y su concentración estimada tanto por el método de Lowry (37) como por micro Kjeldahl (38). Los carbohidratos se determinaron por el método de la antrona (39), los ácidos nucleicos por su absorción a 260 nm, el DNA por el método de la p-nitrofenilhidrazina (40) y el RNA por el método del orcinol (41).

Reacciones serológicas. Se empleó inmunodifusión en gel (IDG) según la técnica de Ouchterlony (42). Para la preparación del material se utilizó agar Noble al 1% en solución salina isotónica y azida de sodio al 0,01% como preservador.

Preparación de histoplasmina, blastomicina, paracoccidioidina y coccidioidina.

TABLA I. RELACION Y TIPO DE LOS SUEROS UTILIZADOS

SUEROS HUMANOS		SUERO HIPERINMUNE CONEJOS	
Números	Tipos	Números	Tipos
1 al 6	<i>Coccidioides</i>	22 al 27	<i>Coccidioides</i>
7 al 12	<i>Histoplasma</i>	28 al 33	<i>Histoplasma</i>
13 al 15	<i>Blastomyces</i>	34	<i>Blastomyces</i>
16 al 21	Normales	35 al 40	<i>Paracoccidioides</i>
		41 al 46	Normales

Los antígenos fueron obtenidos por cultivo de las distintas cepas en medio de Smith con asparagina (43). Al cabo de seis meses de incubación las cepas fueron muertas por tratamiento con formaldehído al 1%. El cultivo fue pasado a través de un filtro Seitz y el filtrado constituyó el antígeno bruto a partir del cual se trabajó. La blastomicina, paracoccidioidina y coccidioidina brutas fueron usadas solamente como antígenos de prueba. La histoplasmina bruta fue la fuente de origen de la fracción buscada.

Preparación del antígeno. Se obtuvo durante el fraccionamiento de la histoplasmina bruta. Se empleó la técnica de Kirby(44) adaptada por Bonilla-Soto(45, 46) para el aislamiento de glicoproteínas y modificada de la siguiente manera: a cada diez gramos de filtrado, se agregaron 15 ml de fenol líquido; la mezcla se incubó a 56°C por una hora, con agitación ocasional; se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 500 x g durante 20 minutos.

Se removió cuidadosamente la fase acuosa, mezclándola enseguida con tres volúmenes de alcohol etílico al 95% y se incu-

bó por 24 h a 5°C. Después de 24 h el precipitado fue recuperado por centrifugación a 500 x g durante 20 minutos. El precipitado fue disuelto en solución salina o agua destilada y reprecipitado otra vez con etanol al 95%. Se repitió esta última operación, disolviéndose el precipitado final en agua destilada y dializando contra agua destilada durante dos días, cambiando el agua tres a cuatro veces al día. Finalmente, el precipitado que constituyó el antígeno (CPP) fue distribuido en alícuotas, liofilizado y conservado a -20°C.

Tratamiento de la fracción antigénica (CPP) con pronasa. La digestión enzimática con pronasa (Lab. Merck-Pronasa E-70 000 Pmk/G)⁽⁴⁷⁾ se llevó al cabo bajo las siguientes condiciones: solución buffer de fosfatos 0.15 M, pH 7.4; tiempo de digestión 24, 48, 72 h y 1 semana; temperatura de digestión a 37°C. La cantidad de enzima utilizada es el equivalente al 0.5 ó 1% del peso de proteína de la muestra. La digestión requiere la presencia de CaCl_2 0.015 M, MgSO_4 0.03 M y una o dos gotas de tolueno para evitar contaminación. Como testigo de digestión de pronasa se usó albúmina bovina. Se hizo también un blanco conteniendo todos los componentes usados, con excepción del antígeno, con el objeto de confirmar el problema de autodigestión de esta enzima. Para el tratamiento de una semana con pronasa, ésta fue añadida diariamente a los tubos usando la mitad de la cantidad usada en el día anterior. Para control de digestión se determinaron los grupos amino libres por la prueba de la ninhidrina⁽⁴⁸⁾, al inicio y al final del tiempo de digestión, usando lisina como testigo en esta prueba. Al séptimo día se detuvo el tratamiento por congelación. El efecto de la pronasa en el an-

tígeno (CPP) se determinó por inmunodifusión en gel, utilizando como control el antígeno incubado con pronasa previamente inactivada por el calor.

Tratamiento de la fracción antigénica por calentamiento. El antígeno se llevó a ebullición por 30 minutos. El efecto de este tratamiento fue también probado por inmunodifusión, investigando su reactividad frente a sueros de histoplasmosis.

Tratamiento de la fracción antigénica con α y β -glucosidasas.^(49, 50) Las enzimas (Lab. Sigma) fueron utilizadas separadamente. Las condiciones de trabajo son las siguientes: 1. para α -glucosidasa: pH óptimo de 6.8; temperatura de incubación, 37°C; tiempo de digestión, 48 h. 2. Para β -glucosidasa: pH óptimo 4.4 a 5.25; temperatura de incubación, 37°C; tiempo de digestión, 48 horas.

Cada una de las enzimas fue incubada separadamente con el antígeno. La cantidad de enzima utilizada corresponde a la décima parte de la cantidad de carbohidratos de la muestra. Como testigo se procesó el antígeno con cada una de las enzimas previamente inactivadas por el calor. Se hizo la determinación de la acción de las enzimas por la prueba de inmunodifusión en gel.

Electroforesis en gel de poliacrilamida. Se trabajó según el método de Davis⁽⁵¹⁾. La columna del gel de poliacrilamida está formada por dos capas: una con gel separador o resolutorio de poro pequeño donde la separación tiene lugar y otro con gel concentrador de poro largo donde se concentra la muestra. Las muestras del antígeno fueron disueltas en buffer de fosfato 0.01 M. Se aplicó un volumen de 0.2 ml de la muestra concentrada con sacarosa en la cantidad suficiente para hacerla más

TABLA II. INMUNODIFUSION EN GEL DE LA FRACCION ANTIGENICA (CPP)
OBTENIDA DE VARIOS LOTES DE EXTRACCION DE LA HISTOPLASMINA

Diferentes lotes ex- tracción del Ag-CPP	Antisueros humanos(*)				Antisueros animales(*)				
	Sueros 1 al 6 (Cocci)	Sueros 7 al 12 (Histo)	Sueros 13 al 15 (Blasto)	Sueros 16 al 21 (Normal)	Sueros 22 al 27 (Cocci)	Sueros 28 al 33 (Histo)	Sueros 34 (Blasto)	Sueros 35 al 40 (Paracocci)	Sueros 41 al 46 (Normal)
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(*) Todos los antisueros presentan actividad en IDG con sus antígenos brutos correspondientes, así como con la histoplasmina bruta.

densa que el buffer electroforético (buffer de glicina). Los geles separadores tenían 5 cm de largo y fueron polimerizados en tubos de vidrio de 8 cm de largo por 4 mm de diámetro interno. Los geles concentradores formaron una columna de 1 cm de largo en la parte superior de los geles separadores.

El tiempo de electroforesis fue de 120 minutos a 2 mA por tubo. Se usaron algunos geles para testigos, unos como control de la sacarosa y otro como control del propio gel.

Los geles fueron coloreados al final de la electroforesis con amilo de Schwartz o con PAS.

Procedimiento para la coloración de PAS. Los geles fueron fijados en etanol durante 10 minutos. Al fin de este tiempo se sumergieron en ácido periódico al 0.5%, durante 15 min. Se lavó de 5 a 10 veces con agua destilada, 10 min, cada lavada. Se sumergieron los geles en reactivo de Schiff du-

rante 15 a 20 min. Finalmente se lavaron 8 a 10 veces con HNO₃ al 0.4% y fueron fijados en formaldehído al 40%. Si los geles tomaban color rosado, se consideró que los baños anteriores no habían sido suficientes y se les repitió. La preservación de los geles se hizo en formaldehído al 5%.

Resultados

La fracción antigénica final aislada de la histoplasmina bruta consistió en un precipitado en etanol al que se denominó CPP (complejo polisacárido-proteína). Un total de siete lotes del antígeno CPP fueron extraídos y probados en las distintas técnicas y métodos utilizados en este trabajo.

Inicialmente se investigó la actividad de esta fracción desde el punto de vista inmunológico, utilizando para este fin la reacción de inmunodifusión en el gel (IDG).

Reacción de IDG. La tabla II muestra la actividad encontrada en la inmunodifusión

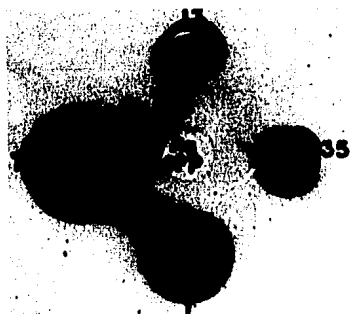


Fig. 1. Inmunodifusión en gel con el antígeno-CPP de *H. capsulatum* (lote 2) vs. sueros de *Blastomyces* (13), *Paracoccidioides* (33), *Coccidioides* (1) e *Histoplasma* (7). La lámina de IDG fue coloreada con amido black al 0.7% en ácido acético.

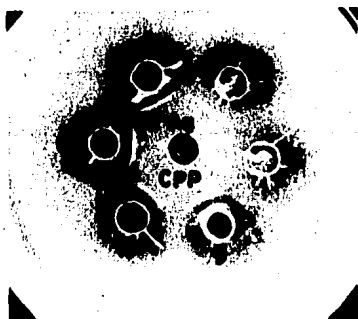


Fig. 2. Inmunodifusión en gel con el antígeno -CPP de *H. capsulatum* (lote 4) vs. sueros humanos de histoplasmosis (hoyos no. 7, 8, 9, 10, 11, 12).

sión en gel, empleando la fracción de *H. capsulatum* (CPP). Las placas de IDG que contenían el antígeno resultaron positivas solamente para los sueros de enfermos con histoplasmosis (Figs. 1 y 2). Las bandas de precipitación aparecen únicamente en los sueros humanos de pacientes histoplasmosos, siendo negativas en los sueros de animales hiperinmunizados con *Histoplasma*. Además, no se observó un solo caso de reacción cruzada con los sueros de pacientes y animales hiperinmunizados con otros agentes de micosis relacionadas (*Coccidioides Blastomyces* y *Paracoccidioides*).

Determinación química. Después de comprobar la reactividad inmunológica de la fracción aislada, se procedió a obtener información de su composición química. Los resultados de las determinaciones químicas del antígeno CPP se ilustran en la tabla III. Como puede observarse, el anti-

geno aislado está formado fundamentalmente por carbohidratos y proteínas. La relación entre estos componentes es bastante estable en los diferentes lotes analizados.

Parece importante destacar la ausencia de material nucleico en el antígeno (ver tabla III), a pesar de que la técnica utilizada para la obtención de éste (⁴³), constituye una modificación de la técnica para la extracción de RNA (⁴⁴).

Con el fin de determinar si el comportamiento del antígeno en las pruebas inmunológicas dependía del complejo polisacárido-proteína íntegro o de alguno de sus componentes por separado, se sometió el antígeno a tratamiento con una enzima proteolítica y tratamiento por calor a ebullición, para inactivar su parte proteica, así como a digestión con α y β -glucosidasa para destruir su fracción polisacárido.

TABLA III. DETERMINACIONES DE CARBOHIDRATOS, PROTEINAS, DNA Y RNA DE DIFERENTES LOTES DEL ANTIGENO DE *H. Capsulatum* (CPP).

Diferentes lotes del antígeno de <i>capsulatum</i> (CPP) (Núm. lotes)	Carbohidratos	% Contenido (*)			Relación entre carbohidratos y proteínas
		Proteínas	DNA	RNA	
1	31	8	75	—	3.87
2	54	12.5	—	—	4.32
3	11.5	3.1	—	—	3.70
4	56	11.5	—	—	4.86
5	73.5	15.5	—	—	4.70
6	46.5	13	—	—	3.57
7	27	8.5	—	—	3.17

(*) Los valores de porcentaje están expresados en base del peso seco del antígeno. Las proteínas fueron determinadas por los métodos de Lowry y micro-Kjeldahl; los carbohidratos, por el método de astrona; el DNA por la técnica de la p-nitrofenilhidrazina y el RNA por la técnica del orcinol.

(—) No detectable.

Tratamiento del antígeno CPP con pronasa y por calor. La inmunodifusión en gel del antígeno tratado a diferentes tiempos con la enzima proteolítica pronasa mostró el mismo comportamiento dando banda de precipitación desde 24 h hasta la semana de tratamiento. En la figura 3 se ilustra el tratamiento durante 48 horas con la enzima. Los resultados obtenidos por IDG, con los sueros de histoplasmosis indican que la parte proteica de este antígeno no juega un papel decisivo en la especificidad del anticuerpo. Con el fin de ratificar el resultado obtenido por el tratamiento con pronasa, se resolvió desnaturar la parte proteica del antígeno por calentamiento. El resultado corroboró lo ya encontrado con pronasa.



Fig. 3. Inmunodifusión en gel del antígeno -CPP de *H. capsulatum* (lote 5) tratado por pronasa con 48 horas de digestión. En el agujero central-suero histoplasmosico (S-10); arriba-antígeno-CPP (I) a la derecha-antígeno CPP tratado con pronasa (II); abajo-control pronasa sola (III); a la izquierda-antígeno-CPP tratado con pronasa inactivada por calor (IV).

Tratamiento del antígeno CPP con α y β -glucosidasa. La actividad de la enzima β -glucosidasa sobre la parte polisacárido del antígeno fue muy significativa, ya que esta enzima inhibió la capacidad del antígeno para reaccionar en IDG frente a suero histoplasmósico. Esta acción está perfectamente determinada en el experimento de digestión con la enzima a través de los controles empleados (Fig. 4). La otra enzima utilizada α -glucosidasa no tuvo ningún efecto sobre el antígeno.

Para identificar el número de componentes presentes en la fracción antigénica (CPP) se decidió analizar su comportamiento durante electroforesis en gel de poli-acrilamida.

Electroforesis en gel de poli-acrilamida. La electroforesis de seis lotes del antígeno CPP usando gel separador y concentrador, mostró una sola banda, revelada solamente por la coloración de PAS (Fig. 5), que sirve para teñir especialmente carbohidratos y glicoproteínas. Estas pruebas fueron repetidas varias veces utilizando en cada electroforesis dos gels sin muestra como testigo para la sacarosa y un gel sin muestra y sin sacarosa como testigo del gel (Fig. 5).

El siguiente paso consistió en identificar si la banda separada por electroforesis en poli-acrilamida correspondía realmente al antígeno CPP. Para ello se localizaron previamente las posiciones de las bandas reveladas en PAS, se cortaron las porciones correspondientes de un gel no revelado y se les probó por inmunodifusión en gel. La figura 6, muestra que realmente la banda obtenida corresponde al antígeno CPP, en vista de que retiene la capacidad de reaccionar con el antisuero de histoplasmosis. Además, se puede ver identidad con el antígeno CPP empleado en la IDG como testigo.

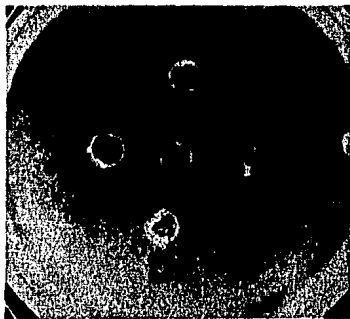


Fig. 4. Inmunodifusión en gel del antígeno-CPP de *H. capsulatum* (lote 6) tratado por β -glucosidasa con 48 horas de digestión. En el agujero del centro-suero de *Histoplasma* (S-12); a la izquierda antígeno CPP (A); arriba-antígeno CPP tratado con β -glucosidasa activa (B); a la derecha-antígeno-CPP tratado con β -glucosidasa inactivada por calor (C); abajo-control de β -glucosidasa sola (D).

Discusión

Los resultados obtenidos en el desarrollo del presente trabajo con complejo polisacárido-proteína (CPP) aislado, permiten hacer varias consideraciones.

De acuerdo con los resultados de las pruebas IDG se podría concluir que el antígeno es altamente específico para reaccionar en esta prueba con los sueros obtenidos de casos humanos de histoplasmosis.

Un dato que llamó la atención de los autores desde el inicio del trabajo fue la ausencia de reactividad del antígeno con sueros de animales hiperinmunizados. Se pensó que este fenómeno fuese resultado de alguna variable no controlada en el mé-

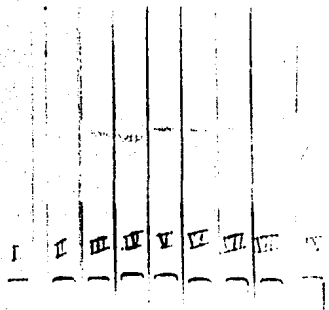


Fig. 5. Separación del antígeno-CPP de *H. capsulatum* por electroforesis en gel de poliacrilamida. Los gels están ennumerados según el siguiente esquema: No. I y II-Testigo de sacarosa; III-Antígeno lote 2; IV-Antígeno lote 3; V-Antígeno lote 4; VI-Antígeno lote 5; VII-Antígeno lote 6; VIII-Antígeno lote 7; IX-Testigo del gel.

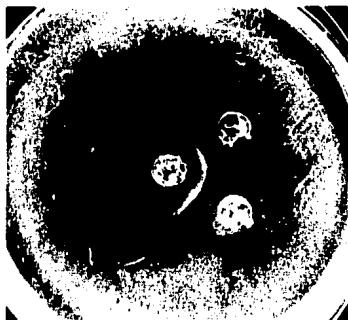


Fig. 6. Inmunodifusión en gel del antígeno-CPP de *H. capsulatum* separado por poliacrilamida. Se obtuvo el antígeno cortando las bandas de poliacrilamida y extrayendo del gel con solución salina. Agujero de la izquierda-suero histoplasmósico (I) a la derecha superior-antígeno-CPP (II) a la derecha inferior-antígeno-CPP separado del gel de acrilamida (II).

todo de inmunización, por lo que se seleccionaron para el presente estudio solamente sueros de animales que presentaban una reacción francamente positiva para sus respectivos antígenos brutos en IDG. Además, se tomaron sueros de animales inducidos con diferentes cantidades de antígeno, en presencia o ausencia de adyuvante incompleto de Freund, pero tales esfuerzos por determinar esa variable que permitiera explicar los resultados experimentales han resultado estériles. Se sabe sin embargo, que también otros investigadores han encontrado diferencias en la reactividad de histoplasmina y otros antígenos de *H. capsulatum* con sueros de animales inmunizados, infectados o los obtenidos a partir de casos humanos, encontrándose que sueros

hiperinmunes eran a veces más y a veces menos reactivos que los provenientes de animales infectados y de casos humanos, dependiendo de la prueba serológica utilizada (7, 30, 32, 36, 52).

Con base en estas observaciones, el fenómeno relatado tendría varias explicaciones. Una de ellas sería que durante el proceso de inmunización experimental se pierdan algunos componentes importantes del antígeno completo, situación que no se presenta en animales infectados o en sujetos que contraen la enfermedad en forma natural. Otra explicación se encontraría en las variaciones de la inmunología experimental, según los cuales, cuando se usan polisacáridos como antígenos, su capacidad inmunogénica es variable en diferentes

especies animales. Así, en tanto que el hombre y el ratón responden inmunológicamente bien a los polisacáridos, cobayos y conejos lo hacen en forma más débil (^{52, 53}). Cabe pensar que esto podría ocurrir con la fracción empleada en la presente investigación, en el sentido de que sea inmunogénica en el hombre pero no en el conejo, animal utilizado en el presente trabajo. Este es problema que debe ser aclarado en el futuro, cambiando de animal de experimentación en próximos ensayos.

Los experimentos aquí descritos permiten definir las características químicas del antígeno diciendo que está constituido por una mezcla de carbohidratos y proteínas en proporción de 4:1 respectivamente, y que estos componentes están formando un complejo, ya que a su aislamiento se mantiene esta relación estable de sus componentes en diferentes lotes de extracción. Es importante señalar que el método utilizado para extracción del antígeno permite aislar perfectamente complejos polisacárido-proteínas aparte de otros tipos de sustancias químicas como carbohidratos, ácidos nucleicos y glicoproteínas.

En lo tocante al tratamiento enzimático para estudiar la alterabilidad del citado complejo, fue investigada la especificidad de reacción en IDG de cada fracción del complejo CPP mediante calentamiento y por acción de pronasa y de α y β -glucosidasas. El antígeno tratado con pronasa y por calentamiento no sufre aparentemente cambios en su actividad inmunológica, hecho de vital importancia porque podría significar que la parte proteica de la sustancia antigénica tenga muy poco que ver con la especificidad de la molécula. Por otro lado, la respuesta al tratamiento con β -glucosidasa demuestra claramente que el papel

desempeñado por polisacáridos en la estructura del antígeno estudiado es determinante, ya que esta enzima inhibe la reactividad del antígeno en inmunodifusión en gel contra suero histoplasmósico. Además, el hecho de que el antígeno sea sensible a β -glucosidasa y no a α -glucosidasa sugiere que la fracción polisacárido del complejo CPP esté formado por β -glucósidos.

Parece además importante señalar en esta parte de la discusión la presencia de una o dos bandas de reacción del antígeno en la prueba de IDG (Figs. 1 y 2). Estas bandas varían con el lote de extracción del antígeno y los datos obtenidos con los tratamientos enzimáticos no han aclarado debidamente este aspecto de los resultados.

Para conocer la pureza del antígeno, se procedió a analizarlo por electroforesis en gel de poliacrilamida (Fig. 5). La identificación de una sola banda mediante PAS significa posiblemente la presencia de un solo tipo de molécula. Los resultados negativos obtenidos al tratar de revelar otras bandas con *amido black* 10 B parecen significativos ya que pueden estar indicando que las proteínas encontradas estén unidas a carbohidratos, o bien que esta fracción proteica unida o no a carbohidratos se encuentra en tan poca cantidad, que no alcanza a ser revelada con el colorante específico para proteína. El hecho de que la actividad del antígeno esté perfectamente demostrada en la banda separada del gel de poliacrilamida (Fig. 6) y por IDG permite concluir que realmente el antígeno posee un buen grado de pureza.

Estas últimas consideraciones deberán ser confirmadas tratando al antígeno con métodos más drásticos de desproteiniza-

ción y sometiénolo a análisis de mayor exactitud que permitan su verdadera caracterización.

Abstract

**IMMUNOLOGY OF HISTOPLASMO-
SIS: ISOLATION OF A POLYSACCHA-
RIDE-PROTEIN COMPLEX WITH IM-
MUNO-SPECIFIC ACTIVITY.** A polysac-
charide-protein complex (PPC) with a high
specificity in immunodiffusion in gel (IDG)
was isolated from a *Histoplasma capsu-
latum* strain. Although unaffected by
proteolytic enzymes (pronase) and heat, the
PPC antigen activity was destroyed by β -glu-
cosidase. These results suggest that the
specificity of the PPC antigen might be
located in the polysaccharide fraction. Poly-
acrylamide gel electrophoresis of the
PPC antigen gave only one band detected
by Schiff's reagent (PAS).

Referencias

1. AJELLO, L., GEORGE, L. K., KAPLAN, W. y KAUF-
MAN, L.: Mycotic infection. En: Diagnostic Pro-
cedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic In-
fection, ed. 5, 1970.
2. CAMPBELL, C. C.: The accuracy of serologic me-
thods in diagnosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 89: 163,
1960.
3. CAMPBELL, C. C.: Problems associated with anti-
genic analysis of *H. capsulatum* and the other
mycotic agents. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 92: 113,
1965.
4. GOODMAN, N. L.; SPROUSE, R. F. y LARSH,
H. W.: Histoplasmin potency as affected by culture
age. *Sabouraudia* 6: 273, 1968.
5. GRIFFIN, C. D.: The antigenic potential of *Histo-
plasma capsulatum* isolated from Indiana patients.
I-Whole yeast-phase antigens studied by the comple-
ment fixation technique. *J. Lab. Clin. Med.* 65:
603, 1965.
6. HILL, G. B. y CAMPBELL, C. C.: A further evalua-
tion of histoplasmin and yeast phase antigen of *Histo-
plasma capsulatum* in the complement fixation
test. *J. Lab. Clin. Med.* 48: 255, 1956.
7. SCHUBERT, J. H.; AJELLO, L.; COOPER, J. S.
y RUNYON, L. C.: Evaluation of histoplasmin and
yeast phase antigens derived from a single strain of
Histoplasma capsulatum in the complement fixation
test. *J. Bacteriol.* 69: 558, 1955.
8. SCHUBERT, J. H.; AJELLO, L.; STANFORD, S.
y GRANT, V. Q.: Variation in complement fixation
antigen production by different strains of *Histo-
plasma capsulatum* grown on two media. *J. Lab. Clin.
Med.* 41: 90, 1958.
9. SCHUBERT, J. H. y WIGGINS, G. L.: Preliminary
studies of H and M components of histoplasmin
for skin test and serology. *Amer. Rev. Resp. Dis.*
92: 640, 1965.
10. TOMPKINS, V. N.: Soluble antigenic constituents
of yeast phase *H. capsulatum*. *Amer. Rev. Resp.
Dis.* 92: 126, 1965.
11. CAMPBELL, C. C. y BINKLEY, G. E.: Serologic
diagnosis with respect to histoplasmosis, coccidioido-
mycosis and the problem of cross reactions. *J.
Lab. Clin. Med.* 42: 896, 1953.
12. CAMPBELL, C. C.; REGA, M. E. y GANOVER, C.:
Reaction of *Histoplasma capsulatum* antigens in
sera from mammalian species including man, infec-
ted with *C. immitis*. *Proc. of the Second Symposi-
um on Coccidioidomycosis*. Phoenix, 1965, p. 243.
13. DE ALBORNZ, M.; BASTARDO, C. y ALBORNZ,
M. R.: Study of the specific sensitivity of residents
of an endemic area of paracoccidioidomycosis in Ve-
nezuela. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 45: 65, 1971.
14. FADULLU, S. O. y LARSH, H. W.: Biochemical
characterization and skin test sensitivity of my-
celial growth filtrate of *Histoplasma duboisii*. *Amer.
J. Trop. Med. Hyg.* 21: 110, 1972.
15. GOODMAN, N. L.; LARSH, H. W. y PALMER,
C. E.: Cross reactivity in skin testing with histoplas-
min. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 104: 258, 1971.
16. LANDBAY, M. E.: A serological comparison of the
three serological phases of *C. immitis* complement
fixation test with anti-*Histoplasma capsulatum* serum.
Mycopathol. Mycol. Appl. 33: 225, 1967.
17. O'HEARN, E. B.: Studies in histoplasmosis. I-Cross
reactions and characterization of *Histoplasma*
and *Blastomyces* inhibitory factors. *Mycopathologia*
31: 193, 1967.
18. PINE, L.; KAUFMAN, L. y BONNE, C. J.: Compari-
son of fluorescent antibody staining of *Histoplasma*
capsulatum and *Histoplasma duboisii* with a specific
anti-yeast phase *H. capsulatum* conjugate. *Mycop-
athol. Mycol. Appl.* 24: 315, 1964.
19. SASLAW, S. y CAMPBELL, C. G.: A comparison
between histoplasmin and blastomycin by the col-
loid agglutination technique. *Publ. Health Rep.*
64: 290, 1949.
20. SILVA, M. E.; KAPLAN, W. y ARRANDA, J. C.:
Antigenic relationships between *Paracoccidioides*

- lobol* and other pathogenic fungi determined by immunofluorescence. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 36: 97, 1968.
21. HEINRICH, D. C.: Diagnosis of histoplasmosis using precipitation reactions in agar gel. *Pediatrics* 22: 616, 1958.
 22. DICKERTSON, Q. H. y BUSEY J. F.: Chromatographic separation of H and M antigens from *Histoplasma*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128: 654, 1968.
 23. EHRLHARD, H. B. y PINE, L.: Factors influencing the production of H and M antigens by *Histoplasma capsulatum*. Development and evaluation of a shake culture procedure. *Appl. Microbiol.* 23: 236, 1972.
 24. EHRLHARD, H. B. y PINE, L.: Factors influencing the production of H and M antigens by *Histoplasma capsulatum*: Effect of physical factors and composition of medium. *Appl. Microbiol.* 23: 250, 1972.
 25. BRADLEY, G.; PINE, L.; REEVES, M. W. y MOSS, C. W.: Purification, composition, and serological characterization of histoplasmin H and M antigens. *Infect. Immun.* 9: 870, 1974.
 26. HOOK, W. A. y EARL, H. F.: Soluble antigens for immunofluorescence detection of *H. capsulatum* antibodies. *Appl. Microbiol.* 15: 350, 1967.
 27. SPROUSE, R. F.: Purification of histoplasmin purified derivative. I. Disc electrophoretic separation of skin test reactive components. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 100: 685, 1969.
 28. WALTER JINKS, E. y PRICE, G. B. Jr.: Chemical serologic and dermal hypersensitivity activities of two fractions of histoplasmin. *Amer. Rev. Res. Dis.* 98: 474, 1968.
 29. KAUFMAN, L. y BLUMER, S.: Occurrence of serotypes among *Histoplasma capsulatum* strains. *J. Bacteriol.* 91: 1434, 1966.
 30. MARKOWITZ, H.: Polysaccharide antigens from *Histoplasma capsulatum*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115: 697, 1964.
 31. LIKHOLETOVA, S. V.: The properties of the antigens of *Histoplasma capsulatum* obtained by the method of the gel filtration. *Sb. Nauchn. Itab. Volgogr. Med. Int.* 23: 556, 1970.
 32. SALVIN, S. H. y SMITH, R. F.: Antigens from the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. III Isolation, properties, and activity of a protein carbohydrate complex. *J. Infect. Dis.* 105: 45, 1959.
 33. SPROUSE, R. F.; GODDMAN, N. L. y LAHSI, H. W.: Fractionation, isolation and chemical characterization of skin test active components of histoplasmin. *Sabouraudia*, 7: 1, 1969.
 34. DOMER, J. E.; HAMILTON, J. C. y HARKIN, J. C.: Comparative study of the cell walls of the yeastlike and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* 94: 466, 1967.
 35. GARCIA, J. P. y HOWARD, D. H.: Characterization of antigens from the yeast-phase of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 4: 116, 1971.
 36. SALVIN, S. B. y RIBI, E.: Antigens from yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. II Immunologic properties of protoplasm vs. cell walls. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90: 287, 1955.
 37. LOWRY, O. H.; ROSENBRUGH, N. A.; FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951.
 38. KABAT, E. A. y MAYER, M. M.: Experimental immunochemistry. Charles C. Thomas Publ. ed. 2. Springfield, 1961, p. 476.
 39. HASSID, W. Z. y ABRAHAM, S.: Chemical procedure for analysis of polysaccharides. En: *Methods in Enzymology*. Colovick, S. P. y Kaplan, N. O. (Eds.). N. York, Academic Press Inc. 1957, Vol. 3, p. 34.
 40. WEBB, J. M. y LEVY, H. B.: New developments in the chemical determination of nucleic acids. *Methods in Biochemical Analysis* 6: 1, 1968.
 41. KABAT, E. A. y MAYER, M. M.: Experimental immunochemistry. ed. 2. Springfield, Charles C. Thomas Publ. 1961, p. 530.
 42. OUCHTERLONY, O.: Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy* 6: 30, 1962.
 43. SMITH, C. E.; WHITING, E. C.; BAKER, E. E.; ROSENBERGER, H. G.; BEARD, R. R. y SAITO, M. T.: The use of coccidioidin. *Amer. Rev. Tuberc.* 57: 330, 1948.
 44. KIRBY, K. S.: A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem. J.* 64: 405, 1956.
 45. BONILLA-SOTO, O.; ROSE, N. R. y ALBERMAN, C. E.: Allergenic molds. Antigenic and allergenic properties of *Alternaria tenuis*. *J. Allergy* 31: 246, 1961.
 46. ROWE, J. y JOSEPH, W.: Effects of cultural conditions on the development of antigen by *C. immitis*. II. Complement fixation and immunodiffusion studies with human serum. *J. Invest. Dermatol.* 44: 237, 1965.
 47. GERETY, R. J.; FERRARESI, R. W. y RAFFEL, S.: Polysaccharide in delayed hypersensitivity. I. Pneumococcal polysaccharide as inducer and elicitor or delayed reactivity in guinea pigs. *J. Exp. Med.* 131: 189, 1970.
 48. KABAT, E. A. y MAYER, M. M.: Experimental immunochemistry. ed. 2. Springfield, Charles C. Thomas Publ. 1961, p. 539.
 49. LARNER, L.: En The Enzymes. ed. 2. BOYER, P. D.; LARDY, H. y MYRBACK, K. (Eds.) N. York, Academic Press, Inc. 1960, Vol. 4, p. 369.
 50. VEIGEL, S.: En: The Enzymes. Sumner, J. B. y MYRBACK, K. (Eds.) N. York, Academic Press, Inc. 1950, Vol. 1.
 51. DAVIS, B. J.: Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404, 1964.
 52. ADAMSON, D. M. y COZAD, G. C.: Immunoelectrophoretic studies of sera from rabbits experimentally infected with *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* 92: 887, 1966.
 53. KABAT, E. A.: Structural Concepts in Immunology and Immunotherapy. N. York, Holt, Rinehart and Winston, Inc. 1968, p. 2.

IMMUNOLOGY OF HISTOPLASMOSIS: HUMORAL AND CELLULAR ACTIVITY FROM A POLYSACCHARIDE-PROTEIN COMPLEX AND ITS DEPROTEINIZED FRACTION IN EXPERIMENTALLY IMMUNIZED MICE

Lucia TAYLOR, M. Rocío REYES MONTES, A. LACHICA, C. ESLAVA CAMPOS, J. OLVERA & R. MAXWELL

Departamento de Ecología Humana, Fac. Medicina UNAM, México 20, D.F.

Abstract

In a previous publication it was reported that a polysaccharide-protein complex (PPC), sensitive to β -glucosidase, was isolated from *Histoplasma capsulatum*. This complex was strongly reactive in an agar gel diffusion assay with sera from patients with histoplasmosis, but was unreactive with sera from patients with coccidioidomycosis. Here, the studies with human sera have been expanded and attempts were made to determine the response of mice immunized with nonviable *H. capsulatum* or *Coccidioides immitis* to PPC or its deproteinated fraction (D-PPC) using more sensitive tests for antibody and including also test for cell-mediated immunity. Histoplasmin and coccidioidin were compared with PPC or its deproteinated fraction (D-PPC) in all assays. In a counterimmunoelectrophoresis (CIE) assay, PPC and D-PPC reacted only with sera from patients with histoplasmosis, whereas cross reactions were noted with histoplasmin and coccidioidin using heterologous sera. Cross-reaction were observed with all four antigen preparations and both types of antisera using a micro complement fixation assay. The assay for macrophage migration inhibitory factor (MIF) was also relatively nonspecific, in that inhibition occurred with cells from animals sensitized with *Histoplasma* or *Coccidioides* using both homologous and heterologous antigens. In the footpad assay, histoplasmin and coccidioidin were highly cross-reactive in animals sensitized with the heterologous fungus, but the PPC and D-PPC from *H. capsulatum* elicited significant reactions only in animals sensitized with *Histoplasma*.

Introduction

Many investigators have studied the antigenic structure of *Histoplasma capsulatum*, attempting to find an antigen of

Histoplasma both sensitive and specific in differential tests for the diagnosis of acute histoplasmosis (11, 20, 22, 32). Cross-reactions are particularly common among *Histoplasma capsulatum*, *Histoplasma duboisii*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis* (2, 10, 26) and somewhat common between *H. capsulatum* and *Coccidioides immitis* (7, 8, 20). Based on immunological studies with galactomannans and galactomannan-protein complexes isolated and purified from the mycelial and yeast phases of *H. capsulatum*, *H. duboisii*, *P. brasiliensis* and *B. dermatitidis*, it has been suggested that galactomannan may be the antigen common to those four fungi (2, 10, 26). The common antigen (5) causing reactivity between *H. capsulatum* and *C. immitis* has not been defined, but it is known to contain β -glucans in its spherule phase. In a preliminary note published from this laboratory (33), however, we described a polysaccharide-protein complex (PPC), isolated from *H. capsulatum*, which, when tested in an agar gel diffusion test, detected antibodies in sera from patients with histoplasmosis. The PPC antigen activity was destroyed by β -glucosidase treatment but proteolytic enzymes (pronase) and heat did not effect it. A single band was detected by Schiff's reagent when the PPC was electrophoresed on polyacrylamide gel and no band was detected with a stain for protein.

Since the PPC did not detect cross reacting antibodies in anticoccidioidal sera, it seemed appropriate to investigate it further and the studies reported here were initiated to determine the specificity of PPC in more sensitive humoral and cellular assays for immunologic responses.

Materials and methods

Cultural Methods

Three strains of *H. capsulatum*, 5026, 5028 and 5027,

and one strain 218 of *C. immitis* were obtained from Dr. O. Velasco, Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (I.S. E.T.), México. All were originally isolated from human cases. For the preparations of histoplasmin and coccidioidin, they were incubated for 6 months at 25 °C in Smith's asparagine medium (30). They were killed by exposure to 1% formalin, filter sterilized and stored at -20 °C.

Preparation of PPC and D-PPC

The PPC was prepared from strains 5026, 5028, and 5027 by fractionation of crude histoplasmin (33) using Kirby's method (17) as modified by Bonilla-Sotto (5). The final precipitate, obtained by ethanol extraction, was the PPC. It was dialyzed against distilled water for 24 hours, lyophilized and after chemical determinations were made on it, it was stored at -20 °C. A portion of the PPC was deproteinized by enzymatic treatment with Pronase (Pronase E-Merck-70,1000 Puk g) or with chloroform-isobutanol (29) to yield D-PPC antigen.

Pronase digestion was performed in a 0.15 M phosphate buffer pH 7.4 containing 0.015 M CaCl_2 , 0.03 M MgSO_4 , and toluene. The enzyme was added to the PPC (0.1 mg enzyme/mg protein) and the mixture was incubated at 37 °C for 7 days. Each day additional enzyme was added to the incubation mixture, using half of the quantity used the day before. Bovine serum albumin served as a positive control for enzymatic digestion, and the enzyme was incubated without substrate to control for autodigestion. The reaction was stopped by freezing. To assay digestion, free amino groups were determined by the ninhydrin method (15) using lysine as an amino group standard.

Chemical Determination

Protein was determined by the method of Lowry et al (19) and total carbohydrate by the anthrone method (13). Nucleic acids were investigated by absorption at 260 nm; DNA was determined by the 4-nitrophenylhydrazine method (36) and RNA by the orcinol method (15). All chemicals were reagent grade.

Serology

Human sera from culturally proven cases of histoplasmosis and coccidioidomycosis were obtained from the Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (I.S. E.T.), México.

The agar gel diffusion test was performed by the method of Ouchterlony (24), using a mixture with 1.7% agarose-ionagar in 0.15 M sodium chloride containing 0.01% sodium azide.

The counterimmunoelectrophoresis (CIE) assay was that of Kleger and Kaufman (18) with some modification. Electrophoresis was performed in a Hyland apparatus, Model 077922 (Hyland Laboratory, Costa Mesa, CA), using plates coated with 1.5% agarose in distilled water. Each chamber contained 0.01 M Veronal buffer with an ionicity of 0.1 and pH 8.2. A constant current of 30 mA was applied for 30 or 60 minutes. These conditions were found to be optimal after testing different times, pH and mA values. After electrophoresis, the plates were stained with Amido Schwartz 10B and destained with a mixture 47.5% methanol, 5% acetic acid and water.

The fifty percent complement fixation method of the Microbiology Diagnostic Unit of the Communicable Disease Center was used throughout the study (25). The antigens used in the test were prepared as described above. Before use, each antigen was dialyzed against Veronal buffer, pH 7.4. Appropriate positive and negative human control sera were included in each series. Sera which permitted more than 30% hemolysis at the optimum antigen dilution were considered negative. Titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum yielding a positive reaction.

Animals and Sensitization

Groups of 125 male CD-1 mice, 4-6 weeks old, were sensitized with a series of three injections with formalin-killed mycelium of either *H. capsulatum* (strain 5026) or *C. immitis* (strain 218). The first two injections, one week apart were into the right hind footpad and consisted of 0.25 mg dry weight of fungus suspended in 0.05 ml Freund's incomplete adjuvant. The third inoculation was one week later and consisted of the same amount inoculated subcutaneously.

Footpad Testing

Footpad testing was performed using a swelling technique. The antigen was inoculated in 0.05 ml into the left hind footpad and thickness measurements made with a microtiter calibrator (27) prior to and at 4, 24, 48, and 72 hours following antigen challenge. The increase of footpad thickness is given by the difference (X_{t_0}) between the readings after the antigen challenge (X_{t_1}) and the readings

before the challenge (X_{t_0}). The raw data were converted into mean percent increases by the formula

$$\bar{X}_D = \frac{X_{t_1} - X_{t_0}}{n} 100$$

where n is the number of animals used in each assay. Groups of five sensitized and unsensitized animals were tested with crude histoplasmin and its fractions, as well as with crude coccidioidin and saline at 5 day intervals, beginning 10 days after the last immunizing inoculation.

MIF tests

MIF tests were carried out as previously described (4, 34), with some modifications. Peritoneal exudate was induced in immunized and unimmunized mice by the intraperitoneal injection of 3ml of sterile mineral oil 72 hours prior to harvest. The cells from 5 animals were pooled for the test, and after packing into capillary tubes and and placing in the chambers, they were incubated at 37°C for 24 hours. Areas of migration were determined with the aid of a projection microscope and polarplanimetry.

Results

Chemical Determinations on PPC and D-PPC

The polysaccharide, as determined by the anthrone reaction, was the major constituent of both preparations. However, protein was present in both as well. The ratio between polysaccharide and protein varied with the lot of extraction, but in the D-PPC it was approximately 3:1 or 4:1. Neither preparation had demonstrable RNA or DNA by the chemical tests. Moreover, when prepared as a 1 mg/ml solution, it had no absorbance at 260 nm in the spectrophotometer.

Serology

Both the PPC and D-PPC reacted with sera from cases of histoplasmosis to form a single line of precipitate with a reaction of identity in the agar gel diffusion test. Neither antigen reacted with the sera from patients with coccidioidomycosis nor with normal human sera (Fig. 1). Demonstration, then, did not modify the immunologic activity of the PPC. The CIE results confirmed the agar gel diffusion results for the D-PPC and the PPC antigens, although in some experiments, residual precipitin lines

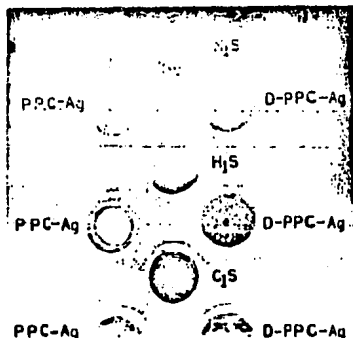
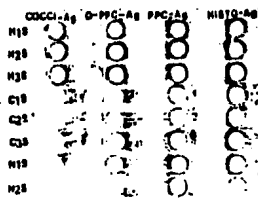


Fig. 1. Agar-Gel Diffusion—Center wells contained a normal human serum (N₁S), antiserum of a human histoplasmosis patients (H₁S) and antiserum of human coccidioidomycosis patients (C₁S); outer wells contained antigens: PPC-Ag at 1 mg/ml of carbohydrate with 0.9 mg/ml of protein, D-PPC-Ag at 1.3 mg/ml of carbohydrate with 0.4 mg/ml of protein.

could be observed with PPC, which is less purified than D-PPC (Fig. 2). An extensive number of CIE experiments with different conditions were performed, however D-PPC antigen never developed precipitin lines with heterologous antisera.

When crude histoplasmin and coccidioidin, as well as PPC and D-PPC were tested with normal sera and sera from patients with histoplasmosis or coccidioidomycosis



Ag-CONTROL

Fig. 2. Counterimmunoelectrophoresis with histoplasmosis sera (H₁, H₂, and H₃), coccidioidomycosis sera (C₁, C₂, and C₃) and normal sera (N₁, and N₂). Antigens were standardized according to carbohydrate component at concentration of 1.0-1.5 mg/ml. Electrophoresis conditions required: 1.5% agarose; Veronal buffer pH-8.2; constant current of 30 mA; time 60 minutes. Plate was stained with Amido Schwartz 10 B.

Table I. Complement fixation^(a) reaction. Relation between histoplasmin, PPC, D-PPC^(a) and coccidioidin antigens with homologous and heterologous human sera.

Serum ^(b)	C F titers ^(d)				Serum ^(b)	C F titers ^(d)			
	Antigens in 75 µg/ml of Protein ^(c)					Antigens in 100 µg/ml of Carbohydrate			
No.	Histo	PPC	D-PPC	Cocci	No.	Histo	PPC	D-PPC	Cocci
H ₁ S	1:4	1:4	1:128	1:8	H ₁ S	1:64	1:32	1:32	1:2
H ₂ S	-	1:2	1:2	-	H ₂ S	1:2	1:2	1:2	-
H ₃ S	1:8	1:16	1:8	1:4	H ₃ S	not done	not done	not done	not done
H ₄ S	1:512	1:64	1:16	1:256	H ₄ S	1:4096	1:4096	1:1024	1:8
H ₅ S	1:2	1:32	1:16	1:2	H ₅ S	1:8	1:8	1:16	1:2
H ₆ S	1:4	1:16	1:4	-	H ₆ S	1:8	1:4	1:8	1:2
H ₇ S	1:8	-	1:16	1:4	H ₇ S	1:8	1:4	1:16	1:4
H ₈ S	1:2	-	1:4	1:2	H ₈ S	-	-	1:4	-
H ₉ S	1:4	1:2	1:2	1:8	H ₉ S	1:2	1:2	1:2	-
H ₁₀ S	1:16	1:8	1:16	1:8	H ₁₀ S	1:16	-	1:16	1:8
H ₁₁ S	1:2	1:2	1:2	1:2	H ₁₁ S	1:4	-	1:4	-
H ₁₂ S	1:2	-	1:2	-	H ₁₂ S	1:8	1:8	1:8	1:16
H ₁₃ S	not done	not done	not done	not done	H ₁₃ S	1:2	1:2	1:4	-
C ₁ S	1:16	1:16	1:16	1:64	C ₁ S	1:32	1:128	1:8	1:64
C ₂ S	1:2	-	-	1:8	C ₂ S	1:128	1:4	1:4	1:64
C ₃ S	1:8	1:2	-	1:16	C ₃ S	-	-	-	1:128
C ₄ S	1:8	1:4	1:4	1:512	C ₄ S	1:8	1:8	1:2	1:512
C ₅ S	1:4	1:2	-	1:8	C ₅ S	-	-	-	1:2
C ₆ S	-	-	-	1:2	C ₆ S	1:2	-	-	1:2
C ₇ S	-	-	-	1:4	C ₇ S	1:2	-	-	1:8
C ₈ S	1:2	-	-	1:8	C ₈ S	not done	not done	not done	not done
NS (1 to 10)	negative				NS (1 to 10)	negative			

(a) Fifty percent complement fixation method was used.

(b) Abbreviations: H S, histoplasmosis sera; C S, coccidioidomycosis sera; N S, normal sera; PPC, polysaccharide-protein complex; D-PPC, deproteinized polysaccharide protein complex.

(c) Antigen concentrations: Histo-4270 µg/ml of carbohydrate and 770 µg/ml of protein; PPC-1500 µg/ml of carbohydrate and 730 µg of protein/ml; D-PPC-1370 µg/ml of carbohydrate and 399 µg/ml of protein; Cocci-2240 µg/ml of carbohydrate and 292 µg/ml of protein.

(d) Sera which present 30% plus hemolysis at an optimum antigen dilution were recorded as negative.

(-) (-) negative reaction.

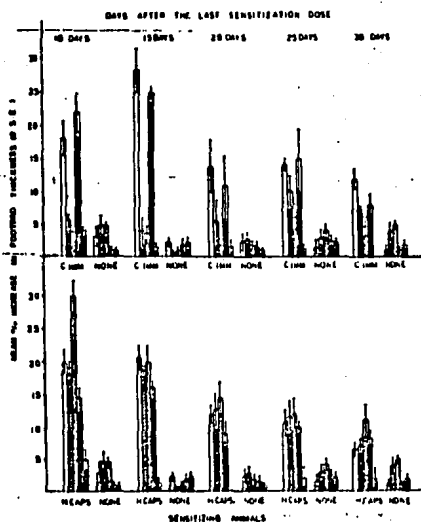


Fig. 3. Footpad swelling test at 24 hours in mice sensitized with *Histoplasma capsulatum* and *Coccidioides immitis*. Antigens tested at 20 μ g of protein per dose. Abbreviations: S.E.—standard error; PPC—polysaccharide-protein complex; D-PPC—deproteinized polysaccharide-protein complex.

□ H. CAPS. ■ PPC ▨ D-PPC ▩ COCCIDIOIDIN ■ SALINE.

in the complement fixation assay, the PPC and D-PPC were less specific, in that positive titers were obtained with heterologous sera (Table 1). The greatest degree of cross-reactivity, however, was noted with the crude coccidioidin and histoplasmin preparations.

Footpad Reactivity

The data obtained from footpad testing animals sensitized with *H. capsulatum* or *C. immitis* with the antigens, i.e., crude histoplasmin, crude coccidioidin, PPC and D-PPC are illustrated in Fig. 3 and 4. All reactions were maximum at 24 hours and there were no early Arthus-type inflammatory reactions with either the PPC or D-PPC preparations. Mice sensitized with *Histoplasma* were more reactive to PPC and D-PPC than those sensitized

with *Coccidioides* (Fig. 3 and 4). When the antigen was adjusted to 20 μ g protein per dose, the animals sensitized with *Coccidioides* and tested with PPC and D-PPC did not develop reactions significantly different from unsensitized animals until the twenty-fifth day following sensitization, and there were large differences between *Histoplasma* and *Coccidioides* sensitized animals at the 10 and 15 day testing periods. When the antigen preparations were diluted to obtain 50 μ g carbohydrate per dose, (such preparations then contained only 10–15 μ g protein), the specificity of the PPC and D-PPC preparations in *Histoplasma* sensitized animals was even more obvious and the differences in reactivity between *Histoplasma* and *Coccidioides* sensitized animals remained constant throughout the 30 days. In general, delayed hypersensitivity

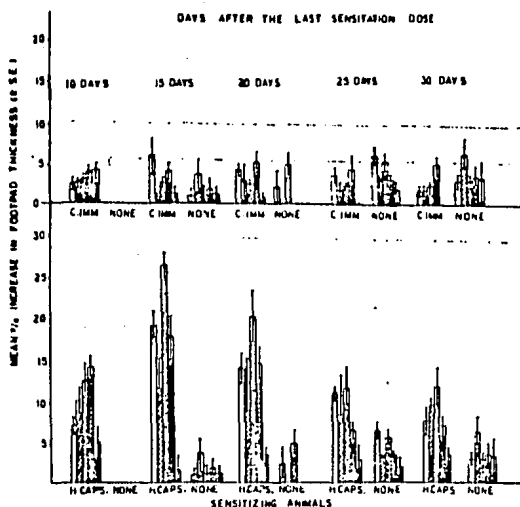


Fig. 4. Footpad swelling test at 24 hours in mice sensitized with *Histoplasma capsulatum* and *Coccidioides immitis*. Antigen tested at 50 μ g of carbohydrate per dose. See the legend to Fig. 3 for other explanations.

□ HISTOPLASMIN ▨ PPC ▩ D-PPC ■ COCCIDIIDIUM ■ SALINE.

Table 2. Macrophage migration inhibitory factor assays^(a) from mice sensitized with *Histoplasma capsulatum* or *Coccidioides immitis* in the presence of histoplasmin, PPC, D-PPC^(b) and coccidioidin antigens.

ANTIGENS	DOSE Antigens according to μ g/ml	% INHIBITION OF MIGRATION \pm SE ^(c)		
		SENSITIZED HISTOPLASMA CELLS	COCCIDIIDIUM	NORMAL CELLS
Histo	75 (protein)	68.0 \pm 5.6	24.0 \pm 3.0	11.6 \pm 3.1
	100 (carbohydrate)	76.2 \pm 2.3	41.3 \pm 5.8	8.0 \pm 2.3
PPC	75 (protein)	74.0 \pm 4.1	41.2 \pm 3.2	18.8 \pm 4.3
	100 (carbohydrate)	69.4 \pm 3.0	49.0 \pm 4.2	2.7 \pm 2.2
D-PPC	75 (protein)	60.0 \pm 5.4	48.8 \pm 5.0	14.0 \pm 2.3
	100 (carbohydrate)	48.6 \pm 8.4	46.0 \pm 4.5	13.0 \pm 0.6

(a) Assay on the 15th day after the last immunization dose.

(b) Abbreviations: PPC-polysaccharide-protein complex; D-PPC-deproteinized polysaccharide-protein complex.

(c) Mean inhibition of migration \pm standard error (%) from five experiments.

was maximal 10-15 days following immunization and declined thereafter. Of the two antigens, i.e., PPC and D-PPC, the D-PPC appeared more reactive.

MIF tests

The results of the MIF assay where in cells from mice sensitized with *Histoplasma* or *Coccidioides* were tested with crude histoplasmin, crude coccidioidin, PPC or D-PPC are summarized in Table 2. It is obvious from these data that there was considerable cross-reactivity detected. Inhibition of migration occurred with all homologous and heterologous combinations, although the inhibition observed with *Coccidioides* sensitive cells incubated with histoplasmin and PPC was somewhat less than that observed with *Histoplasma* sensitive cells and the same antigens. Inhibition greater than 20% was considered significant. Control cells were not inhibited by the antigens.

Discussion

The study of the antigens of *Histoplasma* capable of stimulating cellular immunity is of considerable importance because human susceptibility to this infection appears to be related to impaired lymphocyte responses (1, 3). Histoplasmosis in experimental animals provides an excellent experimental model for studying the events triggered during a cellular immune response.

We have isolated a polysaccharide-protein complex and its deproteinized fraction that could be a useful tool for diagnosis in histoplasmosis. These antigens detect human antibodies anti-*Histoplasma* with good specificity in such precipitin tests as immunodiffusion or CIE. Furthermore, experimentally we proved that using adequate dose in mice, our antigens are useful for detection of hypersensitivity stages. However, its application for cellular test in human beings were not explored.

Many investigators have fractionated histoplasmin, the cell wall or the whole fungus and have isolated protein or carbohydrate antigens with variable immune activity (6, 9, 14, 23, 31). Protein fractions are usually accepted as the most specific antigens, but some investigators have reported that the serologic and hypersensitive active fractions is a polysaccharide (22, 28). However, the possible role of protein contamination of the polysaccharide preparations can not be ruled out.

A major constituent of most fungi is a complex cell wall polysaccharide in which galactomannans are very important. Doerner (10, 11), Azuma (2), Reiss (26) and

other investigators have studied galactomannans or galactomannan-protein complexes from *Histoplasma* with activity in various test of cellular immunity. The specificity of the preparations has varied considerably. In some instances (26) galactomannan complexes had reduced activity when the complex was dissociated. Salvin (28) isolated a polysaccharide-protein complex from *Histoplasma* in which the carbohydrate moiety was perhaps the more important portion (28). The isolated antigens from *Histoplasma*, reported earlier (33) and used in these studies, which appear specific in in precipitin reactions, however, developed cross-reactivity in complement fixation and MIF tests.

On the basis of the footpad test, cross-reactivity between *Histoplasma* and *Coccidioides* could be reduced by diluting the preparations. Since the preparation treated with proteolytic enzymes was somewhat more reactive in the footpad assay, the carbohydrate moiety may be the more important. However, the D-PPC did retain some protein following Pronase and Sevag treatment, so that there is still the possibility that protein is involved in the specificity.

By using immunologic tests and adjusting the concentration of the preparations, subtle antigenic differences can be detected and antigenic preparations made which have a high degree of specificity.

Finally we would like to comment that we are aware that the negative findings for RNA with the orcinol method are somewhat surprising due to its usual sensitivity to some carbohydrate contamination. Nevertheless, we are confident of our results since the method proved adequate in detecting the RNA standard and yielded very levels for the isolated antigens. In addition the absence of RNA is further supported by the results of the absorbance in the spectrophotometer method.

Our future studies, if possible, will be to characterize the carbohydrate and the protein components and the sequence of the complex with its structural relationships, i.e., the spatial configurations of the molecules and compare with similar antigens obtained from other pathogenic fungi.

We think that these molecules may be very similar and they are important in the determination of the cross-reactivity and the specificity of the antigens from these fungi.

References

1. Adamson, D.M. & C.G. Cozad, 1969 Effect of anti-lymphocyte serum on animals experimentally infected with

Histoplasma capsulatum or *Cryptococcus neoformans*. *J. Bact.* 100: 1271-1276.

2. Azuma, I. et al. 1974. Chemical and immunological properties of galactomannan obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 54: 111-126.
3. Biggar, W.D.; H.J. Meuwissen & R.A. Good. 1971. Successful defense against *Histoplasma capsulatum* in hypogammaglobulinemia. *Arch. Intern. Med.* 128: 585-587.
4. Bloom, B.R. & H. Bennett. 1971. In vitro methods of cell mediated immunity. B.R. Bloom & P. Glade, Ed. Academic Press, New York. 235-248.
5. Bonilla-Sotto, O.; N.R. Rose & C.E. Alberman. 1961. Allergenic Molds. Antigenic and Allergenic properties of *Alternaria tenuis*. *J. Allergy*, 31: 246-270.
6. Bradley, G.; L. Pine; M.W. Reeves & C.W. Moss. 1974. Purification, composition and serological characterization of histoplasmin H & M antigens. *Infect. Immun.* 9: 870-880.
7. Campbell, C.C. & G.E. Binkley. 1953. Serologic diagnosis with respect to histoplasmosis, coccidioidomycosis and blastomycosis and the problem of cross reactions. *J. Lab. Clin. Med.* 42: 896-906.
8. Campbell, C.C.; M.E. Recca & C. Ganover. 1965. Reaction of *Histoplasma capsulatum* antigens in sera from mammalian species including man, infected with *C. amnitis*. Proceedings of the Second Symposium on Coccidioidomycosis 8-10 Dec., Phoenix, Arizona, 251-247.
9. Dickerson, Q.H. Jr. et al. 1968. Chromatographic separation of H and M antigens from histoplasmin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128: 654-658.
10. Domer, J.E. 1971. Monosaccharide and chitin contents of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *J. Bacteriol.* 107: 870-877.
11. Domer, J.E.; J.G. Hamilton & J.C. Harkin. 1967. Comparative study of the cell walls of the yeast-like and mycelial phase of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* 94: 466-474.
12. Dyson, J.E. Jr. & E.E. Evans. 1955. Delayed hypersensitivity in experimental fungus infections: The skin reactivity of antigens from yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. *J. Lab. Clin. Med.* 45: 499-454.
13. Hassid, W.Z. & S. Abraham. 1957. Chemical procedure for analysis of polysaccharides. I. Methods In *Enzymology*. SP Colowick & No. 0. Kaplan. Academic Press, New York 3: 34.
14. Jink, E.W. & D.G. Price. 1968. Chemical, serologic and dermal hypersensitivity activities of two fractions of histoplasmin. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 98: 474-478.
15. Kabat, E.A. 1961. In Kabat and Mayer's, *Experimental Immunochimistry*, 2nd. Ed. pp. 530-561 Ed. Charles, C. Thomas, Springfield, Ill.
16. Kaufman, L. et al. 1966. Occurrence of serotypes among *Histoplasma capsulatum* strains. *J. Bact.* 91: 1438-1439.
17. Kirby, K.S. 1956. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *J. Biochem.* 64: 405-407.
18. Kleger, B. & L. Kaufman. 1973. Detection and identification of diagnostic *Histoplasma capsulatum* precipitates by Counter-electrophoresis. *Appl. Microbiol.* 26: 231-238.
19. Lowry, O.H.; N.Y. Rosebraugh; A.L. Tarr & R.J. Randall. 1951. Protein measurements with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
20. Manyeh, J. 1970. Critical study of positive histoplasmin, coccidioidin, blastomycin and paracoccidioidin skin allergy test. *Czechoslovakia. Med. Fac. Hyg.* 10: 361-372.
21. Marcus, S. 1970. Immunity of histoplasmosis induced in mice by components of *Histoplasma capsulatum*. *Amer. Rev. Dis.* 102: 614-622.
22. Markowitz, H. 1964. Polysaccharide antigens from *Histoplasma capsulatum*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115: 697-700.
23. O'Connell, E.J.; P.E. Hermans & H. Markowitz. 1967. Skin reactive antigens of histoplasmin. *Exptl. Biol. Med.* 124: 1015-1020.
24. Quachterlony, O. 1962. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy* 6: 90-154.
25. Public Health Service. 1965. Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to microtest. U.S. Public Health Serv. Publ. 1228.
26. Reiss, E. & O. Mitchell. 1974. Cellular immune activity of a galactomann-protein complex from mycelia of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 10: 802-809.
27. Ruikin, D. et al. 1970. Delayed hypersensitivity to fungal antigens in mice. I. Use of the intradermal skin and foodpad swelling tests as assays of active and passive sensitization. *J. Infect. Dis.* 133: 50-56.
28. Salvin, S.B. & R.F. Smith. 1959. Antigens from the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*: III. Isolation properties and activity of a protein-carbohydrate complex. *J. Infect. Dis.* 105: 45-73.
29. Sevag, M.G. 1934. Eine neue physikalische. Enteisungsmethode zur Darstellung biologisch. Wirkamer Substanzen. Isolierung von Kohlenhydraten aus Huhnereisweiss und Pneumococcen. *Biochem. Z.* 273: 419-429.
30. Smith, C.E.; E.C. Whiting; E.C. Baker; H.G. Rosenberger; R.R. Beard & M.T. Saito. 1948. The use of coccidioidin. *Amer. Rev. Tuberc.* 57: 330-360.
31. Sprouse, R.F.; N.L. Goodman & H.W. Larsh. 1969. Fractionation, isolation and chemical characterization of skin test active components of histoplasmin. *J. Inst. Soc. Hum. Anim. Mycol.* 7: 1-11.
32. Sweet, G.H. 1971. Antigens of *Histoplasma capsulatum*: II. Separation and characterization of yeast-phase precipitogens. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 104: 401-407.
33. Taylor, M.L. & L.F. Hojahl. 1977. Immunologia de la histoplasmosis: Aislamiento de un complejo polisacárido-proteína (CPP) con actividad inmuno específica a partir de *Histoplasma capsulatum*. *Arch. Inv. Med.* 8: 91-102.
34. Thur, D.E. & S. Dray. 1968. A correlation of human delayed hypersensitivity: specific inhibition of capillary tube migration of sensitized human lymph node cells by tuberculin and histoplasmin. *J. Immunol.* 101: 51-61.
35. Tuesta, G. 1966. Biological relationships of *Blastomyces*, *Paracoccidioides* and *Histoplasma*. *An. Fac. Med. Lima* 48: 82-108.
36. Webb, J.M. & H.B. Levy. 1968. New developments in the chemical determination of nucleic acids. *Methods in Biochemical Analysis* 6: 1-30.

Antigens from *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*

I. Immunological comparative studies from polysaccharide-protein complexes of both fungi

M. R. Reyes-Montes, A. Martínez, C. Toriello & M. L. Taylor

Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M. México 20, D.F.

Abstract

Certain groups of fungi share chemical structures which makes difficult the isolation and differentiation of specific antigens by the usual methods of extraction and purification. Therefore, we have oriented our studies to the immunological and biochemical characterization of differences and similarities of molecular structures from fungi, etiologic agents of systemic mycoses, hoping to establish criteria for the utilization and handling of these antigens.

A deproteinized polysaccharide-protein complex (D-PPC) was isolated from *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. The immunological studies with humoral tests indicate a variable cross reaction between antigens of both species. In immunodiffusion systems, the reaction was specific for each species using saline solution or phosphate buffer solution, while using an agarose veronal system, the cross reactions were very evident. In addition, differences in cross reactions were obtained with immunoelectrophoresis, haemagglutination and complement fixation microtest. This variation in cross reaction responses suggest that these antigens (D-PPC) share common structures but at the same time must have some different component owned by each one of the fungi which makes them more specific than crude antigens.

Introduction

An urgent need to the present moment is the isolation of antigenic fractions of fungi as practical tools for diagnosis, epidemiological studies and experimental work.

In spite of the constant search for a specific and reactive antigen of the fungi *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* and *Paracoccidioides brasiliensis*, there is still no constant, stable and very specific antigenic component that has a uniform response in all tests and studies. The external components of these fungi have been identified and have shown chemical similarities, specially in cell walls. These chemical structures are generally of proteic nature, polysaccharide-protein complexes, α or β glucans, mannans, galactomannans, amino sugars, and

chitin (2, 6, 7, 12, 15, 21-25). It has also been observed that these similarities are present in both phases of growth as is the case of α glucans with predominant α (1-3) glycosidic linkages and less α (1-4) and α (1-6), in the yeast form of *H. capsulatum* (6, 7, 15) and *P. brasiliensis* (9, 12). In *B. dermatitidis* instead of α glucans there is a predominance of β glucans in the yeast form of this fungus (6, 15). By the contrary, the mycelial form of these fungi are enriched by β (1-3) glucans, and having *B. dermatitidis*, again the inverse. Therefore, variations in the cell wall of both forms in each fungus have been detected and would give different metabolites in both phases of these dimorphic fungi.

One of the principal antigenic fraction and possible structural feature of these fungi is a galactomannan, demonstrated by Azuma *et al.* (2)

among others. Nevertheless, this molecule is shared among these fungi as demonstrated by immune cross reactions obtained between them.

Differences and similarities (qualitative and quantitative) in physiological structures of both forms of these fungi and certainly between species would make us believe that the soluble metabolites could be similar and at the same time could have some specific difference among each one of the species. This difference could be masked by an easy detectable compound extracted or visualized by the usual chemical and immunological methods, or, the specific fraction could be so intimately united to the shared components that it could not be detected by the traditional methods used.

Therefore, we believe most important for the moment, to identify the similar or shared components rather than isolate individual molecules from each species, and subsequently, locate the particular element from each species. With this basis we have initiated a study comparing these fungal metabolites at biochemical, physico-chemical and immunological levels.

In the present study, *Blastomyces* and *Histoplasma* have been studied because they are the two species that present the greatest immune relation between them. This research is a comparative immunological analysis of a polysaccharide-protein complex (PPC), possible superficial structural molecule, obtained from the mycelial form of these fungal species.

Material and methods

Fungi

Histoplasma capsulatum strain number 5005, 5027, 5026 and *Blastomyces dermatitidis* strain number 5501, 5503, 5504 were obtained from Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de México (ISET). They were maintained in Brain Heart Infusion Agar (BHIA) (Difco Lab.).

Antigen extraction and partial purification of polysaccharide-protein complex

The final deproteinized fraction of these polysaccharide-protein complex (D-PPC) were obtained by Sevag method (20) and enzymatic

treatment (10, 21). The sequence of extraction and purification are schematized in Figure 1 and Figure 2. The histoplasmin or blastomycin were separated

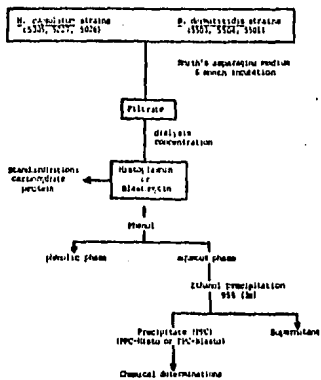


Fig. 1. Isolation of polysaccharide-protein complex (PPC) from crude antigens.

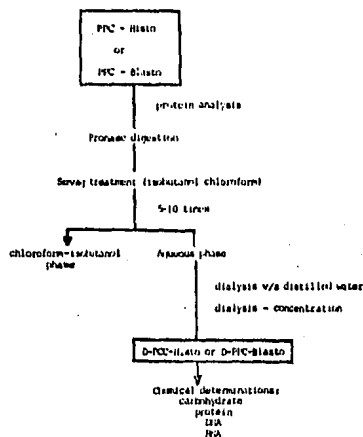


Fig. 2. Deproteinization of polysaccharide-protein complex (D-PPC).

by steril filtration of a 6 month Smith's asparagine medium culture at 26 °C. Then killed by exposure to 1% formalin during one week. The first step of extraction, with phenol (10 grs phenol/15 ml filtrate) followed by precipitation with ethylalcohol at 95%, separated a polysaccharide-protein complex (Fig. 1) (22). The final product, a deproteinized complex (D-PPC) was obtained by pronase (Pronase-E Merck) treatment (10, 21) and by the Sevag's method (chloroform-isobutanol extraction) (20).

Each D-PPC antigen was dialysed against distilled water for 24 hours, concentrated by dialysis using a Spectrapor membrane No 1 M.W: 6000-8000 and stored at -20 °C. Details of extraction and deproteinization were described in previous papers (21, 22).

Chemical determinations

Total protein content was determined by the procedure of micro-Kjeldahl (11) and by the method of Lowry *et al.* (13) with bovine serum albumin as the standard. For carbohydrate, phenol sulfuric acid (8) and anthrone (14) methods were used, with glucose as standard. All chemicals were reagent grade.

Serology

Histoplasmosis and coccidioidomycosis human serum samples were obtained from Dr. Velasco (ISET) from culturally proven cases of each disease. Two blastomycosis sera were a gift from Dr. L. Kaufman (CDC Atlanta, USA) and paracoccidioidomycosis sera were kindly received from Dra. A. Restrepo from Colombia. A normal negative human control serum were included in each series of tests.

The agar gel immunodiffusion test was performed by the method of Ouchterlony (16) using three different systems in 1.5% agarose base (Hoechst Lab.); agarose-saline solution (A-SS) agarose-phosphate buffer solution (A-PBS) pH 7.5 and agarose veronal (A-V), pH 8.0. All systems contained 0.01% sodium azide as preservative. After tests each plate was washed with saline solution and sodium citrate solution for 24-48 h. The plates were stained with 1% amido black in 7% acetic acid and washed with ethanol and acetic acid v/v.

The immunoelectrophoresis (17) was done on plates coated with 1.5% agarose in buffer sodium veronal pH 8.4. Each electrophoretic chamber contained 0.03 M veronal buffer pH 8.4. These conditions were the optimal for this test with 100V during 120 minutes. After electrophoresis the plates were stained and washed as in immunodiffusion.

Haemagglutination test was performed by the glutaraldehyde method (1) with each antigen in 0.02 M phosphate buffer pH 8.0.

The fifty percent hemolysis complement fixation microtest of the Microbiology Diagnostic Unit of the Communicable Disease Center was used throughout the study (18). Prior use, each antigen was dialysed against veronal buffer, pH 7.4. Titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum yielding a positive reaction. Sera which permitted more than 30% hemolysis at the optimum antigen dilution were considered negative.

All the antigens used were adjusted to carbohydrate concentration for precipitin tests, to protein concentration for haemagglutination tests and titers in 50% hemolysis for complement fixation microtest.

Results

The preliminar immunological analysis of the studied antigens was made by the usual humoral tests in diagnostic mycology. These tests detect antibodies of the early stages of the disease (precipitant IgG agglutinant IgM) as well as the complement fixing antibodies, in this case IgG, that appear later at the second to fourth week of infection. Instead of the routine test, latex agglutination, glutaraldehyde haemagglutination was used, due to its high sensitivity for comparative studies and more available material.

Chemical determinations of antigens were done to adjust a protein concentration of 50-60 mg/ml for haemagglutination test and approximately 500 mg/ml carbohydrates for immunodiffusion and immunoelectrophoresis tests.

Gel immunodiffusion

Similarities and differences among the antigen were emphasized in this test depending on the agarose system used. A good specificity was

observed with homologous sera in agarose saline solution and agarose phosphate solution. Nevertheless, cross reactions with heterologous sera were detected in agarose veronal system. All the systems were negative for normal control sera (Figs. 3 and 4). Figure 3A shows cross reactions between

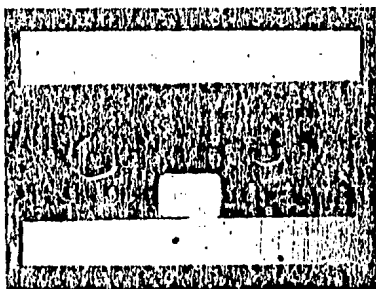


Fig. 3. Gel immunodiffusion of *Histoplasma* and *Blastomyces* antigens.

Antigens: 1. Blastomycin 5503, 2. D-PPC-Blasto 5503, 3. D-PPC-Histo 5005, 4. Histoplasmin 5005, 5. D-PPC-Histo 5026, 6. D-PPC-Blasto 5504.

Sera: SH. Histoplasmosis human serum, SN. Blastomyces human serum.

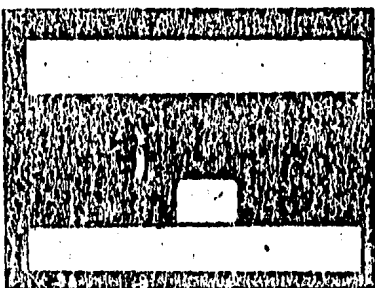


Fig. 4. Gel immunodiffusion of *Histoplasma* and *Blastomyces* antigens.

Antigens: 1. Blastomycin 5502, 2. D-PPC-Blasto 5501, 3. Histoplasmin 5027, 4. D-PPC-Histo 5027, 5. & 6. Saline solution.

Sera: SH. Histoplasmosis human serum, SN. Normal human serum.

blastomycin and each D-PPC-Blasto with *Histoplasma* serum, partial identity was made evident among them. Homologous antigens D-PPC-Histo and histoplasmin, developed a partial identity reaction. No identity reaction is present between Histo and Blasto D-PPC antigens. Figure 3B illustrates the reactivity of the same antigens with observed. Figure 4 repeats the reaction of antigens from *Histoplasma* and *Blastomyces* with *Histoplasma* and normal serum.

Immunoelectrophoresis

Sodium veronal buffer was used in similar condition as in gel immunodiffusion test. The reactivity in this test was homogenous and D-PPC-Histo gave a single precipitin band with homologous sera (Fig. 5). No reaction was observed with D-PPC-Blasto.

Haemagglutination

Results of this test are compared in Table I. Purified D-PPC antigens generally respond specifically to its homologous sera. Nevertheless when crude histoplasmin and blastomycin were used, cross reactions were evident in number and titers. Interpretation of this table indicate that D-PPC antigens present a better reactivity and a more homogenous response with its homologous sera than when using crude antigens. An exception was seen with paracoccidioidomycosis serum which reacted with D-PPC Blasto with a 1:8 titer.

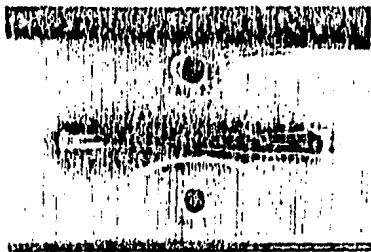


Fig. 5. Immunoelectrophoresis of D-PPC-Histo (Ag) and D-PPC-Blasto (Ag) with histoplasmosis human serum (S).

Table 1. Comparative results of haemagglutination with patients sera vs. crude and purified antigens of *Histoplasma* and *Blastomyces*.

Patients sera	Histoplasmin 51.3 µg/ml protein Titer ¹	D-PPC-Histo 60 µg/ml protein Titer ¹	Blastomycin 48.5 µg/ml protein Titer ¹	D-PPC-Blasto 52.0 µg/ml protein Titer ¹
Coccidioidomycosis (5)	1:512 (1/5)	1:4 (2, 5)	(-)(5/5)	1:2 (1, 5)
Paracoccidioidomycosis (7)	1:2 (3/7)	(-)(7/7)	1:2 to 1:4 (3/7)	1:8 (1/7)
Blastomycosis (4)	1:4 (1/4) 1:16 (1/4)	1:4 (2/4)	1:4 (1/4) 1:64 (2/4)	1:4 (1/4) 1:64 (2/4)
Histoplasmosis (28)	1:2 to 1:4 (7/28) 1:8 to 1:512 (11/28)	1:2 to 1:4 (9/28) 1:256 to 1:512 (6, 28)	1:2 to 1:4 (5/28) 1:8 to 1:128 (17/28)	1:2 (1/28)
Normal (7)	1:4 (2/7)	(-)(7/7)	1:4 (1/7)	(-)(7/7)

Haemagglutination was made by the glutaraldehyde method, readings at 2 and 24 h. Protein determinations of antigens were done by micro-Kjeldahl and Lowry procedures. Fraction in parenthesis indicate: number of sera haemagglutination titer/total numbers of proven sera.

¹ Titers range

Complement fixation microtest

In this test cross reactions were also evident (Table 2), nevertheless the cross reactivity of the purified antigens (Histo or Blasto D-PPC) was higher when compared with the haemagglutination test (Table 1). The results with blastomycosis and histoplasmosis sera make this clear. Furthermore,

the paracoccidioidomycosis sera had a greater reactivity in this test than with haemagglutination.

Discussion

The utilization of immunological procedures in mycological serodiagnosis, epidemiological studies

Table 2. Comparative results of complement fixation microtest with patients sera vs. crude and purified antigens of *Histoplasma* and *Blastomyces*.

Patients sera	Histoplasmin 50% hemolysis Titers ¹	D-PPC-Histo 50% hemolysis Titers ¹	Blastomycin 50% hemolysis Titers ¹	D-PPC-Blasto 50% hemolysis Titers ¹
Coccidioidomycosis (3)	1:2 (2, 3)	1:2 (2, 3)	1:2 (1/3)	(-)(3/3)
Paracoccidioidomycosis (3)	1:64 to 1:256 (6/6)	1:2 to 1:4 (3/6) 1:8 to 1:128 (3/6)	1:8 to 1:256 (6/6)	1:16 to 1:256 (6/6)
Blastomycosis (2)	1:2 (1/2)	1:2 to 1:4 (2/2)	1:4 (2/2)	1:4 (1/2)
Histoplasmosis (25)	1:2 to 1:4 (7/25) 1:8 to 1:128 (10/25)	1:2 to 1:4 (14/25) 1:8 to 1:16 (6/25)	1:2 to 1:4 (10/25) 1:8 to 1:32 (3/25)	1:2 to 1:4 (10/25) 1:8 to 1:32 (2/25)
Normal (7)	1:2 (2/7)	(-)(7/7)	1:2 (1/7)	(-)(7/7)

Complement fixation microtest at 50% hemolysis was performed as indicated by CDC serodiagnostic procedures. Fraction in parenthesis indicate: number of sera with complement fixing titer/total number of proven sera.

¹ Titers range

and laboratory research, have been widely used for several years. Nevertheless, there has always been a continuous search for better specific and reactive antigens concerning principally fungi that cause systemic infections.

In serodiagnosis procedures, detection of precipitin, complement fixation and latex agglutination antibodies are the most used techniques. Therefore the search of antigens with a uniform reactivity and good specificity are necessary in view to obtain a standardization based on an easy isolation and acceptable range of uniform results in mycological serodiagnostic laboratories throughout the world. With this idea we have initiated our study hoping to clarify and not confuse the actual knowledge in this area.

Gel immunodiffusion test, because of its great facility of performance, is one of the most used serodiagnostic procedures. Therefore it is interesting to note that cross reactions may be apparent or not, depending on the solvent used in this test: sodium veronal, saline solution or phosphate buffer solution. In our case when purified antigens D-PPC-Histo and D-PPC-Blasto were tested against its respective homologous, heterologous and normal sera, using saline and phosphate buffer solution, no cross reactions were observed. Nevertheless using sodium veronal as solvent, cross reactions were evident between D-PPC Blasto and D-PPC-Histo with heterologous sera.

The immunoelectrophoresis gives a greater resolution of the purified antigens, giving only one perfect band for D-PPC-Histo suggesting that this method of antigen extraction and deproteinization treatment gives an homogenous polysaccharide-protein complex mixture.

With haemagglutination and complement fixation tests, it is observed that D-PPC antigens are more specific than crude antigens (Tables 1 & 2) and considering agglutination titers of 1:8 and 1:16 as index of a presumptive infection or reactivity, we can see that haemagglutination test makes more evident the reaction between homologous systems using purified antigens.

It is obvious that cross reactions exist but these are much more evident with crude than with purified antigens. Nevertheless the paracoccidiodomycosis sera exhibits a high cross reactivity with both antigens (crude & purified) that we do not understand at the present moment.

In previous work (21, 22) the immunological study of D-PPC-Histo antigen with homologous human sera and coccidiodomycosis human sera as well as with cellular response in *Histoplasma* and *Coccidioides* sensitized mice apparently showed no cross reactions. This was also the case in precipitation tests when using agarose-saline solution and agarose-phosphate buffer solution. The present results corroborate our previous conclusions.

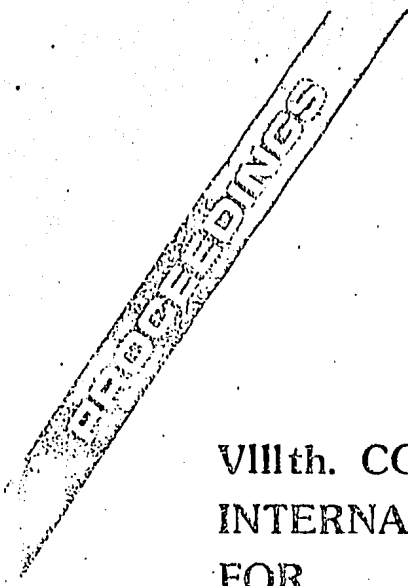
Although our results suggest similarities between the studied antigens, as revealed by the immune system recognition, there are also considerable differences between them, since the results are not uniform but quite variable.

There have been innumerable works on fungal antigens but unfortunately there has not been a common criteria in isolation and purification methods, and therefore no uniform results. In spite of very elaborate antigens in some qualified centers, these are not commonly available in poor mycological diagnostic laboratories throughout the world. Therefore we are certain that an International Symposium on Fungal Antigens would be of an enormous profit to all who work this area.

References

1. Avrameas, S., 1969. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochim.* 6: 43-52.
2. Azuma, I., Kanetsuna, F., Tanaka, Y., Yamamura, Y. & Carbonell, L. M., 1974. Chemical and immunological properties of galactomannan obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 54: 111-126.
3. Cox, R. A. & Larsh, H. W., 1974. Yeast and mycelial-phase antigens of *Blastomyces dermatitidis*: Comparison using disc gel electrophoresis. *Infect. Immun.* 10: 48-53.
4. Cox, R. A. & Larsh, H. W., 1974. Isolation of skin test active preparations from yeast-phase cells of *Blastomyces dermatitidis*. *Infect. Immun.* 10: 42-47.
5. Deighton, F., Cox, R. A., Hall, S. K. & Larsh, H. W., 1977. *In vivo* and *in vitro* cell-mediated immune responses to a cell wall antigen of *Blastomyces dermatitidis*. *Infect. Immun.* 15: 429-435.
6. Dömer, J. E., 1971. Monosaccharide and chitin contents of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *J. Bacteriol.* 107: 870-877.
7. Dömer, J. E., Hamilton, J. G. & Harkin, J. C., 1967. Comparative study of the cell walls of the yeast-like and mycelial phase of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* 94: 466-474.

8. Dubois, M., Giles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F., 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 168: 167.
9. Flores-Cutresin, A., Gómez-Villanueva, A. & San Blas, G., 1979. β -1-3-Glucanase and dimorphin in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 45: 265-274.
10. Gerety, R. F., Ferraresi, R. W. & Raffel, S., 1970. Polysaccharide in delayed hypersensitivity. I. Pneumococcal polysaccharide as inducer and elicitor of delayed reactivity in guinea pigs. *J. Exp. Med.* 131: 189-193.
11. Khat, E. A., 1961. In: Kabat and Mayer's. *Experimental Immunochimistry*, 2nd. Ed. pp. 530-561. Ed. Charles C. Thomas, Springfield III.
12. Kanetsuna, F., Carbonell, L. M., Aruna, I. & Yamamura, Y., 1972. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* 110: 208-218.
13. Lowry, O. H., Rosebrough, N. V., Farr, A. L. & Randall, R. J., 1951. Protein measurements with the Folin-Ciocalteu reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
14. Morris, D. L., 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's aniline reagent. *Science* 107: 254-255.
15. Odds, F. C., Kaufman, L., McLaughlin, D., Callaway, C. & Blumer, O., 1971. Effect of chitinase complex on the antigenicity and chemistry of yeast-form cell walls and other fractions of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *Sabouraudia* 12: 138-149.
16. Ouchterlony, O., 1962. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy* 6: 30-154.
17. Ouchterlony, O. & Nilsson, L. A., 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: *Handbook of Experimental Immunology*, Ed. D. M. Weir pp. 19.23-19.28. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
18. Public Health Service, 1965. Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to microtiter. U.S. Public Health Serv. Publ. 1228.
19. Salsun, S. B. & Smith, R. F., 1959. Antigens from the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. III. Isolation properties and activity of a protein-carbohydrate complex. *J. Infect. Dis.* 105: 45-73.
20. Sevag, M. G., 1934. Eine neue physikalische. Enteiweissungsmethode zur Darstellung biologisch. Wirkamen Substanzen. Isolierung von Kohlensäuren aus Hühner-eiweiss and Pneumococcen. *Biochem. Z.* 273: 419-429.
21. Taylor, M. L. & Hojaili, L. F., 1977. Immunología de la histoplasmosis: Aislamiento de un complejo polisacárido-proteína con actividad inmuno-específica a partir de *Histoplasma capsulatum*. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 8: 91-102.
22. Taylor, M. L., Reyes-Montes, M. R., Lachica, A., Estava-Campos, C., Olivera, J. & Maxwell, R., 1980. Immunology of histoplasmosis: humoral and cellular activity from a polysaccharide-protein complex and its deproteinized fraction in experimentally immunized mice. *Mycopathologia* 71: 159-166.
23. Ward, E. R. Jr., Cox, R. A., Schmidt, J. A. Jr., Hippert, M. & Sun, S. H., 1975. Delayed-type hypersensitivity responses to a cell wall fraction of the mycelial phase of *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* 12: 1093-1097.
24. Wheat, R. & Scherer, E., 1977. Cell walls of *Coccidioides immitis* neutral sugars of aqueous alkaline extracts polymers. *Infect. Immun.* 15: 340-344.
25. Wheat, R. W., Fritschler, C., Conant, N. J. & Lowe, E. P., 1977. Comparison of *Coccidioides immitis* arthrospore, mycelium, and spherule cell walls, and influence of growth medium on mycelial cell wall composition. *Infect. Immun.* 17: 91-97.



VIIIth. CONGRESS
INTERNATIONAL SOCIETY
FOR
HUMAN AND ANIMAL
MYCOLOGY

1982 MASSEY UNIVERSITY NEW ZEALAND

EDITED BY MICHAEL BAXTER

BIOCHEMICAL STUDIES OF POLYSACCHARIDE-PROTEIN ANTIGENS FROM FUNGI CAUSING SYSTEMIC MYCOSIS.

Toriello, C., Rosas, J.L., Martínez, A., Reyes-Montes, M.R., Latgé, J.P.* and Taylor, M.L.

Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., *Lutte Biologique, Institut Pasteur, Paris France.

Although much research has been done to obtain specific and reproducible antigens from dimorphic fungi causing systemic mycoses, results are still far from accurate. The recognition of different antigens in different cell types, the different extractions, immunological and analytical methods of characterization and identification of antigens from *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Coccidioides immitis* raises a great doubt about which would be the best for its routine use in fungal sero-diagnosis. Furthermore, the above facts justify the continuous research by each group of investigators in order to isolate and work with its own antigen. In previous works (10, 11) a deproteinized, polysaccharide-protein complex (D-PPC) was isolated with a good immunological activity from *H. capsulatum* and *B. dermatitidis*. Low cross reactions were found among these fungal antigens in common mycological serodiagnostic procedures. The facility of isolation and great stability makes its use possible as a current antigen in deep mycosis diagnosis. Therefore, it is our aim in the present study, to characterize this D-PPC in order to make obvious the possible biochemical similarities and differences and obtain a good standardization of these fungal molecules.

MATERIAL AND METHODS

Fungi. The four fungi used in this study were *Histoplasma capsulatum* (5005, 5026, 5027), *Blastomyces dermatitidis* (5504, 5501), *Coccidioides immitis* (49, 5221) and *Paracoccidioides brasiliensis* (Aurelio). All strains are from Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISCT), México. Fungi were grown in Smith's asparagine medium during six months at 26°C.

Antigens. Polysaccharide-protein complexes (PPC) were isolated by filtration (Millipore) of the culture medium (crude antigens), phenol extraction (10 ml phenol/10 g filtrate), dialysis and alcohol (90%) precipitation. The deproteinized polysaccharide-protein complexes (D-PPC) were obtained after Sevag (chloroform-butanol, 10X) and pronase (1%, 37°C, one week) treatment. **Chemical and Analytical Procedures.** Protein and total carbohydrate content of D-PPC were measured by Lowry (7) and phenol-sulphuric (1) methods respectively. Nucleic acids were determined by the orcinol (5) and 4-nitrophenyl hydrazine (12) methods. Hydrolysis of D-PPC was carried out in HCl 4N, during 4 hrs at 100°C and neutralized by KOH "in vacuo". Hydrolysates monosaccharide composition were determined by thin layer chromatography, and silane derivatives were prepared and separated by gas-liquid chromatography and quantified by peak area planimetry. Polyacrylamide gel electrophoresis of D-PPC's was realized with 5% acrylamide, electrophoresis at 100V during 2 hrs and then stained with Periodic Acid Schiff reagent.

Serum. Was obtained from a histoplasmosis patient with the disseminated form of the disease.

Serological test. Ouchterlony's agar gel immunodiffusion (8) was used to test the immunological activity from the four different antigens (D-PPC) with an histoplasmosis human serum.

RESULTS

Protein, total carbohydrates and nucleic acids from D-PPC's of all strains studied are shown in Fig. 1. Although two deproteinization methods were used, there was still from 1.3 to 9.3% of protein in each D-PPC. This protein fraction is strongly united to the polysaccharide fraction and we believe this

union is the most important part of the molecule.



Fig. 1 Chemical composition (%) of D-PPC antigens.

After hydrolysis of D-PPC's, thin layer chromatography detected three important sugars: glucose, mannose and galactose in all four fungi, while traces of hexosamines were detected in *H. capsulatum* and *C. immitis*. In Fig. 2 the monosaccharide composition (%) of the polysaccharide fraction by gas-liquid chromatography can be observed.

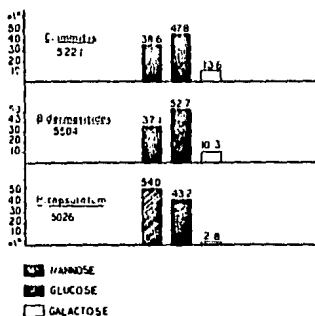


Fig. 2 Monosaccharide composition (%) from the polysaccharide fraction of D-PPC's.

In view of the very poor growth of *P. brasiliensis*, there was not enough D-PPC for this analysis. Current work is being done in order to obtain available material for this fungus. The percent of sugars present are very similar in the three fungi although galactose has a smaller proportion (2.8 - 13.6%) and there is more mannose than glucose for *H. capsulatum*. Polyacrylamide gel electrophoresis was done to observe the purity of the isolated

D-PPC (Fig. 3). After testing different acrylamide concentrations (5, 6, 7, 10, 12, 15%), the best resolution was obtained at 5% acrylamide, and 3 bands for *H. capsulatum*, two bands for *B. dermatitidis* and one band for *C. immitis* were made evident. None could be observed for *P. brasiliensis*.

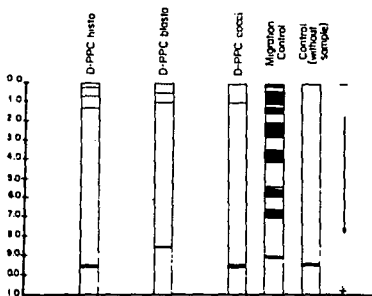


Fig. 3 Polyacrylamide gel electrophoresis of the D-PPC antigens (schematic representation).

The Ouchterlony immunodiffusion test was done (Fig. 4) in order to test the immunological activity of the D-PPC antigens, compare them with crude antigens: histoplasmin, blastomicin, coccidioidin, paracoccidioidin and observe cross-reactions between the four fungi.

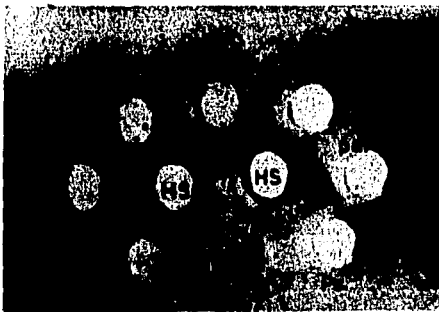


Fig. 4 Agar gel immunodiffusion of D-PPC's. Cd-coccidioidin, Pc-paracoccidioidin, Bm-blastomicin, Hp-histoplasmin, Hs-histoplasmosis human serum.

D-PPC's show less cross-reactions than crude antigens, although there are still cross-reactions between heterologous D-PPC's.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS.

Apart from its facility of isolation and stability, the isolated D-PPC gives a good immunological response and low cross-reactions in routine tests for systemic mycoses diagnosis.

H. capsulatum, *B. dermatitidis*, *P. brasiliensis* and *C. immitis* share some biochemical structures as has been demonstrated by different investigators. All four fungi contain glucose, mannose, galactose and chitin in their cell wall, although the glycosidic linkages or / and concentrations are different whether in the mycelial or yeast form. Therefore, antigens from these four organisms, which are derived from mycelial or yeast cell walls or whole cells, must probably contain similar structures and also, must have some particular or species specific structure.

The presence of common antigens by these microorganisms are responsible for the limitations on the immunological interpretation of the serodiagnosis of deep mycoses. This particular characteristic has been considered by many authors (4) who by bidimensional immunologic analytic procedures (Cross-immune electrophoresis, tandem crossed immunoelectrophoresis, etc), investigated the relationship among this group of fungi, demonstrating the common and different antigenic structures between them. Kashkin and cols (6) also made a comparative biochemical study of these molecules, using the usual methods of extraction, to obtain polysaccharides-rich or protein-rich fractions and also showing the known fact that protein-rich antigens are useful for detection of cellular immune response and, polysaccharide-rich fractions for detection of humoral immune response. They also made evident the cross reactions present among these fungi in humoral and cellular tests. Different authors have isolated specific antigens from each species, as are antigens H and M from *H. capsulatum*, (9) antigen A from *B. dermatitidis* (2), antigens A & B from *C. immitis* (3) and antigen E from *P. brasiliensis* (13). However, they can only be obtained after laborious and expensive methods which can not be established in all fungal serodiagnostic laboratories. All of these works have been made in order to clarify differences and similarities among these fungi in order to correlate host immunologic response with diagnosis, course and prognosis of clinical disease.

We certainly think then, that there must exist a standardization of antigens in order to obtain the characteristics of a good routine reactive: facility of isolation, low-cross-reactions, good specificity, high reproductibility and great stability. To attain this goal we think that all of us who work in this area should promote an international symposium on fungal antigens in order to exchange different knowledge and obtain consequently the so desired standardization of fungal antigens.

REFERENCES

1. Dubois, M., Giles, K., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. Nature, **168**, 167.
2. Green, J.H., Knox Harrell, W., Johnson, E.J., & Benson, R. 1980. Isolation of an antigen from *Blastomyces dermatitidis*, that is specific for the diagnosis of Blastomycosis. Current Microbiology, **4**, 293-296.
3. Huppert, M., Spratt, H.S., Vukovich, K.R., Sun, S.H., & Rice, E.H. 1978. Antigenic analysis of coccidioidin and spherulin determined by two-dimensional immunoelectrophoresis. Infection and Immunity, **20**, 541-551.
4. Huppert, M., Adler, J.P., Rice, E.H. & Sun, S.H. 1979. Common antigens among systemic disease fungi analyzed by two-dimensional immunoelectrophoresis. Infection and Immunity, **23**, 479-485.

5. Kabat, E.A. 1961. Experimental Immunochemistry, 2nd. ed. pp. 530-561. Charles C. Thomas, Springfield III.
6. Kashkin, K.P., Drozdov, A.I., & Ponomarenko, V.A. 1978. Comparative immunochemical studies of different antigens of deep mycoses pathogens. Annales d'Immunologie (Institut Pasteur), 129C, 287-300.
7. Lowry, O.H., Rosebrough, N.Y., Tarr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurements with the Folin reagent. Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275.
8. Ouchterlony, O. 1962. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progress in Allergy, 64, 30-154.
9. Pine, L., Gross, H., Bradley, G., Malcolm, G., George, J.R., Gray, S.B. & Moss, C.W. 1977. Procedures for the production and separation of H and M antigens in histoplasmin: chemical and serological properties of the isolated products. Mycopathologia, 61, 131-141.
10. Reyes-Montes, M.R., Martínez, A., Toriello, C. & Taylor, M.L. 1981. Antigens from Histoplasma capsulatum and Blastomyces dermatitidis. I. Immunological comparative studies from polysaccharide-protein complexes of Both fungi. Mycopathologia, in press.
11. Taylor, M.L., Reyes-Montes, M.R., Lachica, A., Eslava-Campos, C., Olvera, J. & Maxwell, R.Y. 1980. Immunology of histoplasmosis: humoral and cellular activity from a polysaccharide-protein complex and its deproteinized fraction in experimentally immunized mice. Mycopathologia, 71, 159-166.
12. Webb, J.M. & Levy, H.B. 1968. New developments in the chemical determination of nucleic acids. Methods in Biochemical Analysis, 6, 1.
13. Yarzabal, L.A., Bout, D., Haquira, F., Fruit, J. & Andrieu, S. 1977. Identification and purification of the specific antigen of Paracoccidioides brasiliensis responsible for immunoelectrophoretic band E. Sabouraudia, 15, 79-85.

INVESTIGACION DE LA RESPUESTA INMUNE A ANTIGENOS
FUNGICOS EN PACIENTES DE UN HOSPITAL DE
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

por: *Martín Becerril, **
*Gustavo Acosta, ***
*Jesús Casasola, **
*Fernando Reborá Gutiérrez, ****
*María Luisa Díaz Gómez, ****
*Oscar Velasco Castrejón, *****
María Lucía Taylor y*
*Conchita Toriello**

RESEARCH OF THE IMMUNE RESPONSE TO FUNGAL ANTIGENS
FROM PATIENTS OF A RESPIRATORY DISEASE HOSPITAL

In order to amplify the knowledge of systemic mycosis in Mexico, and characterize the possible associations with pulmonary disease, different immunological tests (precipitation, complement fixation, ELISA, skin test) were performed in 98 patients from different regions of the Mexican Republic hospitalized in a National Institute of Respiratory Diseases (which concentrates patients from the Mexican Republic), where 95% of the patients had chronic tuberculosis. Seven crude fungal antigens (histoplasmin, blastomycin, coccidioidin, paracoccidioidin, candidin, sporotrichin and aspergillin) and 3 purified antigens (deproteinized polysaccharide protein complexes,

-
- * Depto. de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M., México, D.F., 04510.
 - ** Lab. Inmunoquímica, Escuela de Medicina, I.P.N., México, D.F., 11940.
 - *** Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, S.S. México, D.F., 14080.
 - **** Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, S.S., México, D.F., 11940.

D-PPC): D-PCC-histo, D-PPC-cocci, and D-DPPC-paracocci were tested. The results indicated an immunosensitizing contact between patients and fungi and a greater reactivity of crude antigens than purified antigens was observed in the immunological tests used.

RESUMEN

Con el fin de ampliar el conocimiento del estado actual de las micosis profundas en México y caracterizar posibles asociaciones en padecimientos pulmonares o profundos, se realizaron diferentes pruebas inmunológicas (precipitación, fijación de complemento, ELISA, intradermorreacción) en 98 pacientes provenientes de distintas regiones de México hospitalizados en un sanatorio de enfermedades respiratorias (que concentra pacientes de toda la República Mexicana) donde el 95% de los pacientes padecían de tuberculosis crónica. Se probaron 7 antígenos fúngicos crudos (histoplasmina, blastomicina, coccidioidina, candidina, esporotricina y aspergilina) y 3 antígenos purificados (complejos polisacáridos-proteína deproteinizado CPP-D): CPP-D-histo, CPP-D-cocci, y CPP-D-paracocci. Los resultados indicaron un contacto inmunosensibilizante de los pacientes con los hongos y una mayor respuesta de los antígenos crudos que los purificados en las pruebas inmunológicas utilizadas.

INTRODUCCION

Desde que González Ochoa (1960) y Carrada (1962) realizaron un estudio de pacientes de diferentes hospitales de México para ver su respuesta a antígenos fúngicos, no se había vuelto a investigar sobre la incidencia de las micosis profundas en pacientes de enfermedades respiratorias. Teniendo en cuenta que la histoplasmosis es ya considerada en México una micosis importante en la salud pública (Velasco, 1985), además de que existen zonas endémicas de coccidioidomicosis y paracoccidioidomicosis en el país (Velasco, 1981; González Ochoa, 1967) y tomando en cuenta el frecuente diagnóstico de candidosis en centros hospitalarios, se consideró importante realizar el presente trabajo en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) que concentra pacientes de toda la República Mexicana. Debido al hecho de que en nuestro laboratorio se obtienen antígenos para el diagnóstico y pronóstico de las micosis profundas y oportunistas (Toriello *et al.*, 1982), nos pareció importante probar la reactividad y especificidad de antígenos crudos y purificados en diferentes pruebas inmunológicas en una población de pacientes con enfermedades respiratorias, con el fin de caracterizar posi-

bles asociaciones o antecedentes de enfermedades micóticas, ya que muchas veces éstos pacientes desarrollan infecciones concomitantes que dificultan la resolución del padecimiento.

MATERIALES Y METODOS

POBLACION ESTUDIADA: El estudio fue realizado en 98 pacientes del INER, a los cuales se les tomó 10 ml de sangre para obtener el suero y se les aplicó la intradermorreacción al día siguiente. Las características de los pacientes vienen descritas en la tabla I.

HONGOS: Para obtener los antígenos se utilizaron cepas de hongos aislados de casos humanos: *Histoplasma capsulatum* (cepa León Pérez), *Paracoccidioides brasiliensis* (ISET-5508), *Coccidioides immitis* (ISET-5221), *Blastomyces dermatitidis* (ISET-5005), *Aspergillus fumigatus* (EH-20), *Sporothrix schenckii* (CDP-705-78) y *Candida albicans* (EH-21). Las cepas fueron mantenidas en agar de Sabouraud a 26°C en el laboratorio.

ANTIGENOS: Se obtuvieron 7 antígenos crudos y 3 purificados. Las histoplasmina, blastomicina, paracoccidioidina y coccidioidina fueron obtenidas del cultivo en medio de Smith con asparagina después de 3-4 meses de incubación a 26°C. Cada filtrado fue 10 veces concentrado de su volumen inicial, obteniéndose así los antígenos crudos mencionados. Las histoplasmina, paracoccidioidina y coccidioidina fueron purificadas posteriormente por medio de la técnica de Kirby (1956) modificada por Taylor (1977). A 10 ml de filtrado concentrado se le agregaron 10 grs de fenol líquido. Se separó la fase acuosa, la cual fue precipitada por etanol al 95%. Este precipitado fue posteriormente desproteinizado por pronasa al 1%, 37°C, durante 7 días (Taylor, 1977; Sevag, 1934), obteniendo así los antígenos purificados denominados complejos polisacárido-proteína desproteinizados (CPP-D) de *H. capsulatum* (CPP-D-histo), *P. brasiliensis* (CPP-D-paracocci) y *C. immitis* (CPP-D-cocci).

La aspergilina fue obtenida del filtrado del cultivo de *A. fumigatus* con 1 mes de incubación a 26°C en medio de Czapek modificado (dextrosa en lugar de sacarosa). El filtrado fue dializado y concentrado 10 veces y precipitado posteriormente por acetona en frío. La esporotricina fue obtenida del filtrado del cultivo de 3 meses de incubación de *S. schenckii* a 26°C en medio sintético de Mariat (Toriello y Mariat, 1974). El filtrado también fue dializado y concentrado para su posterior precipitación por alcohol (3X) y secado por acetona en frío.

La candidina fue obtenida de levaduras cultivadas a 37°C, en medio semisintético constituido por: dializado de extracto de levadura 10 g, KH_2PO_4 1 g, KCL 0.5 g, FESO_4 0.01 g, MgSO_4 0.5 g, y glucosa 30 g, c.b.p. 1000 ml. Después de 48 horas de incubación, las células fueron muertas con formol al 0.5% y lavadas tres veces con solución salina. Las levaduras se rompieron por medio del fraccionador RIBI a 40,000 psi, 7 veces por 5 segundos. Se procedió a una centrifugación (250Xg) para eliminar el debris celular y el sobrenadante fue utilizado como antígeno. A todos los antígenos utilizados se les determinó proteína (según Lowry, 1951) y carbohidrato (según Morris, 1948).

INTRADERMORREACCION (IDR)

Para la prueba intradérmica, se regularizaron los antígenos en reactores conocidos aproximadamente 10 μg proteína/0.1 ml de solución salina isotónica estéril. Solamente la esporotricina fue utilizada a una dilución de 1/2000 que corresponde a 3.5 μg proteína/0.1 ml. La prueba se realizó aplicando 0.1 ml intradérmicamente en la cara interna del antebrazo. Se leyó a las 24 y 48 horas, considerándose positiva la reacción con eritema e induración mayor de 5 mm de diámetro.

PRUEBAS SEROLOGICAS

El suero separado de cada paciente fue distribuido en alícuotas y almacenado en congelación con azida de sodio como conservador.

La inmunodifusión (ID) se desarrolló según la técnica de Ouchterlony (1978) con una solución amortiguadora de glicina (7.5% glicina, 0.9% NaCl y 0.1% azida de sodio) con 1% de agarosa. La contrainmunolectroforesis (CIE) se llevó a cabo utilizando solución amortiguadora de veronal pH 8.2 con 1% de agarosa y una corriente de 1 mA por placa durante 1 hora. La reacción de fijación de complemento (RFC) se realizó según la técnica del 50% de hemólisis (Manual OPS, OMS, 1975) y finalmente para la prueba de ELISA (Ensayo Inmunoenzimático), se procedió según la técnica de Voller *et al.* (1979) utilizando un conjugado anti-IgG anti-IgM marcado con fosfatasa alcalina (Cordis-USA) estimada por absorbancia a 405 nm, corrigiendo los valores con la absorbancia no específica de sueros normales. Esta técnica sólo fue llevada a cabo en los sueros que presentaron reacción positiva a las pruebas de inmunodifusión y contrainmunolectroforesis para comparar la reactividad y sensibilidad de los antígenos crudos y purificados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó con tablas de contingencia para calcular la significancia (P) por medio de χ^2 .

RESULTADOS

La población de pacientes estudiada procedió en su mayoría del pabellón 5 del Instituto de Enfermedades Respiratorias, constituida totalmente de mujeres entre 17 y 75 años de edad y de las cuales el 75.7% padecían de otras enfermedades respiratorias (Tabla 1). Tomando en cuenta la división de la República Mexicana en doce regiones de mayor a menor marginación de la población según el IMSS-COPLAMAR (Tabla 2), se puede observar que la mayoría de los individuos provenían de la zona centro del país (Estados de México y Morelos: 27.55%) y del Distrito Federal (20.4%). Por otro lado, es importante destacar la ausencia de enfermos provenientes de las zonas sureste y pacífico norte. Con respecto a la edad de los pacientes, que oscilaba en un rango de 17 a 75 años, se encontró que el 92% de los casos que resultaron positivos a las pruebas intradérmicas realizadas, correspondían a individuos de menos de 60 años y un 7.47% a mayores de 60 años (Tabla 3).

La aplicación de la prueba intradérmica (IDR) con los 7 antígenos en la población estudiada, mostró que el mayor número de reactores positivos a éstos antígenos fúngicos provenían de los estados de México, Morelos y D.F. (Fig. 1), lo que corresponde asimismo al mayor número de pacientes de esta zona (Tabla 2). En la fig. 1 podemos observar una reactividad a la IDR del 1% a la histoplasmina en la región Centro, 8.1% a la coccidioidina en las regiones del Golfo Centro y D.F.; 11.2% a la paracoccidioidina en las regiones del Golfo Centro; 12.2% a la blastomicina en las regiones del Centro, D.F., Golfo Centro, Centro Este, Pacífico Centro; 5.1% a la esporotricina en las regiones Centro, D.F., Golfo Centro, Pacífico Centro; 17.3% a la candidina de las regiones del Centro, D.F., Golfo Centro, Centro Este, Pacífico Sur, Pacífico Centro, Norte; y por último 5.1% a la aspergilina en las regiones del Centro, Centro Este, Pacífico Sur y Pacífico Centro.

En la Tabla 4 se puede observar el resultado de las pruebas de inmunodifusión en gel (ID) y contraelectroforesis (CIE). La mayor reactividad la encontramos con el antígeno de paracoccidioidina, tanto en ID como en CIE. La blastomicina fue negativa para todos los pacientes en ID, sin embargo, se encontró un 28.5% de reactividad en CIE.

Teniendo en cuenta que el 12% de las pacientes estudiadas presentaban tu-

TABLA I

POBLACION ESTUDIADA

NUMERO:	98 pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.	
EDAD:	17 - 75 años.	
SEXO:	Femenino	
DIAGNOSTICO:	Tuberculosis	75.5 %
	Tuberculosis y diabetes	12.0 %
	Otras enfermedades respiratorias.	12.3 %

berculosis y diabetes y ésta última afección es un factor predisponente en la adquisición de micosis oportunistas, se trató de relacionar los resultados de las pruebas realizadas en estas pacientes con asociaciones micóticas y se encontró en tres de ellas una probable asociación con candidosis ya que presentaron positividad en las pruebas de fijación de complemento, contraimmunoelectroforesis y a la intradermoreacción con el antígeno candidina (Tabla 5).

Para tratar de encontrar una correlación entre las distintas pruebas inmunológicas utilizadas, se realizó un análisis estadístico por χ^2 y se encontró que al correlacionar las pruebas de IDR e ID no había correlación ($P > 0.05$) para cada uno de los antígenos. Por otro lado al analizar la IDR con la CIE utilizando el antígeno coccidioidina, se encontró una correlación ($p < 0.05$) la misma que se detectó con la candidina al correlacionar la IDR con la RFC ($p < 0.05$) (Tabla 6). Sin embargo, con los otros antígenos estudiados no se logró observar ninguna correlación ($p > 0.05$).

Para valorar la utilidad de los antígenos purificados frente a los antígenos crudos, éstos fueron confrontados en pruebas de inmunodifusión, contraimmunoelectroforesis y ELISA.

TABLA 2
PROCEDENCIA DE LOS PACIENTES EN LA REPUBLICA
MEXICANA*

REGIONES	%	REGIONES	%
Pacífico Sur Chiapas Guerrero Oaxaca	17.3	Pacífico Centro Durango, Nayarit Sinaloa	2.04
Centro Este Hidalgo Puebla Tlaxcala	10.2	Centro México Morelos	27.55
Centro Norte San Luis Potosí Zacatecas	1.02	Occidente Aguascalientes Colima Jalisco	1.02
Centro Occidente Guanajuato Michoacán Querétaro	1.02	Norte Coahuila Chihuahua Nuevo León Tamaulipas	2.04
Sureste Campeche Quintana Roo Yucatán	0	Pacífico Norte Baja California Norte Baja California Sur Sonora	0
Golfo Centro Tabasco Veracruz	14.2	Distrito Federal Ciudad de México	20.4

* La procedencia de los pacientes fue considerada de acuerdo a la regionalización de la República Mexicana por el IMSS-COPLAMAR.

TABLA 3

RELACION ENTRE LA EDAD DEL PACIENTE Y SU RESPUESTA A
ANTIGENOS FUNGICOS EN IDR

ANTIGENOS CRUDOS	E D A D*	
	< 60 AÑOS CASOS POSITIVOS (%)	>60 AÑOS CASOS POSITIVOS (%)
Histoplasmina	1	0
Coccidioidina	7.4	1.1
Paracoccidioidina	11.6	0
Blastomicina	11.6	1.1
Esporotricina	4.2	1.1
Candidina	16.8	1.1
Aspergilina	5.3	0
TOTAL DE CASOS	92.6	7.4

*Rango de edad de los pacientes: 17-75 años.

IDR=INTRADERMORREACCION

TABLA 4

RESPUESTA DE LOS ANTIGENOS CRUDOS FRENTE A PRUEBAS DE INMUNODIFUSION Y CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

ANTIGENOS	PRUEBAS HUMORALES	
	INMUNODIFUSION %	CONTRAINMUNO ELECTROFORESIS %
Histoplasmina	7.1	27.5
Blastomicina	0	28.5
Paracoccidioidina	18.3	43.8
Coccidioidina	1.0	23.4
Esporotricina	1.0	19.3
Candidina	3.0	3.0
Aspergilina	9.1	3.0

Como se puede observar en la tabla 7, la reactividad de los sueros frente a los antígenos de *Histoplasma*, *Coccidioides* y *Paracoccidioides* baja a 0 en las pruebas de ID y CIE al utilizar los antígenos purificados (CPP-D's). En la tabla 8 podemos observar también que el porcentaje de reactividad se reduce en la prueba de ELISA al utilizar los antígenos purificados.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La población de pacientes estudiados correspondió solamente a mujeres, debido a que se inició el estudio en un pabellón del hospital que comprendía únicamente pacientes de sexo femenino. El estudio continuará más adelante con otros pabellones, donde la población comprenda también individuos del sexo masculino. Sin embargo, la característica del sexo de esta población estudiada debe ser tomada en consideración, ya que se ha tratado de comprometer diferentes respuestas de susceptibilidad del huésped a infecciones fúngicas dependiendo del sexo del sujeto. A nivel experimental se ha visto que las hembras desarrollan más resistencia a la enfermedad en modelos animales frente a infecciones por *Histoplasma capsulatum* (Taylor *et al.*, 1982) y *Cryptococcus neoformans* (Muchmore *et al.*, 1982). Sin embargo, en humanos, la menor frecuencia de infecciones fúngicas en el sexo femenino se ha

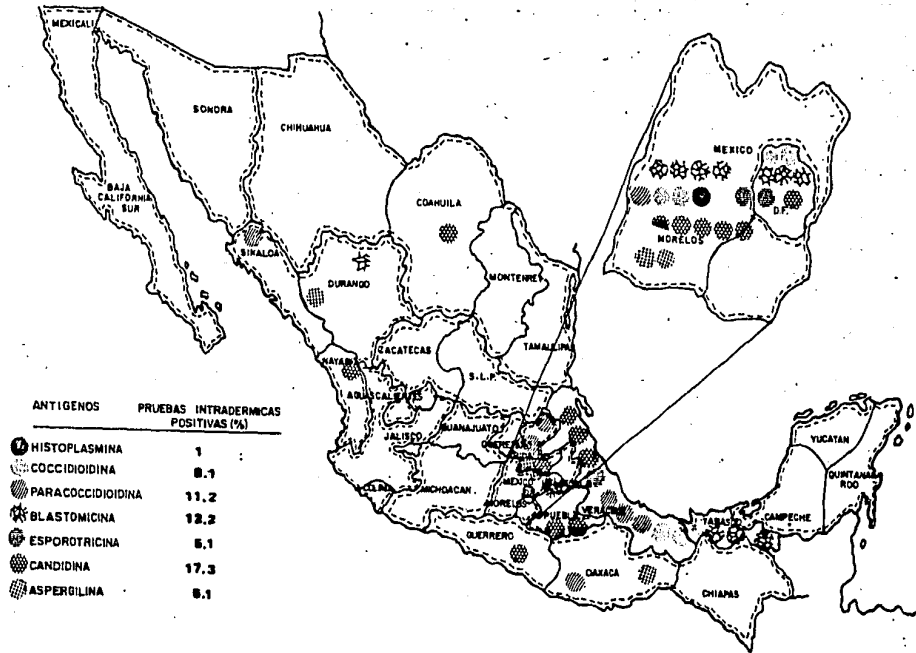


Fig. 1. Relación entre pruebas intradérmicas a antígenos fúngicos y la procedencia de los pacientes.

TABLA 5

RELACION ENTRE PACIENTES CON TUBERCULOSIS/DIABETES
Y POSITIVIDAD A PRUEBAS INMUNOLOGICAS
CON ANTIGENOS FUNGICOS

PACIENTES	DIAGNOSTICO	POSITIVIDAD PRUEBAS INMUNES	ANTIGENO
A.M.G.	Tuberculosis Diabetes	CIE, IDR. RFC (1:64)	Candidina
L.M.A.	Tuberculosis Diabetes	IDR RFC (1:16)	Candidina
E.O.E	Tuberculosis Diabetes	RFC (1:8)	Candidina

El 12% de todos los pacientes estudiados presentaron tuberculosis y diabetes.

TABLA 6

CORRELACION ENTRE PRUEBAS INMUNES Y ANTIGENOS FUNGICOS

TODOS LOS ANTIGENOS	IDR/ID	P > 0.05*
COCCIDIOIDINA	IDR/CIE	P < 0.05
CANDIDINA	IDR/RFC	P < 0.05

* Análisis estadísticos por χ^2

IDR: Intradermorreacción.

ID: Immunodifusión.

RFC: Reacción de Fijación de Complemento

TABLA 7

COMPARACION DE ANTIGENOS FUNGICOS, CRUDOS Y PURIFICADOS EN PRUEBAS INMUNOLOGICAS

ANTIGENOS	REACTIVIDAD	
	ID %	CIE %
Histoplasmina	7.1	27.5
CPP-D-histo	0	0
Coccidioidina	1.0	23.5
CPP-D-cocci	0	0
Paracoccidioidina	18.4	43.9
CPP-D-paracocci	0	0

ID: Immunodifusión

CIF: Contrainmunolectroforesis.

TABLA 8

COMPARACION DE ANTIGENOS FUNGICOS CRUDOS Y PURIFICADOS (CPP-D) EN ELISA

ANTIGENOS	ELISA* % DE REACTIVIDAD **
HISTOPLASMINA CPP-D	66.6 46.6
COCCIDIOIDINA CPP-D	53.3 NIH
PARACOCCIDIOIDINA CPP-D	40 33.3

* Elisa indirecta utilizando un conjugado con fosfatasa alcalina anti IgG, anti IgM (CORDIS-USA), estimada por absorbancia a 405 nm, corrigiendo los valores con la absorbancia no específica de sueros normales.

** De 15 sueros con bandas en inmunodifusión y contraelectroforesis. NIH no hecho.

relacionado con el carácter ocupacional del huésped, ya que son los hombres los que están más expuestos al hábitat natural del hongo debido a su actividad laboral (Rippon, 1974). Estas observaciones deben ser tomadas en cuenta para explicar la baja reactividad en pruebas cutáneas, por ejemplo, a antígenos de *H. capsulatum* (1%), *C. immitis* (8.1%), *P. brasiliensis* (11.2%), entre otros. Al ubicar la procedencia de los pacientes según las regiones de la República Mexicana, se observó que la reactividad de los antígenos en su mayoría, correspondía a zonas endémicas para los diferentes hongos estudiados, por ejemplo, la mayoría de los pacientes reactivos a la IDR con paracoccidiodina provenía de la región que comprendía el Estado de Veracruz, la cual coincide con una de las zonas endémicas más importantes de paracoccidiodinosis en México. Sin embargo, la prueba de la coccidiodina fue la única que no pudo relacionarse con la conocida zona endémica de coccidiodinosis en los Estados del norte de la República. Este hecho puede explicarse de dos ma-

neras, una, que el paciente en algún momento estuvo en la región endémica habiéndose sensibilizado, o bien, la respuesta detectada puede deberse al cruce de otros antígenos como la paracoccidioidina e histoplasmina.

Los resultados obtenidos con blastomicina ameritan una discusión particular, ya que el haber encontrado una reactividad de 28.5% en CIE (Tabla 4) se debe posiblemente al conocido hecho de la gran reactividad cruzada que presenta *B. dermatitidis* con *H. capsulatum* y *P. brasiliensis* y la mayor sensibilidad de la técnica de CIE sobre otras pruebas como la ID que pudieran poner de manifiesto estos resultados falsos positivos, considerando que esta enfermedad no ha sido descrita en México.

Las características de asociación de la infección tuberculosa con infecciones por hongos, se ve bien ejemplificada en la relación tuberculosis/diabetes (12%). El hecho de que el 25% de estos pacientes presentaron pruebas inmunes positivas a la candidina (Tabla 5), sugiere fuertemente una asociación con *Candida* lo que es muy frecuente en pacientes diabéticos.

El empleo de las diferentes pruebas inmunes con los antígenos fúngicos nos permitió discriminar aquellas pruebas que presentaban una mayor relación, observando que las pruebas que más correlacionaban entre sí fueron la IDR con la CIE al utilizar la coccidioidina y la IDR con la RFC al utilizar candidina (Tabla 6). Esto podría sugerir la importancia del uso de estas pruebas para el diagnóstico y pronóstico de padecimientos micóticos.

De un modo general, los antígenos crudos presentaron una mayor reactividad que los antígenos purificados, particularmente en pruebas de menor sensibilidad como la inmunodifusión en gel y la contraelectroforesis (Tabla 7) donde los antígenos purificados no fueron funcionales, sin embargo, estos antígenos son útiles en pruebas de mayor sensibilidad como la ELISA. A pesar de presentar menor reactividad que los antígenos crudos, éstos son quizás más útiles porque exhiben un menor grado de reactividad cruzada. Los antígenos crudos por reaccionar en pruebas de fácil manejo y rápida detección, serían los ideales para estudios de tipo general y epidemiológicos, mientras que los purificados los ideales para pruebas de diagnóstico y pronóstico.

Finalmente, el estudio indicó un probable contacto de los pacientes con los agentes etiológicos de las micosis estudiadas y el ampliar la población de trabajo, sobre todo la del sexo masculino, nos dará una indicación más clara de la respuesta de la población a los antígenos fúngicos utilizados.

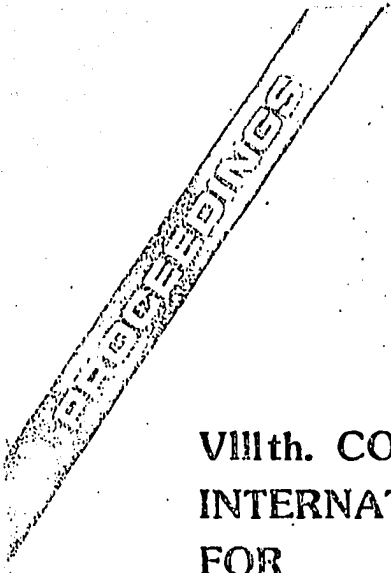
AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fué financiado por el CONACYT (PCSABNA-021454), Institución a la que se le expresa un reconocimiento. Se agradece ampliamente a Gabina Arenas y Anclía Pérez por su ayuda en la obtención de los antígenos utilizados en este estudio.

LITERATURA CITADA

- Carrada, L.P., 1962. Encuesta epidemiológica de micosis en hospitales para tuberculosos. *Rev. Med. IMSS*. 50: 33-38.
- González Ochoa, A. y M.L. Furcolow, 1960. Histoplasmosis in a Mexican Sanatory. *Lab. Invest.* II: 1134-1139.
- González Ochoa, A., 1967. Coccidioidomycosis in Mexico. *Proceedings 2nd. Coccidioidomycosis Symposium. Universidad of Arizona Press, Tucson.*
- Kirby, K.S., 1956. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *J. Biochem.* 64: 405.
- Lowry, O.H., N.Y. Rosebrough, A.L. Tarr y R.T. Randall, 1951. Protein measurements with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Morris, D.L., 1948. Quantitative determination of carbohydrates with dreywood's anthrone reagent. *Science* 107: 254-255.
- Muchmore, H.G., E.N. Scott, F.G. Felton y R.A. Fromtling, 1982. Sex differences in the virulence of *Cryptococcus neoformans* for adult mice. In: M. Baxter (Ed.), *Proceedings VIII Congress of ISHAM, Massey University, Palmerston North, Nueva Zelandia*, pp. 152-155.
- OPS, 1975. *Manual de procedimientos estandarizados para el serodiagnóstico de las micosis sistémicas, II. Reacciones de fijación del complemento.* Oficina Sanitaria Panamericana. *Publ. Cient.* 307, Washington, D.C.
- Ouchterlony, O. y L.A. Nilsson, 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Qeir D. M. (Ed), *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Rippon, J.W., 1974. *Medical Mycology*. W.B. Saunders. Filadelfia.
- Sevag, M.G., 1934. Eine neue physikalische Enteiweissungsmethod zur darstellung biologisch. Wirksamer substanzen. Idolierung von Kohlenhydraten aus huhnereiweiss and pneumococcen. *Biochem Z.* 273: 419-429.
- Taylor, M.L. y L.F. Bojalil, 1977. Inmunología de la histoplasmosis. Aislamiento de un complejo polisacárido-proteína con actividad inmunoespecífica a partir de *Histoplasma capsulatum*. *Arch. Invest. Med. (Méx)*. 8: 91-102.

- Taylor, M.L., M.R. Reyes Montes, G.R. González, J. Casasola y A. Hernández Ramírez, 1982. Immune response changes with age and sex as factors of variation in resistance to *Histoplasma* infection. In: M. Baxter (Ed), Proceeding VIII Congress of ISHAM, Massey University, Palmerston North, Nueva Zelandia. pp. 260-264.
- Toriello, C. y F. Mariat, 1974. Etude comparée des polysides des champignons *Ceratocystis stenoceras* et *Sporothrix schenckii*. Composition chimique et analyse immunologique. *Ann Microbiol. (Institut Pasteur)* 125A: 287-307.
- Toriello, C., J.L. Rosas, M.R. Reyes Montes, y M.L. Taylor, 1982. Biochemical studies of polysaccharide protein antigens from fungi causing systemic mycosis. In: M. Baxter (Ed.), Proceedings VIII Congress ISHAM Massey University, Palmerston North, Nueva Zelandia. pp. 220-224.
- Velasco, O., 1981. Paracoccidioidomycosis. Informe técnico No. 5, Dir. Gral. de Epidemiología, S.S.A. México.
- Velasco, O., 1985. Aspectos epidemiológicos de la histoplasmosis en México. *Rev. Inv. Sal. Pub. (Mex.)* (En Prensa).
- Voller, A., D.E. Bidwell y A. Bartlett, 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Nuffield Laboratories of comparative Medicine & The Zoological Society of London, Londres.



**VIIIth. CONGRESS
INTERNATIONAL SOCIETY
FOR
HUMAN AND ANIMAL
MYCOLOGY**

1982 MASSEY UNIVERSITY NEW ZEALAND

EDITED BY MICHAEL BAXTER

IMMUNE RESPONSE CHANGES WITH AGE AND SEX AS FACTORS OF VARIATION IN
RESISTANCE TO HISTOPLASMA INFECTION

Taylor, M.L., Reyes-Montes, M.R., González-G. R., Casasola, J. and Hernández-Ramírez, A.

Depto. Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M. México.

The different susceptibility shown by men to infectious diseases has been related to the host properties like age, sex, genetic inheritance, nutritional and social conditions, immunosuppression, etc.

The histoplasma infection causes per se a suppressive status as has been detected by Stobo (7) and experimentally demonstrated by Bullock in a murine model (1,2). However little information exists concerning the natural conditions in normal individuals which enhance the susceptibility to the infection.

In experimental histoplasmosis, Saslow, Schaefer, and Salvin (4-6) among others, observed that female mice developed greater resistance to the infection than male mice and that age is an important factor in determining the susceptibility of the challenge with the fungus.

However, to date no correlation exists between age and sex with some variations in the defense mechanisms which could predispose this fungal disease.

In this paper our objectives were: First.- Detect the variation in resistance to histoplasma infection from different sex and age animals using LD₅₀ determination (Fig. 1). Second.- Detect variation of the lymphoid cells from different sex and age mice with histoplasma infection and variation in the cellular defense response (Fig. 2).

Materials and Methods

STRAINS.- Low-virulence strain of *Histoplasma capsulatum* N° 5037 and a high-virulence strain "Leon Perez" were obtained by courtesy of Dr. Velasco. The virulent strain was isolated from a fulminant human case. Yeast phase was maintained at 37°C with Bill medium supplemented with 1% glucose and 0.1% of L-cystein.

INFECTION DOSES.- One ml of yeast cells in saline solution were injected intraperitoneally in mice. Yeast cells were estimated by turbidimetric methods and hemacytometer counts.

LD₅₀ DETERMINATION.- Fig. 1 illustrates the schematic procedures of LD₅₀ determination. Groups of ten mice were used for each dose of yeast cells and for each age and sex groups. LD₅₀ was determined by the Reed and Muench method (3).

LYMPHOCYTES DETERMINATION.- General conditions are described in Fig. 2. Only female mice were used and lymphocytes were estimated by differential count of white blood cells using Wright's stain.

CELLULAR IMMUNE RESPONSE.- General conditions are described in Fig. 2. Female mice from each age group were used and cellular response was determined by footpad swelling test. Histoplasmin (200 ug/ml protein and 275 ug/ml carbohydrate) was used as the antigen challenge in the right footpad. Left footpad received saline solution (SS) as a control. Normal mice infected with SS were estimated as a non infection control. The increment of footpad thickness is expressed by the percentages of the mean from the difference (\bar{X}_D) between the reading after the antigen challenge at 24 hrs (\bar{X}_{t24}) and the reading before the challenge (time zero- \bar{X}_{t0}); $\bar{X}_D = \frac{\bar{X}_{t24} - \bar{X}_{t0}}{n} \times 100$ where n=5 animals.

LIVE PERITONEAL EXUDATE CELLS DETERMINATION.- General conditions are described in Fig. 2. Female mice from each age group were used. Viability of peritoneal cells was determined by trypan blue exclusion technique.

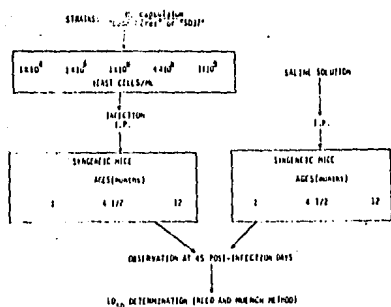


Fig. 1.- LD₅₀ determination scheme of *Histoplasma capsulatum* in BALB/c mice.

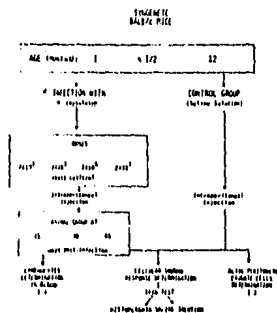


Fig. 2.- Schematic representation of experiments in order to obtain variation in immune response, lymphocytes number and peritoneal macrophages activity with different animal ages and fungus doses.

Results and Discussion

LD₅₀ determination was a good parameter to detect resistance to histoplasmotic infection in syngeneic mice of both sex and different ages (Fig. 3). Female BALB/C syngeneic mice are more resistant to histoplasmotic infection than male mice and male adult mice (4 1/2 months) are more resistant to histoplasmotic infection than young (1 month) male mice and old (12 months) male mice (Fig. 3).

To correlate variation of lymphoid cells and cellular immune defense response

with age, we used only female mice, which were more resistant to the infection permitting then a clearer differentiation of the response of the three age groups studied (Fig. 3):

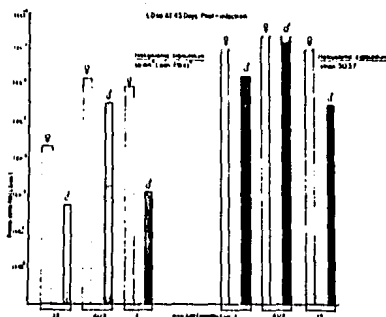


Fig. 3.- Graphic distribution of LD50 from strains of *Histoplasma capsulatum* in BALB/c mice. Male and female syngenic mice from different ages were used. All LD50 were determined by the Reed & Muench method.

Light lymphocytosis in 4 1/2 months old mice was observed and it may indicate a lymphocytic activity committed with the defense of this age group (Fig. 4).

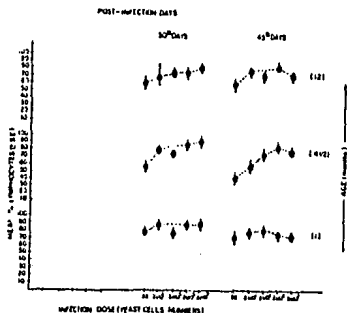


Fig. 4.- Lymphocytes determination in BALB/c mice infected with *Histoplasma capsulatum*. Each point was calculated with N= 5 animals; \pm SE standard error; SS= saline solution.

High hypersensitivity was specially detected in young mice (Fig. 5a,b,c). It is compatible with hyperactivation of immune cellular response (delayed hypersensitivity) caused by fungal antigen, which could be inefficient in protecting the animal and would cause damage, so high hypersensitivity (Fig. 5) and high susceptibility in young mice (Fig. 3) expresses a bad predisposition to the clinical course of this infection.

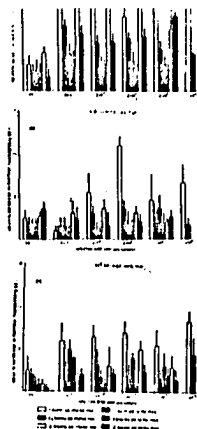


Fig. 5(a,b,c).- Footpad swelling test in syngeneic mice infected with *Histoplasma capsulatum*. Female BALB/c mice of different ages were infected intraperitoneally with 0.5 ml of yeast cells. SS- Saline solution.

Finally, after the challenge with live fungus a greater destruction of peritoneal macrophages was shown in young and old mice (Fig. 6).

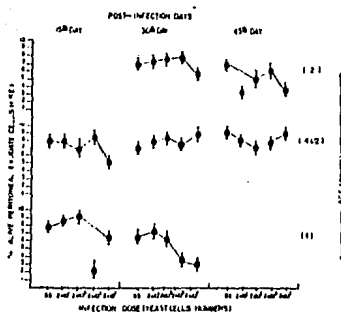


Fig. 6.- Percent of alive peritoneal exudate cells in BALB/c mice infected with *Histoplasma capsulatum*. Animal number= 5; \pm SE standard error; SS= saline solution.

In conclusion, we assume that age and sex probably alter the expression of immune defense mechanisms in histoplasmosis, and that age may have an unfavorable effect on the course of histoplasmodic infection because it interferes with: 1. The protective function of cell mediated immunity, facilitating the hyperactivation of the cellular response, and causing damage. 2. The adequate number of lymphoid cells. 3. The efficiency of peritoneal macrophages.

References

1. Artz, R.P. & Bullock, W.E. 1979. Immunoregulatory responses in experimental disseminated histoplasmosis: Depression of T-cell dependent and T-effector responses by activation of splenic suppressor cells. *Infection and Immunity*, 23, 893-902.
2. Nickerson, D.A., Havens, R.A. & Bullock, W.E. 1981. Immunoregulation in disseminated histoplasmosis: characterization of splenic suppressor cell populations. *Cellular Immunology*, 60, 287-297.
3. Reed, L. J. & Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. *The American Journal of Hygiene*, 27, 493-497.
4. Saslaw, S., & Schaefer, J. 1955. Relation of sex and age to resistance of mice to experimental *Histoplasma* infections. *Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine*, 90, 400-402.
5. Salvin, S.B. 1953. Immunization of mice against *Histoplasma capsulatum*. *The Journal of Immunology*, 70, 267-270.
6. Salvin, S.B. 1955. Resistance to reinfection in experimental histoplasmosis. *The Journal of Immunology*, 74, 214-221.
7. Stobo, J.D., Paul, S., Van Scoy, R.E. & Hermans, P.E. 1978. Suppressor thymus-derived lymphocytes in fungal infection. *The Journal of Clinical Investigation*, 57, 319-328.

Relationship between age and cellular suppressive activity in resistance to *Histoplasma capsulatum* infection

M. R. REYES MONTES, J. CASASOLA, N. E. ELIZONDO AND M. L. TAYLOR
(Grupo Multidisciplinario de Micosis: GMM).

Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., Mexico

(Accepted 10 June 1985)

One-month-old and 1-year-old male BALB/c mice showed a lower resistance than 4.5 month old mice to *Histoplasma capsulatum* infection. 4.5 month-old mice successfully resolved the infection when challenged with either a $1D_{50}$ or $1D_{90}$ for 1-month old mice. A critical clinical course of experimental histoplasmosis was observed in 4.5 month old syngeneic mice when spleen cells from 1 month old BALB/c mice were transferred to them. Irradiated recipient mice, into which bone marrow and spleen cells were transferred, died when infected with the $1D_{90}$ for 1 month old mice. The same occurred with 4.5 month old non irradiated infected mice which received only spleen cells and with 1 month old mice which were used as a control of infection. However, infected and non transferred 4.5 month old mice survived this dose. Thus, the adoptive transfer of spleen cells from 1 month old mice to 4.5 month old mice suppressed the resistance of these adult mice to infection. Apparently, the transference of the suppressive state requires the presence of two cell populations, a non adherent and an adherent and indolent cell present in the spleen of male 1-month-old mice.

It is well known that groups of normal individuals exposed to the infectious agent *Histoplasma capsulatum*, under identical conditions, develop different clinical courses of the disease. Many factors could increase susceptibility and alter the natural or acquired resistance of the individual, and predispose to a more severe course for the infection.

Several differences in the immune response capacity of the lymphoid population in normal animals, including humans, have been reported. These changes correlate with sex, age, hormonal stimulation, and may act indirectly on the immune defense mechanism. For example, mice less than 4 weeks old have a predominance of suppressor T cells [12, 13], while for older mice data are contradictory [3, 16]. Therefore, one could expect that modifications in the lymphoid population, such as the number, type of cells and physiological activity would occur. Such modifications may be induced by different mechanisms of internal regulation throughout life, and

these changes, among others, may account for variations in the susceptibility and resistance to infections.

Studies in resistance to mycosis have suggested differences related to host sex and age in the outcome of the disease. Muchmore *et al.* [9], in Swiss Webster mice infected with *Cryptococcus neoformans*, demonstrated that females are more resistant under experimental conditions. Brass & Stevens [4], in murine blastomycosis, observed that 9-week-old mice have marked resistance to infection as compared to 5-week-old mice and suggested that a maturity factor is a critical determinant in resistance to fungal infection.

Saslow & Schaefer [15], in experimental histoplasmosis, first made the observation that female mice develop a greater resistance to the infection than males, age being an important factor in determining the susceptibility to challenge with the fungus. However, these observations should not be generalized, since contrasting results have been reported in other strains of animals [14].

Taylor *et al.* [19], using a yeast-phase intraperitoneal inoculum in a murine model, have observed that age and sex alter the expression of immune defense mechanisms in histoplasmosis. Age probably has an unfavorable effect on the course of histoplasmal infection, because it interferes with the protective function of cell mediated immunity, facilitating the hyperactivation of the cellular response and causing damage to the adequate functional number of lymphoid cells. Age can also act in another way, affecting the efficiency of peritoneal macrophages.

To explain the most critical course of the infection in some apparently normal individuals, the existence of an immunosuppressive phenomenon has been considered. Although a few reports have examined the suppressive phenomena in histoplasmosis [2, 10, 17], we believe that factors such as age and sex, among others, help to develop a natural suppressive state that temporarily predisposes the animals to infection. This paper studies age as an influencing factor in anti-histoplasmal defense and also the correlation between early age and suppressive activity in the course of histoplasmal infection.

METHODS

Culture

The yeast phase of *Histoplasma capsulatum* strain No. 5037 was maintained at 37°C in brain-heart infusion broth (BHI) (Bioxon México, S.A. de C.V.) supplemented with glucose 10 g l⁻¹ and L-cysteine 1 g l⁻¹ (Merck Lab.).

Mice

Inbred BALB/c male mice 1, 4.5 and 12 months old, were obtained from a colony maintained at the School of Medicine, UNAM. The three different ages are referred to below as young, adult and old respectively. They were given water and mouse chow (Purina de México, S.A. de C.V.) *ad libitum*.

Infection

Yeast cell doses contained in one ml of balanced saline solution (BSS) were injected intraperitoneally. Yeast cells were estimated by hemocytometer counts [19]. Samples of each cell dose were cultured in BHI at 28°C for viability and reconversion controls.

50% lethal doses (LD₅₀) and survival percentage determination

Ten mice of each age were inoculated with different doses 1 × 10⁷, 1 × 10⁸, 1 × 10⁹, 4 × 10⁹ and 1 × 10¹⁰ of yeast cells. A control group injected with saline solution was

included, LD_{50} was determined by the method of Reed & Muench [11]. Resistance to the infection was estimated by the percentage survival determined by cumulative frequencies [11].

Organ culture for fungus

Homogenates of spleen, liver and lungs obtained from infected dead mice were prepared in BSS with 50 µg gentamycin ml⁻¹ and cultured in duplicate in mycobiotic agar (Bioxon Lab.) at 28°C and in BHI-agar with L-cysteine 1 g l⁻¹ and glucose 10 g l⁻¹ at 37°C. Cultures were identified by the typical microscopic morphology of fungus at 28°C and 37°C.

Bone marrow separation

Bone marrow cells were always obtained from normal syngeneic 4-5-month-old BALB/c mice. Cells were collected by flushing out the femurs of the animals with BSS. Cell suspensions were then filtered through gauze to remove debris and washed three times in BSS. Nucleated cells were adjusted to 1×10^7 per 0.3 ml. A volume of 0.3 ml of this bone marrow suspension was injected into each recipient mouse through the retro-orbital sinus. Mice were removed to an isolated room and maintained with sterile acidified water (pH 2.8) and food *ad libitum*.

Spleen cell separation

Spleen cells from syngeneic mice 1 month old and 4-5 months old were obtained by gentle teasing of the organ. Spleen cells were filtered through gauze to remove cell aggregates and cellular debris. Erythrocytes were eliminated by treatment with a hypotonic solution of Tris buffered NH₄Cl pH 7.65. At least 90% of the cells were viable as determined by trypan blue dye exclusion. For transference the cells were suspended in BSS supplemented with 50 µg of gentamycin ml⁻¹ and adjusted to a concentration of 5×10^7 cells ml⁻¹ [7].

Non-adherent and adherent spleen cell separation

Spleen cells were obtained as above. Cell populations were separated by the method of Mosier [8]. Cellular suspensions were adjusted to 1×10^7 cells ml⁻¹ and cultured in RPMI-1640 with HEPES (N-2 hydroxyethylpiperazine-N'-2 ethanesulfonic acid) (GIBCO Laboratories Grand Island, NY) supplemented with 20% fetal calf serum (FCS) and 50 µg gentamycin ml⁻¹. Five ml of the suspension was added to individual glass petri plates. The cells were allowed to attach for 24 h at 37°C under 5% CO₂ in air. All non-adhering cells were washed with BSS and adjusted to the desired concentration of 1×10^7 cells per 0.3 ml BSS. Adherent cells were collected with a rubber policeman and washed in BSS. The suspension was adjusted to 1×10^7 cells per 0.3 ml of BSS. Before use for transference, adherent and non-adherent cells were tested for viability by trypan blue.

Irradiated mice

Recipient mice (4-5 months old) were subjected to whole-body irradiation before transference. Irradiation was performed with a therapy machine from the DIF Hospital (Desarrollo Integral de la Familia) with a Cobalt Theratron bomb 765 of ⁶⁰Co 3400 Ci (Atomic Energy of Canada Ltd). The irradiation curve was carried out in the range of 500 to 800 rads. Optimal irradiation conditions were set at 700 rads with the following parameters: dose rate 53.57 rad min⁻²; target distance 65 cm; irradiation time 1.05 min. All animals were housed under identical conditions of temperature

and light and maintained in sterilized cages containing food and acidified chlorinated water *ad libitum* during 24 h.

Kinetics of histoplasmal infection following cells transfer

Different groups of irradiated mice (700 rads) were defined. Five mice were used as irradiation controls. After 24 h of irradiation, mice were reconstituted with bone marrow cells from adult mice (1×10^6 cells per 0.3 ml BSS) and transferred with spleen cells (5×10^6 cells per ml BSS) obtained from 1-month-old BALB/c donors. Five non-infected mice remained as a control of transference. All remaining animals were divided into nine groups of 5-7 mice in each. They were infected with three doses of yeast-phrase *H. capsulatum* at 24 h, 3 days and 7 days respectively. The different fungal doses used were 1×10^4 , 2×10^6 and 4×10^6 cells ml^{-1} in BSS. Mice were observed during 45 days for mortality. Organ cultures were made as described above.

Resistance to histoplasmal infection with the transference of whole population of adoptive spleen cells

In the passive transference the 4.5-month-old male (adult) mice were used as recipients for transference. Spleen cells (5×10^6 cells per 0.3 ml BSS) of 1-month-old mice were used as donor cells. One group of animals received adult spleen cells as a control. All irradiated mice were reconstituted with bone marrow cells (1×10^6 cells per 0.3 ml BSS) from adult mice. For the experiment, animals were divided into seven groups of approximately 20 mice each.

The first group contained irradiated mice which received spleen cells from 1-month-old mice. The second group contained non-irradiated mice which received spleen cells from 1-month-old mice. The third group of irradiated mice received spleen cells from adult mice. The fourth was a non-irradiated group which received only adult spleen cells. Ten animals of the initial group were infected intraperitoneally with a 50% lethal dose (LD_{50}) for 1-month-old mice, 3.16×10^6 yeast cells ml^{-1} . The other 10 animals of each group were used as non-infected controls. The following groups were used as infection and irradiation controls. The fifth group contained adult mice infected with a resolutive dose for its age (lethal dose for 1-month-old mice). The sixth group was the infection control for 1-month-old mice. Finally, the seventh group was the irradiation control of adult mice. Survival was recorded at 45 days.

Resistance to histoplasmal infection with adherent and non-adherent spleen cell transference

This assay was similar to the one described above, with the following modifications: each group of recipient mice received different cell populations. These cells were the following: adherent spleen cells (1×10^6 cells per 0.3 ml BSS), non-adherent spleen cells (1×10^6 per 0.3 ml BSS) and whole spleen cells (5×10^6 cells per 0.3 ml BSS) from 1-month-old donor mice irradiated with 800 rads. All recipient mice were adult syngenic mice. In these experimental series, recipient mice were not irradiated and animals were infected with a lethal dose of yeast-cell for young mice ($\sim 4 \times 10^6$ cells). Irradiation controls of young mice, control of transference for each population for young and adult mice and controls of infection to young and adult mice were included.

RESULTS

LD_{50} and survival percentage determination

Mice deaths which occurred in a time period between 10 and 45 days after infection

were considered for LD_{50} estimation. Organ culture of dead animals was used to confirm death due to infection.

Animals of three age groups, receiving different challenge doses of the fungus, developed distinct grades or resistance to histoplasmal infection as demonstrated by the LD_{50} and the survival determination. The LD_{50} obtained for the three age groups of mice studied were the following. The LD_{50} for 1-month-old mice (3.16×10^8 yeast cells ml^{-1}) and for 1-year-old mice (5.2×10^7 yeast cells ml^{-1}) were lower than for adult mice, since a factor of $100 \times LD_{50}$ for old mice and $10 \times LD_{50}$ for young mice was tested; the LD_{50} for 4.5-month-old adult mice was greater than the highest yeast inoculum tested (1×10^8 cells ml^{-1}). These results demonstrate the great resistance of adult mice compared to young (1 month) and old (1 year) mice. Control mice inoculated with saline solution survived the entire time of the experimental study. Figure 1 illustrates the dose survival curves. Adult mice developed an 100% survival to all challenge doses tested, meanwhile with young mice, after the challenge dose of 1×10^8 yeasts ml^{-1} the survival rate decreased from 100% to 0% with the last dose used, and finally with old mice the survival rate changed from 80% to 0% with a dose of 1×10^7 yeast cells ml^{-1} to 4×10^8 yeast cells ml^{-1} .

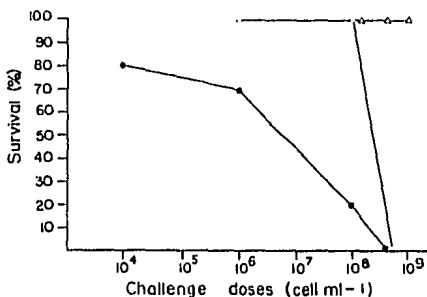


FIG. 1. Resistance to *H. capsulatum* infection with percentage survival determination. Male BALB/c mice from three age groups were challenged with different doses of the fungal yeast cell by intraperitoneal route (○) 1-month-old mice; (△) 4.5-month-old mice; (●) 12-month-old mice. Survival was estimated 45 days after fungus inoculation.

Kinetics of histoplasmal infection post-transference

Figure 2 illustrates the variation in susceptibility of mice submitted to irradiation and reconstituted with syngeneic bone marrow and spleen cell. Changes during the infection corresponded to the difference in infection days post-irradiation and transference treatment. Mice infected 24 h after transference died in a short period of time (6-24 days) with all doses tested. Infection after 3 days post cell transference showed a favorable discrimination of dose effect, where the higher dosage produce animal death between 8 and 24 days. Finally, the infected mice by the 7th day post-transference developed a characteristic course of infection and the higher dose of fungus (4×10^8 yeast cells ml^{-1}) produced deaths between 13 and 35 days, while with 2×10^8 yeast cells ml^{-1} , mice died between 24 and 35 days. The smallest dose tested (1×10^7 yeast cells ml^{-1}) produced only two deaths during the 26-40 day period.

These results suggest that the most suitable time for infection after irradiation and cell transference is the 7th day after treatment.

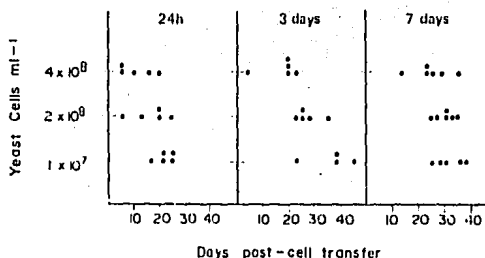


FIG. 2. Histoplasmal infection post-cells transference. Adult BALB/c syngeneic recipient mice were transferred with spleen cells from 1-month-old syngeneic donors after 700 rads irradiation dose. Infection with the fungus was made at 24 h, 3 days and 7 days post-adoptive transference (see text for details). For each challenge dose 5-7 animals were used. Data indicate animal deaths.

Resistance to *H. capsulatum* infection with adoptive spleen cell transfer

Resistance was monitored by mouse survival, signs of the disease, and by fungus isolation from organ culture. Table 1 shows the variation in the number of deaths amongst infected mice. In the first group of recipient adult mice transferred with bone marrow and spleen cells from 1-month-old mice, death by infection was detected in 5, 7 and 7 animals respectively from a total number of 9 animals per group for each experiment. Meanwhile, non-infected controls did not manifest any deaths.

The group of 4-5-month-old non-irradiated recipient mice which received only spleen cells from 1-month-old mice (group II) also manifested abrogation of its defenses since the number of deaths was less dramatic than for the former group. From the 29 tested animals, death occurred in 3, 4 and 4 mice for each experiment respectively. Non-infected controls, with 28 animals, presented 4 deaths during the three experiments.

In the next two groups, the transferred cells belonged to the same age group as the recipient mice. Only three deaths were detected along the experimental series, using a large number of animals (see Table 1).

The last three groups were used as infection and irradiation controls. Adult mice used as an infection control group for the 1-month-old mice lethal dose, resolved the infection favorably and only two deaths were observed in the second experiment. These results therefore confirm the high resistance of adult mice to infection. A control group for the dose infection of young mice (group VI) developed a high mortality rate according to our expectation, 7 out of 8, 9 out of 10 and 7 out of 9 infected mice died in the triplicate experiments.

Finally, the group of adult irradiated mice without transference and infection was assumed as control for irradiation and a 100% mortality was observed.

During the infection period, animals were observed daily and clinical manifestations of the illness were recorded. Specifically groups I, II and VI showed signs of disease i.e. a critical weight body loss and animal immobility, particularly after 20-30 days post-infection.

Positive cultures obtained by organ culture after the animal death are summarized in Table 2. Typical fungal morphology with macro- and microconidia were checked by microscopic observation. A total positivity was obtained with all animals tested.

TABLE 1. Adoptive transfer and resistance changes to *Histoplasma* infection. Transference was made 24 h post-irradiation. Donor cell dose: 1×10^6 cells per 0.3 ml BSS of adult bone marrow cells and 5×10^6 cells per 0.3 ml BSS of spleen cells. Bone marrow cells were transferred only for irradiated mice. Infection doses with yeast phase of *Histoplasma* were 4×10^8 yeast cells ml⁻¹

Animal group	Spleen cells donor ages (months)	Irradiation treatment (Rx) (month old mice)	Recipient mice					
			Infection No. of deaths			No infection No. of deaths		
			1	Experiment 2	3	1	Experiment 2	3
I	1	Rx (4.5)	5(9)*	7(9)	7(9)	0(9)	0(9)	0(10)
II	1	Non Rx (4.5)	3(9)	4(10)	4(10)	2(9)	2(9)	0(10)
III	4.5	Rx (4.5)	ND*	1(9)	0(10)	ND	0(10)	0(10)
IV	4.5	Non Rx (4.5)	2(9)	0(10)	0(10)	0(9)	0(9)	0(9)
V	None	Non Rx (4.5)	0(9)	2(8)	0(10)			
VI	None	Non Rx (1)	7(8)	9(10)	7(9)			
VII	None	Rx (4.5)				9(9)	9(9)	9(9)

*Total number of each group of animals is in parenthesis.

*ND (not done).

TABLE 2. Positive cultures from spleen, liver and lungs of mice infected with *Histoplasma capsulatum*. For detail of infected groups see Table 1

Groups of infected mice	Cultures		
	Expt 1	Expt 2	Expt 3
I	5(5)	7(7)	7(7)
II	3(3)	4(4)	4(4)
III	ND	0(1)	0
IV	1(2)	0	0
V	0	1(2)	0
VI	7(7)	7(9)	6(7)

Number of dead animals from each group is in parenthesis.

ND = not done.

Resistance to histoplasma infection with adherent and non-adherent spleen cell transference

Table 3 shows that adult recipient mice which were transferred with adherent cells from 1-month-old donors died in a short time and developed signs of the illness with high intensity. Recipient groups for whole spleen cells, for non-adherent cells and for 800 rad transferred cells also died with a total mortality rate until the 20th day of infection. Controls of infection for the two age groups demonstrated the high susceptibility of young mice, where all animals died, and the resistance of adult mice which survived the experiments. All the cell transference controls survived, suggesting the efficiency of the adoptive transference method used. Finally, all the irradiated controls for the 1-month-old mice (800 rads cells) died in accordance with our expectations.

TABLE 3. Adoptive transfer of non-adherent and adherent spleen cells and resistance to histoplasmal infection. Donor cell doses: 1×10^7 cells per 0.3 ml of adherent or non-adherent cells; 5×10^7 cells per 0.3 ml of whole spleen cells. Yeast phase of *Histoplasma* was used with the lethal dose for 1-month-old mice

	Donor ages (months) (Cell population)	Recipient mice Deaths number in days			
		10 days		20 days	
		Experiment			
		1	2	1	2
1	1 (Adherent cells)	5(5)	5(5)	—	—
2	1 (Whole spleen cells)	0(5)	0(5)	5(5)	0(5)
3	1 (Non-adherent cells)	0(5)	0(5)	5(5)	ND
4	1 (800 Rads cells)	0(5)	2(5)	5(5)	3(5)
5	4.5 (Whole spleen cells)	0(5)	0(5)	2(5)	0(5)
	4.5 Infection control	0(5)	0(5)	0(5)	0(5)
	1 Infection control	0(5)	0(5)	5(5)	5(5)
	1 Irradiation control (800 rads)	3(3)	5(5)	—	—

Total number of each group of animals is in parenthesis.
ND = not done.

DISCUSSION

To explain cases in which there is apparent inefficiency of the immunological response for the elimination of *H. capsulatum*, two possible immunosuppressive phenomena are proposed. First, the presence of a suppressive state prior to or simultaneous with *H. capsulatum* infection, which could be reinforced by the infective process; second, the infection causes a suppressive status as demonstrated by Artz & Bullock [2] in experimental histoplasmosis.

Our results on the percentage survival (Fig. 1) and LD_{50} responses of mice to *H. capsulatum*, illustrate clearly the age relationship among the groups studied. Resistance to infection in adult mice was always high, in contrast with other age groups. In terms of LD_{50} the oldest mice were the most susceptible animals to infection, and the 4.5-month-old mice the least. However, results from our laboratory also show that mice less than 1-month-old have a high susceptibility to the fungal infection. Similar observations in C-57 black mice have been made (unpublished data) and furthermore, results using two strains of *H. capsulatum* with differences in virulence confirm the high susceptibility of 1-month-old mice [19]. The increase in susceptibility of mice to *H. capsulatum* infection at 24 h and 3 days after irradiation treatment and cell transfer suggests that these periods of time are not adequate for infection. Nevertheless, experimental infection realized at the 7th day was followed to observe the natural outcome of the illness.

The presence of a critical course in some apparently normal individuals suggests the existence of an immunosuppressive phenomenon prior to the *Histoplasma* infection.

To investigate this possibility, adoptive spleen cell transference was performed in the hope that spleen cells were committed with the suppressive state observed in the extreme animal ages. We only transferred cells from younger mice because they are easier to obtain in sufficient number in contrast to cells from older mice. By using transference we tried to suppress the histoplasmal resistance of adult male mice with spleen cells from 1-month-old donors. Our results demonstrated that cells from young donors inhibit the defense mechanism of adult mice, which is normally capable of favorably resolving the infection. Cell transference processes and cells from adult donors did not affect the resistance, since adult mice transferred with adult cells did not present any disturbances. An interesting observation was made with the separation of spleen cell populations. Adherent and non-adherent cells manifest the suppressive phenomenon in recipient mice, whereas adherent cells and 800 rads resistant cells induce death more rapidly in recipient mice than non-adherent cells. The characteristic of adherence and resistance to 800 rads committed a macrophage-like cell with the suppressive effect in mice of less than 1 month of age. In unpublished results using a sublethal dose of the fungus for young mice, only the animals transferred with adherent cells died, suggesting the important role of these cells in the early age of these mice (data not shown).

Suppressor activity has been demonstrated in spleen cells from newborn mice which abrogate T cell mediated responses [12]. Several possibilities could explain this suppressor function. First, spleens of very young mice have a high level of T suppressor cells which would express a nonspecific effect; second, spleen cells are enriched by amplifier cell subpopulations as Iy 2, 3^a, 1 J, Qa 1, described by Tada *et al.* [18], which would amplify the function of the spleen T suppressor cells; third, spleens of young mice are enriched with adherent cells with suppressor activity.

It has been suggested by some authors [1, 5, 6] that the lack of functional macrophage in the spleens of newborn mice promotes an insufficient immunological reactivity of the spleen cells.

Our results help to establish the role of sex and age in triggering an adequate defense against histoplasmosis. Spleen cell participation in the suppressor mechanism of young mice is committed with both adherent and non-adherent cell populations, with a special emphasis on macrophage-like cells. Further studies using markers for T cells and macrophages will permit a more efficient identification of these cell populations.

RESUMEN

Ratones machos BALB/c de 1 mes (jóvenes) o de 1 año (viejos) mostraron una menor resistencia a la enfermedad producida por el parásito intracelular *Histoplasma capsulatum* que los ratones adultos de 4-5 meses de edad. Resultados del porcentaje de supervivencia confirman la mayor resistencia de los ratones adultos a esta infección. Además, los ratones adultos resolvieron favorablemente la infección cuando fueron desafiados con la DI_{100} y la DI_{800} para ratones de 1 mes.

La transferencia de células de bazo de ratones de 1 mes a receptores simpélicos adultos fue determinante en el desarrollo de un curso crítico de la infección experimental histoplasmosa en estos receptores. Ratones adultos irradiados y transferidos con células de médula ósea y bazo de ratones de 1 mes, murieron cuando se infectaron con la DI_{100} para ratones de 1 mes. Lo mismo ocurrió con los ratones adultos no irradiados e infectados que recibieron solamente células de bazo y los ratones de 1 mes que fueron usados como control de infección. Sin embargo, los ratones de 4-5 meses que fueron infectados y a los que no se les transfirieron células, sobrevivieron a la dosis infectante. Por lo tanto, la transferencia adoptiva de células de bazo de ratones de 1 mes a ratones adultos, abatió la resistencia de éstos a la infección. Aparentemente, la transferencia del estado supresivo está dado por la presencia de 2 poblaciones celulares, una no adherente y la otra adherente con la característica de radiorresistencia. Ambas poblaciones se encuentran presentes en el bazo de ratones machos de 1 mes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Miss Alba María González Ojeda for irradiation assistance and Mrs Patsy Caraballo for manuscript collaboration.

REFERENCES

1. ARGYRIS, B. F. 1978. Role of macrophages in immunological maturation. *Journal of Experimental Medicine*, **128**, 459-467.
2. ARTZ, R. P. & BULLOCK, W. E. 1979. Immunoregulatory responses in experimental disseminated histoplasmosis: Depression of T-cell dependent and T-effector responses by activation of splenic suppressor cells. *Infection and Immunity*, **23**, 893-902.
3. BARTHOLD, D. R., KYSELA, S. & STUBBERG, A. D. 1974. Decline in suppressor T cell function with age in female NZB mice. *Journal of Immunology*, **112**, 9-16.
4. BRASS, C. & STEVENS, D. 1982. Maturity as a critical determinant of resistance to fungal infections: Studies in murine blastomycosis. *Infection and Immunity*, **36**, 387-395.
5. HARDY, B., CLONROSON, A. & DAMON, D. 1973. Ontogenic development of the reactivity of macrophage to antigenic stimulation. *Cellular Immunology*, **9**, 282-288.
6. LAMDAHL, C. A. 1976. Ontogeny of adherent cells. I. Distribution and ontogeny of cells participation in the response to sheep erythrocytes *in vitro*. *European Journal of Immunology*, **6**, 130-134.
7. LONGLEY, R. & COZAD, G. 1979. Thymosin restoration of cellular immunity to *Blastomyces dermatitidis* in T-cell-depleted mice. *Infection and Immunity*, **26**, 187-192.
8. MOSHAR, D. E. 1967. A requirement for two cell types for antibody formation *in vitro*. *Science*, **158**, 1573-1575.
9. MUCHMORE, H. G., SCOTT, E. N., FILLON, F. G. & FROMLING, R. A. 1982. Sex differences in the virulence of *Cryptococcus neoformans* for adult mice. In: M. Baxter (ed.) *Proceedings VIII Congress of ISHAM*, pp. 152-155. Massey University Palmerston North, New Zealand.
10. NICKERSON, D. A., HAVENS, R. A. & BULLOCK, W. E. 1981. Immunoregulation in disseminated histoplasmosis: Characterization of splenic suppressor cell population. *Cellular Immunology*, **60**, 287-297.
11. REID, L. J. & MUENCH, J. A. 1938. A simple method of estimation fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, **27**, 493-497.
12. RODRIGUEZ, G., ANDERSSON, G., WIGZELL, H. & PLUCK, A. B. 1979. Non-T cell nature of the naturally occurring, spleen associated suppressor cell present in the newborn mouse. *European Journal of Immunology*, **9**, 737-746.
13. RUSSELL, J. L. & GUTHRIE, E. S. 1977. Functional development of the interacting cells in the immune response. III. Role of the neonatal spleen. *European Journal of Immunology*, **7**, 305-309.
14. SALVIN, S. B. 1953. Immunization of mice against *Histoplasma capsulatum*. *Journal of Immunology*, **70**, 267-270.
15. SASLOW, S. & SCHALLER, J. 1955. Relation of sex and age to resistance of mice to experimental *Histoplasma* infections. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **90**, 400-402.
16. SIGREI, D. & SIGREI, M. 1976. Humoral immunity in age mice. I. Increased suppressor T cell activity in immunologically deficient old mice. *Journal of Immunology*, **116**, 735-738.
17. STORO, J. D., PAHL, S., VAN SLOOY, R. E. & HERMANS, P. E. 1978. Suppressor thymus-derived lymphocytes in fungal infection. *Journal of Clinical Investigation*, **57**, 319-328.
18. TADA, T., TANIGUCHI, M. & DAVID, C. S. 1977. Suppressing and enhancing T-cell factors as I-region gene products: properties and the subregion assignment. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **41**, 119-127.
19. TAYLOR, M. L., REYES MONTES, M. R., GONZALEZ, G. R., CASASOLA, J. & HERNANDEZ RAMIREZ, A. 1982. Immune response changes with age and sex as factors of variation in resistance to *Histoplasma* infection. In: M. Baxter (ed.) *Proceedings VIII Congress of ISHAM*, pp. 260-264. Massey University Palmerston North, New Zealand.

Reprinted from
International Congress Series No. 480
Human and Animal Mycology
Proceedings of the VII Congress of ISHAM
Jerusalem, Israel, March 11-16, 1979
Editors: E.S. Kuttin and G.L. Baum
Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton
ISBN Excerpta Medica 90 219 0416 0
ISBN Elsevier North-Holland 0 444 90099 3

RELATION BETWEEN CELLULAR AND HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN MICE IMMUNIZED WITH Histoplasma capsulatum.

Taylor, M.L., Eslava Campos, C., García González, R. and Hernández Ramírez, A.

Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México 20, D.F. México.

The activity of the immune system, in the histoplasmosis infections, is determined fundamentally by the cellular response (3, 6). Nevertheless, antibodies anti-Histoplasma capsulatum are detected throughout the infectious process, although their role in the defense of the host is unclear. In the case of histoplasmosis, certain interaction of antibodies with the cellular response has been suggested. This was so in the work of Newberry (4), who observed *in vitro* the inhibition of the phenomenon of lymphocytic transformation, mediated by the presence of antibodies anti-Histoplasma capsulatum. This was also found in the study done in Mexico by Velasco (1) on a group of histoplasmosis patients, in which he found a relation between both kinds of immune response.

The data concerning the immune responses of this disease do not present a clear picture of the events triggered by the presence of the fungus in the individual and in spite of the importance of the cellular response, it is possible that antibodies play a certain role in the infection condition, perhaps one of regulation. In this paper we studied the correlation that exists between the two kinds of immune response in experimental conditions of sensitization with Histoplasma in order to detect some regulatory mechanism which might be implicated in its appearance.

MATERIAL AND METHODS

We worked with male CD-1 mice (20-25 grs) sensitized on the left footpad with 3 doses of the fungus, at one week intervals. The doses were adjusted to 9 mg of dry weight of dead mycelium of the fungus per ml of incomplete Freund's adjuvant.

The serum samples were obtained at 5 day intervals, for 60 days after the administration of the last sensitization dose and were frozen for storage using sodium azide as a preservative.

Antibodies were determined by haemagglutination (2) and capillar precipitation test. The humoral test in Fig. 1A reports a percent of positive results of the

experiments performed, giving an arbitrary value of 100 percent to 5 positive experiments. Cellular activity was detected by cutaneous reaction, measuring the increase in the thickness of the right animal's footpad after antigen challenge.

In the first stage of our study we are only trying to observe how both reactions proceed under experimental conditions of sensitization with the fungus. In the future we hope to relate this to the events which occur during the infectious process. We are presently in the process of undertaking this latter stage in our laboratory.

RESULTS

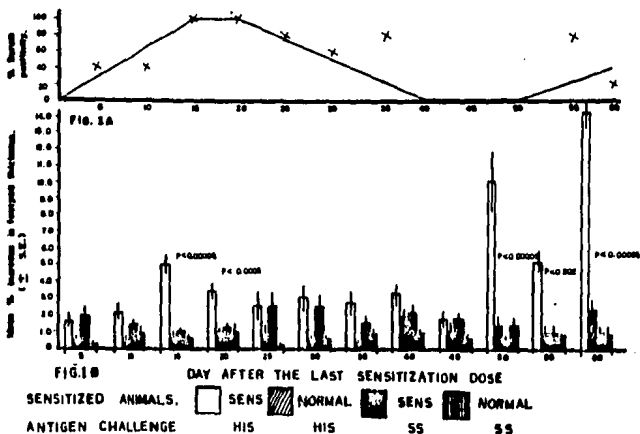
TABLE 1. PASSIVE HAEMAGGLUTINATION: Sera from animals sensitized with Histoplasma capsulatum.

DAYS AFTER THE LAST SENSITIZA TION DOSE	SERUM TITERS				
	Assays number				
	1	2	3	4	5
5	Neg	Neg	1:8	1:4	Neg
10	Neg	Neg	1:16	1:4	Neg
15	1:32	1:4	1:8	1:4	1:4
20	1:32	1:8	1:4	1:4	1:4
25	1:16	1:8	Neg	1:16	1:4
30	1:16	1:32	1:2	1:2	1:4
35	1:8	1:4	Neg	1:4	1:4
40	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
45	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
50	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
55	1:8	Neg	1:8	1:4	1:4
60	Neg	Neg	1:4	1:2	Neg
Positive control	1:64	1:64	1:128	1:32	1:64
Negative control	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Haemagglutination test was performed by the glutaraldehyde method (2). Histoplasmin at 2 mg/ml of protein was used as antigen. Positive and negative controls were human sera. Abbreviations: Neg (Negative).

Humoral test. The result of the humoral tests are similar for both haemagglutination and precipitin tests used. In Table 1, it can be seen the response to haemagglutination

technique which can be detected from the first days after the last sensitization dose. The highest titers are found between 15 and 30 days, becoming negative on days 40, 45 and 50 after sensitization. Appearing again between the 55th and 60th day. The positive controls were sera from patients with proven histoplasmosis while the negative controls were from normal individuals.



p-estimated by Student's test.

Fig. 1 (A and B) - Mumoral and cellular correlation in mice sensitized with Histoplasma capsulatum

Fig. 1A.- Mumoral test. Sera higher than 1:4 from the same day of sensitization was expressed arbitrarily by % of positivity. The general conditions of the assay are described in material and methods and Table 1.

Fig. 1B.- Footpad swelling test. The increase in footpad thickness is expressed by the percentages of the mean from the difference between the reading after the antigen challenge at 24 hrs and the reading before the challenge (time zero). $\bar{X}_D = \frac{X_{24} - X_{10}}{n} \cdot 100$ (where n=10 animals)

Cellular test. This response was measured by the cutaneous test using as antigen challenged 0.05 ml of histoplasmin (77 $\mu\text{g/ml}$ protein, 4370 $\mu\text{g/ml}$ carbohydrate) in the right footpad. The results can be observed in Fig. 1 B in which two stages of cutaneous reactivity can be distinguished. The first, corresponds to days 15-20 and the second stage corresponds to the period between day 50 and 60 during which the response reaches its highest point, showing a 14% increase. The increase in cutaneous response between these two stages is statistically significant ($p < 0.0005$).

In order to compare humoral and cellular immune responses, Figures 1 A and B show the course of both responses during the 60 days of the study. We can observe that on the days in which the humoral response is most marked, the cellular immune response, although manifest, does not reach levels above a 5% increase. On the other hand, when there is a decrease in the humoral response (40 to 50 days) it can be seen that the cellular response is triggered with an increase of up to 14% (60 days). Finally, it can be seen that between days 55 and 60 the humoral response begins to express itself, although it does not reach its initial levels.

DISCUSSION

Our preliminary results described here permit us to make the following considerations:

1. The positive titers obtained in the humoral tests, although low, are suggestive of a stage of sensitization, since in the case of histoplasmosis, titers as low as 1:8 or 1:16 are indicative of infection.
2. In light of the impossibility of plotting the antibody titers due to their variability in the different experiments, and perceiving the regular and repetitive distribution of the serum reactivity, we tried to express this phenomenon graphically although utilizing an arbitrary measure (Fig. 1 A).
3. The activity of the cellular response, has been reported previously (5) to be at its maximum at 15 to 20 days as was observed here in the first stage of Fig. 1 B. However, by continuing our study over a longer period of time we have observed a second greater increase and therefore greater activity of the response at 50-60 days.
4. The comparison of the two types of response described in Fig. 1 A and 1 B indicates that the moderate levels of cellular response in the first stage (15-20 days) in the presence of a more active humoral response and the greater expression of cellular response at the 50 to 60 days preceded by the absence of humoral response, are suggestive of a mechanism of interaction between both responses.

The possibility that the antibodies anti-Histoplasma have a regulatory effect on the cellular immune response

is supported by our observations as well as those of Newberry and Velasco (4,1). Another data that suggests such a regulatory role is related to the prognosis of histoplasmosis. The prognosis is good when antibodies are present in low levels combined with greater cutaneous activity while the prognosis is bad when the opposite occurs.

Although the goal of this study was not to explore the cellular immune mechanisms, we believe that a possible mean of regulation of this phenomenon might be one of the following:

- 1.- That antibodies might be inhibiting T effector cells of the cellular response.
 - 2.- That antibodies might be activating T supressor cells which inhibit the cellular response by a T-T interaction.
- Finally, we would like to indicate that there remains much to be studied in this area. Our research will continue with the possible role of antibodies in regulation of fungus immune response, using on infection model during a longer time.

REFERENCES

1. Amil Estrada, E., Velasco Castrejón, O. and Estrada-Parra, S. (1976): Resumen del Primer Congreso Nacional de Inmunología, p. 52, Oaxtepec-Morelos. México.
2. Avrameas, S. (1969): *Immunochemistry*, 6, 43.
3. Biggar, W.D., Meuwissen, H.J. and Good, R.A. (1971): *Arch. Inter. Med.* 128, 585.
4. Newberry, W.M., Chandler, J.W., Chin, T.D.Y. and Kirkpatrick, C.H. (1968): *J. Immunology* 100, 436.
5. Taylor, M.L. and Bojalil, L.F. (1977): *Arch. Invest. Med.* 8, 91.
6. Tewari, R.P., Sharma, D., Solotorovsky, M., Lafemina, R. and Balint, J. (1977): *Infect. Immun.* 15, 789.

REVIEW ARTICLES

Relationship Between Pathogenesis and Immune Regulation Mechanisms in Histoplasmosis: A Hypothetical Approach

M. L. Taylor, S. Díaz, P. A. González,
A. C. Susa, and C. Toriello

From the Departamento de Ecología Humana,
Facultad de Medicina, and the Instituto de
Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional
Autónoma de México, México, México

The cellular immune response may be the principal mechanism of defense against infection with *Histoplasma capsulatum*. Subsequently, regulation of cell-mediated immunity could be fundamental to the outcome of disease. Suppressive phenomena—present in the host before infection or brought about by fungal components—would explain the various courses of infection. The fact that high titers of antibodies are associated with the various cellular response suggests that antibodies may have a role as "regulatory molecules" in histoplasmosis. Antibodies may modulate the expression of the cellular response either by direct inhibition or by activation of the suppressor cell population, thereby interfering with the infectious process.

Histoplasmosis is an infection caused by the fungus *Histoplasma capsulatum*, an intracellular parasite that preferentially attacks cells of the reticuloendothelial system. Typical granulomatous lesions are usually produced [1, 2]. Among infections provoking a cellular immune response, histoplasmosis provides one of the most valuable study models [3]. Cellular immune response is mediated by subpopulations of T lymphocytes (T effector cells) and is characterized by a variety of biologic activities directed by different mediators (e.g., lymphokines, which act preferentially on macrophages). The cellular response is not an isolated phenomenon but rather is related to and associated with other functions and components of the immune response, such as humoral immunity, cytotoxic effects, and other activities of the T cell subpopulations; thus, the effectiveness of the cellular immune response depends on the optimal interactions of these components [4].

Generally, the presence of *H. capsulatum* in a susceptible host produces granulomatous lesions in which the participation of the cellular response is fully manifested in the tissue reaction [2, 3]. If cellular response is the principal mechanism of defense in histoplasmosis, then the regulation of the cell-mediated immune response is fundamental to the outcome of the disease. Current concepts supporting possible mechanisms that regulate the immune response in histoplasmosis are discussed.

Regulatory Phenomena

The regulatory components of the immune response, including factors responsible for both stimulation and suppression, determine the intensity, duration, and efficiency of the response. Therefore, it is reasonable to assume that stimulative and suppressive events are part of the mechanism by which regulation occurs. Suppressive phenomena in histoplasmosis have been examined in a few reports [5-11] and may explain a severe course of the infection in apparently healthy individuals. Two possibilities can be proposed. (1) A suppressive episode may occur prior to or simultaneous with the infection produced by the fungus. This event may be circumstantial or clearly determined by a previous immunosuppressive condition. Such suppression may be reinforced by the infective process. (2) Suppression may be an

Received for publication February 22, 1983, and in revised form April 3, 1984.

The authors express their thanks to Dr. Luis Felipe Bojals for his stimulating discussions, interest, criticism, and contribution to the realization of this work, and Miss Verónica Yakoleff for reviewing this manuscript.

Please address requests for reprints to Dr. María Lucía Taylor, Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., México.

outcome of the infection itself, mediated through some fungal product or component.

The former possibility is supported by the fact that a group of healthy individuals exposed to *H. capsulatum* under identical conditions develop different clinical courses of the disease. Various factors could increase susceptibility and alter the natural or acquired resistance of the individual. This circumstantial variation of defense could permit a more critical course of the infection.

In the laboratory we are studying the possible role of fungal components in immunosuppressive events. Rufz et al. [11] have found that histoplasmin, a concentrated culture extract of *H. capsulatum*, induces immunosuppression in mice challenged with sheep RBCs, a heterologous antigen, when the histoplasmin is administered immediately before immunization with antigen [11]. The response, measured by the number of splenic antibody-forming cells, was abrogated when >100 µg of histoplasmin was administered two days before the sheep RBC antigen. These observations support the idea that immunosuppression could be an important factor in the pathogenesis of histoplasmosis and may act through a variety of mechanisms.

Suppressor Cell Participation

In recent years, a great amount of work in immunology has focused on suppressor T cells; now, however, suppressor adherent cells have been identified in some infectious processes. Their participation in immune regulatory mechanisms that act on B lymphocytes and on subpopulations of T lymphocytes is indisputable [12, 13]. The presence of these cells in both humans and animals infected with *H. capsulatum* has already been demonstrated [5-10].

Human histoplasmosis. Suppressor T cells were first identified in patients with histoplasmosis by Stobo et al. [5] and Couch et al. [9]. Subpopulations of mononuclear adherent cells have been shown to act as "regulatory cells" in various human infectious diseases, such as tuberculosis [14]. In human histoplasmosis, a macrophage-like suppressor cell has been demonstrated by Stobo [6]. The role of these "regulatory cells" in the course of the infection has not been established. It is possible that failure of the immune regulatory mechanisms may allow disease to progress to a severe form

in some cases. Thus, impairment of the cellular response may be due in part to failure(s) in the regulatory mechanism fostered by either suppressor cells or molecules such as antibodies (figure 1).

Experimental histoplasmosis. Recently, adherent suppressor cells and T suppressor cells have been demonstrated in the spleens of mice infected with *H. capsulatum* [10] and in animals with other experimentally induced infections, such as leprosy [15].

The concept that immunosuppression could be produced by infection with *H. capsulatum* is supported by the studies of Bullock et al. [7, 8, 10] in a murine model. The authors showed a correlation between the acute phase of the histoplasma infection and the existence of a marked suppression of cellular immunity, cytotoxic activity, and primary antibody response. This suppression was induced not only by fungal antigens but also by sheep RBCs, a fact indicating that this phenomenon is apparently nonspecific. An additional observation is that the suppressive state was detected only in those animals inoculated with living fungal cells and that the suppression involved not only T cells but also adherent cells [8-10].

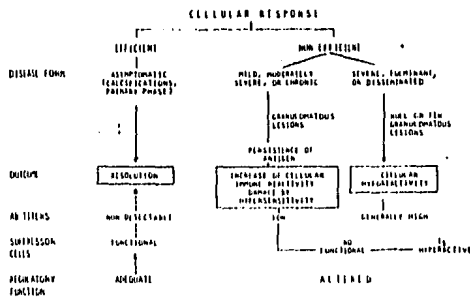
It is known that activation of the suppressor population can be specifically fostered by the presence of a soluble antigen or by antigen-antibody complexes. Although there is no evidence of soluble circulating *H. capsulatum* antigens, it is possible that this method of activation of a suppressor population does occur, since circulating immune complexes in histoplasmosis have been established [16]. Additionally, the idea that immunologic depression may be nonspecific introduces the possibility that some product of the fungus has an immunosuppressive effect [11]; a similar mechanism operates in infection due to *Plasmodium vivax*, *Trypanosoma cruzi*, and other microorganisms [17, 18].

Antibody Participation

The fact that antibodies participate as "regulatory molecules," particularly in their action on B cells, is indicated by the inhibition of antibody production through a feedback mechanism [19, 20].

Abrogation of cellular immune response by anti-idiotypic antibodies has been demonstrated in the manifestation of delayed-type hypersensitivity (DT11) to hapten phosphorylcholine [21]. Other

Figure 1. Relationship between the immune mechanisms in histoplasmosis and the outcome of disease. Abbreviations: AB = antibody; T_S = suppressor T cells.



studies demonstrated suppression of the DTH reaction to bovine γ -globulin (BGG) carrier by IgG2 antihapten antibodies [22].

Evidence of antibody activity on the cellular immune response in infectious processes is still scarce, although in a study of the role of cellular and humoral immune response in mice infected with *Nocardia brasiliensis*, Rico et al. reported inhibition of DTH by the passive transference of antibodies to *N. brasiliensis* [23].

Information accumulated in the literature suggests that, in many infections of bacterial or fungal etiology and in degenerative processes such as tumors, antibodies may play a very important role in the regulation of the cellular immune response [24-31]. There is some evidence that antibodies do not act alone but that an antigen-antibody complex mediates the regulatory effect; these complexes have been found to be present in tumoral processes [31], histoplasmosis [16], coccidioidomycosis [32], and tuberculosis [33]. In reality, the participation of immune complexes within the context of the immune response is rather ambiguous. However, as already explained, such complexes could play a regulatory role by, among other actions, stimulating T suppressor cells. They could also have a negative effect on the pathogenesis of disease by fixing complement and promoting tissue lesions [34]. This latter effect may explain the necrotic vasculitis observed in Lucio's leprosy [35].

Human disease. The relationship between antibody titers and disease prognosis could be an important argument for the modulating role of these molecules. This relationship has been established

in various mycotic diseases, especially histoplasmosis and coccidioidomycosis, and in similar illnesses such as nocardiosis [1-3], leprosy [36], and tuberculosis [26]. High antibody titers in patients with these infections are associated with a poor cellular response, as demonstrated by suppressed DTH, blastoid transformation, or other indication of cellular immune activity. In some cases, this condition could progress until a total cellular anergy is achieved.

Amil-Estrada et al. [30] examined during a one-year period the clinical and immunologic responses and the outcome of disease in a family with histoplasmosis. The results of their study suggest that such patients experience a cyclic and alternating increase in the cellular and humoral immune responses, as measured by evidence of DTH, production of migration-inhibiting factor (MIF), precipitation, and complement fixation. When DTH and MIF responses to histoplasmin were present, the antibodies appeared in low titers, and when the DTH and MIF responses were absent, the antibody levels increased. This relationship between the immune responses supports the idea of an interaction between them.

Experimental findings. Taylor et al. [29] found that, in mice sensitized to *H. capsulatum*, an increase in the expression of the cellular immune response (DTH) is preceded by a reduction in antibody titers. Similar results have been observed recently in experimentally induced infections in animals. Young and adult male syngeneic BALB/c mice were infected with a sublethal dose of *H. capsulatum* and checked weekly for cellular and hu-

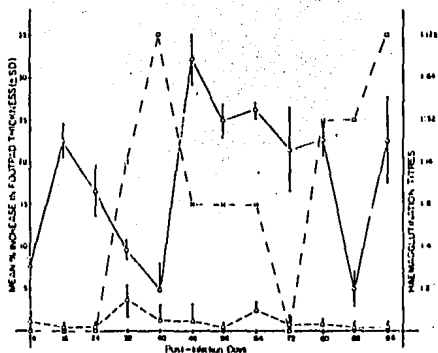


Figure 2. Correlation between cellular and humoral immune response during histoplasmosis as measured by increase in footpad thickness and hemagglutination, respectively. Results are for young syngeneic male BALB/c mice. Each point corresponds to the mean value for five animals. Symbols: \circ — \circ = mean percent increase in footpad thickness in infected mice that received histoplasmin antigen (30 μ g/0.05 ml of protein) minus the value in normal mice that received histoplasmin antigen; \square — \square = mean percent increase in footpad thickness in infected mice that received saline solution minus the value in normal mice; \square — \square = results of hemagglutination test performed by the glutaraldehyde method. Histoplasmin (1 mg/ml of protein) was used as antigen. Data courtesy of M. L. Taylor, R. A. Hernandez, N. Elizondo, J. Casasola, and M. R. Reyes Montes (unpublished observations).

moral immune responses. A correlation between these responses was observed during the course of infection. Figure 2 illustrates a cyclic occurrence of both responses in young mice, with one response displacing the expression of the other. The decrease at two points (day 40 and day 88) in DTH response apparently precedes the increase in antibody titers and vice versa. Similar results were obtained in adult mice. Moreover, when cellular immune response was measured by production of MIF, the cyclic relationship between humoral and cellular responses was again demonstrated. Furthermore, passive transference of antibody to *H. capsulatum* before infection reduced the rate of survival of adult mice (table 1) [37].

These results suggest that antibodies may behave as regulatory molecules either by modulating the expression of cellular immune response (as demonstrated by changes in footpad thickness in mice; figure 2) or by modifying the protective function of the cellular response during the infectious process (as demonstrated by decreased rates of survival in mice passively immunized; table 1). Moreover, observations made *in vitro* by Newberry et al. [28] indicate that the presence of antibodies to *H. capsulatum* inhibits the induction of lymphocytic transformation by histoplasmin.

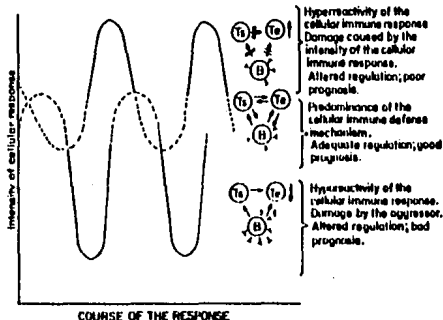
Although the manner in which antibody acts is not known, direct inhibition of the cellular response or activation of a lymphoid population having a suppressor function are postulated explanations. Furthermore, idiotypic antibody activity cannot be ruled out. Evidence of interaction between T cells and antibodies has been documented [12, 38, 39]. Moreover, it is possible that the con-

Table 1. Rates of survival of adult male BALB/c mice infected with *Histoplasma capsulatum* after passive transference of normal serum and *H. capsulatum* antiserum.

Conditions of transfer,	No. of infected mice	No. survived (%)
3 hr before infection		
antiserum	20	2 (10)
normal serum	12	8 (66.6)
Control	10	7 (70)
10 days after infection		
antiserum	10	10 (100)
normal serum	10	10 (100)

NOTE. Mice were infected ip with a sublethal dose (1.9×10^7 yeast cells/ml) of a weakly virulent strain of *H. capsulatum* (no. 3037). Serum containing high levels of antibody to *H. capsulatum* (as determined by EI ISA) or normal serum was passively transferred by 0.3-ml sc injection. Data are from [37].

Figure 3. Cellular immune response modulation in histoplasmosis. *Top*, the damage caused by hyperreactivity of the cellular response, i.e., hyperfunction of effector T cells (Te), could represent a regulation mechanism deficiency manifested by an inadequate modulation either by suppressor T cells (Ts) or by antibodies. This situation frequently coincides with a lack of antibody or low antibody titers. *Middle*, the ideal situation in which adequate regulation by B cells (B) and Ts cells is manifested. *Bottom*, the manifested hyporeactivity of the cellular immune response, i.e., hypofunction of Te cells, could be caused by an alteration in the regulatory mechanism in which suppressive activity could be triggered by Ts cells or by antibody production by B cells, which frequently coincides with high antibody titers. Symbols: \downarrow = lack or low functionality; \uparrow = hyperfunction; \downarrow = hypofunction; \times = antibody molecules.



centration and class or subclass of antibodies may play an important role in the action and expression of the cellular response. It is possible that high levels of antibody mask the antigenic determinants of the fungus, making them inaccessible for T lymphocyte stimulation; consequently, a low cellular response is produced. In contrast, lack of antibody production (or production of nondetectable levels) results in an unmodulated T lymphocyte response to the antigen; persistence of the antigen stimulates an exaggerated T lymphocyte response, and a hyperreactive condition develops (figure 3). The optimal situation would be the achievement of a level of antibody that would not affect the recognition of antigen by T lymphocytes but would adequately and efficiently modulate the cellular immune response.

Role of the Immune Response in the Pathogenesis of Histoplasmosis

Given the complexity of the host's defenses and the controversial nature of the mechanism of attack of the infectious agent in histoplasmosis, pathogenesis and immunity cannot be considered separately. Consequently, it may be proposed that, under conditions of immunocompetence, the immune ap-

paratus is capable of resolving a histoplasma infection by eliminating the fungus through its effector cells. However, in cases in which the infection produces severe and sustained tissue damage, the immune apparatus is apparently inefficient in eliminating the microorganism and produces lesions like those observed in hyperactivation of the cellular immune response (DTH).

In severe histoplasmosis in which no impairment of the immune system has been detected, thought should be given to the possible existence of mechanisms that allow the fungus to evade the effector component of the immune response: low antigenicity of the microorganism, antigen turnover, masking of antigenic determinants, resistance to lysis via phagocyte digestion, antiphagocytic activity, etc. Alternatively, it is important to consider the possible existence of mechanisms that permit alterations in the regulatory systems of the immune response. Most data indicate that the failure to eliminate the fungus stems from impairment in the regulation of the immune response.

Conclusion

The host-parasite relationship in histoplasmosis is poorly understood. The mechanism by which the

fungus provokes tissue damage apparently does not depend directly on the toxic activity of some product of the microorganism. It is possible that the persistence of the fungus in the host, regardless of the host's immune status, may be the result of a mechanism that permits evasion of the immune response. The inability to eliminate or destroy the microorganism may allow the continuous antigenic stimulation of the immunologic system, producing a special hyperreactivity of the cellular immune response (hypersensitivity). Although inefficient in destroying the intracellular parasite, such hyperreactivity causes the accumulation of cells in the infected area, thereby producing the typical granulomatous lesions. Damage to host tissue is a consequence of the intensity of the immune response. Under these circumstances, alterations in the regulation of the immune response occur; T effector cells could be triggered, while the modulation of the cellular response by T suppressor cells and antibody is apparently blocked. On the other hand, it is possible that the lesion may be produced by the direct effect of the fungus in the absence of a cellular response (cellular hyporeactivity), although there is no evidence to support this idea. In this case, there would also exist an alteration in the regulatory mechanism. In contrast with the situation just described, however, the T effector cells are depressed, while the action of T suppressor cells or antibodies is apparently triggered. Finally, it is possible that tissue damage is due to a nonspecific polyclonal activation induced by the fungus or that immune complexes in histoplasmosis participate in the tissue damage. At present, polyclonal activity of fungal products is being investigated.

A mechanism explaining the inability to destroy the fungus at the cellular level has not been clarified [40]. Since macrophages can actively endocytose but cannot digest the fungus, either the activity of lymphocytes on macrophages or the failure of the intrinsic digestive mechanism of the macrophage (perhaps induced by some product of the fungus) may be responsible.

An impairment in the regulation of the immunologic response in which the failure depends on lymphocyte activity could be postulated. Such postulation would be based on evidence that indicates the existence of an increased suppressive activity (presence of suppressor cells; detection of

suppressive phenomena during the infectious process) and on the probable role of either antibodies or immune complexes in determining changes in the modulation of the *H. capsulatum* cellular immune response.

The probable modulating role of antibodies may be explained by any or all of the following: (1) a process of inhibition of B lymphocytes by feedback, the mechanism of which has not yet been clarified [19, 20]; (2) elimination or masking of the antigen, which would not allow the activation or reactivation of the effector or regulatory cells [41, 42]; and (3) a direct interaction between the active site of the lymphocyte receptors and antibodies to *H. capsulatum* via, for example, an idiotype network [43, 44].

Many phenomena of the immune response in histoplasmosis remain unexplained. Of special interest are aspects of immune regulation. Further study may reveal a mechanism by which an adequate cellular response is modulated so as to prevent damage to host tissue.

References

- Rippon JW. Histoplasmosis. In: Medical mycology. 1st ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1974:321-47.
- Emmons CW, Binford CI, Utz JP, Kwang-Chung KJ. Histoplasmosis. In: Medical mycology. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1977:305-41.
- Yountans GI. Histoplasmosis, coccidioidomycosis, blastomycosis. In: Yountans GI, Paterson PY, Summers HM, eds. The biologic and clinical basis of infectious diseases. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1980:404-27.
- Russell JL, Golub ES. Functional development of the interacting cells in the immune response. III. Role of the neonatal spleen. *Eur J Immunol* 1977;7:305-9.
- Sluba JD, Paul S, Van Scoy RE, Hermans PI. Suppressor thymus-derived lymphocytes in fungal infection. *J Clin Invest* 1976;57:319-28.
- Sluba JD. Immunosuppression in man: suppression by macrophages can be mediated by interactions with regulatory T cells. *J Immunol* 1977;119:918-24.
- Artz RP, Bullock WE. Immunoregulatory responses in experimental disseminated histoplasmosis: lymphoid organ histopathology and serological studies. *Infect Immun* 1979;23:884-92.
- Artz RP, Bullock WE. Immunoregulatory responses in experimental disseminated histoplasmosis: depression of T-cell-dependent and T-effector responses by activation of splenic suppressor cells. *Infect Immun* 1979;23:891-902.
- Couch JR, Abdou NI, Sagawa A. Histoplasma meningitis with hyperactive suppressor T cells in cerebrospinal fluid. *Neurology* 1978;28:119-23.

10. Nickerson DA, Havens RA, Bullock WE. Immunoregulation in disseminated histoplasmosis: characterization of splenic suppressor cell populations. *Cell Immunol* 1981;60:287-97
11. Ruiz BI, Carvajal RE, Taylor ML. Immunosuppressive effect of histoplasmin in mice [abstract]. In: Program and abstracts of the 4th National Congress of Immunology and International Symposium on Immunobiology of Infectious and Parasitic Diseases, Oaxtepec, México, 1981:56
12. Cantor H, Boyse EA. Regulation of cellular and humoral immune responses by T cell subclasses. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1977;41:23-32
13. Eardley DJ, Hugenberg J, McVay-Bondreau L, Shen F-W, Gershon RK, Cantor H. Immunoregulatory circuits among T-cell sets. I. T-helper cells induce other T-cell sets to exert feedback inhibition. *J Exp Med* 1978;147:1106-15
14. Ellner JJ. Suppressor adherent cells in human tuberculosis. *J Immunol* 1978;121:2573-9
15. Bullock WE, Carlson EM, Gershon RK. The evolution of immunosuppressive cell populations in experimental mycobacterial infection. *J Immunol* 1978;120:1709-16
16. Bullock WE, Arze RP, Blithena D, Tung KSK. Histoplasmosis: association with circulating immune complexes, eosinophilia and mesangiopathic glomerulonephritis. *Arch Intern Med* 1979;139:700-2
17. Warren HS, Weidanz WB. Malarial immunodepression in vitro: adherent spleen cells are functionally defective as accessory cells in the response to horse erythrocytes. *Eur J Immunol* 1976;6:816-9
18. Cunningham DS, Kuhn RE. *Trypanosoma cruzi*-induced suppressor substance. II. Regulatory activity. *Immunogenetics* 1980;10:557-71
19. Uhr JW, Baumann JB. Antibody formation. I. The suppression of antibody formation by passively administered antibody. *J Exp Med* 1961;113:935-57
20. Uhr JW, Muller G. Regulatory effect of antibody on the immune response. *Adv Immunol* 1968;8:81-127
21. Yamamoto H, Katz DH. Effective suppression of hapten-specific delayed-type hypersensitivity (DTH) responses in mice by anti-idiotypic antibodies. In: Bach FH, Bonavida B, Viretta ES, Fox CF, eds. T and B lymphocytes: recognition and function. New York: Academic Press, 1979:305-15.
22. Neveu PJ, Micusan VV, Fafard A, Ilorduas AG. Modulation of the immune response by passive antibodies. IV. Effects of IgG1 and IgG2 anti-hapten antibodies. *Immunology* 1978;35:129-32
23. Rico G, Ochoa R, Olivo A, Ortiz-Oritz L. Role of antibody in *Neovardia brasiliensis* infection in mice. In: Schaal/Pulverer, eds. Actinomyces. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag, 1981:229-33
24. Fougat A, Benoit JC, Tuncotte R, Gusew-Chartrand N. Enhancement activity of anti-mycobacterial sera in experimental *Mycobacterium bovis* (BCG) infection in mice. *Infect Immun* 1976;13:1300-6
25. Fougat A, Bardvas AG, Richer G, Frappier A. Rôle d'anticorps facilitant dans le développement d'une infection bactérienne à caractère chronique: la synovite staphylococcique expérimentale de poussin. *Revue Européenne des Etudes Cliniques et Biologiques* 1979;15:895-9
26. Lenzi L, Rotoli F, Rotoli L. The spectrum of human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1977;27:230-7
27. Lai A, Fat RFM, Chan Pin Jin J, Van Furth R, Harboe M. In vitro synthesis of anti-mycobacterial antibodies in biopsies from skin lesions of leprosy patients. *Infect Immun* 1980;27:297-301
28. Newberry WM Jr, Chandler JW Jr, Chin TDY, Kirkpatrick CH. Immunology of the mycoses. I. Depressed lymphocyte transformation in chronic histoplasmosis. *J Immunol* 1968;100:436-43
29. Taylor ML, Eslava Campos C, Garcia González R, Hernández-Ramírez A. Relation between cellular and humoral immune response in mice immunized with *Histoplasma capsulatum*. In: Kuttin ES, Baum GI, eds. Human and animal mycology: proceedings of the 7th congress of ISHAM, Jerusalem, Israel, March 11-16, 1979. New York: Elsevier/North Holland, 1980:97-101
30. Amil-Estrada E, Velasco Castrejón O, Estrada-Parra S. Aspecto inmunológico de la histoplasmosis pulmonar primaria. Resumen I Congreso Nacional de Inmunología, Oaxtepec, México, 1976:52
31. Sjogren HO, Hellstrom I, Hansal SC, Hellstrom KE. Suggestive evidence that the "blocking antibodies" of tumor-bearing individuals may be antigen-antibody complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:1372-5
32. Yoshino S, Cox RA, Pope RM. Circulating immune complexes in coccidioidomycosis. Detection and characterization. *J Clin Invest* 1980;66:655-63
33. Rojas-Espinoza O, Aguilar-Santelices M, Garcia GJE, Díaz-Gómez ML, Zenteno-Morales A, Gutiérrez-Haro RM, Padilla-Serpa LA. Presence of circulating immune complexes in far advanced tuberculosis as detected by a complement consumption test [abstract]. In: Program and abstracts of the 4th National Congress of Immunology and International Symposium on Immunobiology of Infectious and Parasitic Diseases, Oaxtepec, México, 1981:39
34. Nydegger UE, Karatzikine MD, Lambert PH. Involvement of immune complexes in disease. In: Fougereau M, Dausset J, eds. Immunology 80. Progress in immunology IV. New York: Academic Press, 1980:1025-43
35. Estrada-Parra S, Rojas-Espinoza O, Quesada-Pascual F, Ortiz Y, Castro ME, Paulierna J, Jiménez L. Lepra de Lucio. IV. Perfil inmunológico. *Dermatología Revista Mexicana* 1978;22:175-81
36. Ridley DS, Jophing WL. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr* 1966;34:355-73
37. Taylor ML, Hernandez RA, Elizondo N, Casavola J, Reyes Montes MK. Interferencia del suero immune específico con la respuesta celular en la histoplasmosis murina. Resumen V Congreso Nacional de Inmunología, México DF, México, 1983:8.
38. Ferrarini M, Moretta L, Abiile R, Durante ML. Receptors for IgG molecules on human lymphocytes forming spontaneous rosettes with sheep red cells. *Eur J Immunol* 1975;5:70-2
39. Yodoi J, Ishizaka K. Lymphocytes bearing Fc receptors for

- IgE. I. Presence of human and rat T lymphocytes with Fc ϵ receptors. *J Immunol* 1979;122:2577-83
40. Howard DH. The role of phagocytic mechanisms in defense against *Histoplasma capsulatum*. In: Proceedings of the 3rd International Conference on the Mycoses. Pan American Sanitary Bureau scientific publication no. 304. Washington, DC: Pan American Health Organization 1975:50-9
41. Hoffmann MK. Antibody regulates the cooperation of B cells with helper cells. *Immunol Rev* 1980;49:79-91
42. Fitch FW. Selective suppression of immune responses. *Progr Allergy* 1973;19:193-244
43. Jerne NK. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)* 1974;125C:373-89
44. Rodkey LS. Autoregulation of immune responses via idiotype network interactions. *Microbiol Rev* 1980;44:611-59

**CHANGES IN THE CELLULAR IMMUNE RESPONSE TO MURINE HISTOPLASMOSIS
INDUCED BY ANTIBODY.**

Taylor M L¹, Hernández A, Elizondo N, Casasola J,¹ Reyes-Montes M R,
Acosta G².

Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, UNAM. Grupo
Multidisciplinario de Micosis (GMH). ¹Instituto Nacional de Enferme-
dades Respiratorias (INER). ²Laboratorio de Inmunoquímica, Escuela
Superior de Medicina, IPN. México, D.F.

Running Title: Immunoregulation in histoplasmosis.

Reprints: M L Taylor*

Depto. Ecología Humana
Facultad de Medicina
Cd. Universitaria
UNAM
04510 México, D.F. MEXICO

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant (ICSANAL-800709) from the Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología, México.

We thank Mrs. Paty Caraballo for manuscript assistance.

CHANGES IN THE CELLULAR IMMUNE RESPONSE TO MURINE HISTOPLASMOSIS INDUCED BY ANTIBODY.

Taylor HL, Hernández A, Elizondo N, Casasola J¹, Reyes-Montes MR, Acosta G².

Depto. de Ecología Humana, Facultad de Medicina, UNAM. 04510 México, D.F. Grupo Multidisciplinario de Micosis (GMH). ¹Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). ²Laboratorio de Inmunología, Escuela de Medicina, IPN. México, D.F.

ABSTRACT.

The course of humoral and cellular responses were followed throughout infection in experimental histoplasmosis. A possible modulatory role of immune sera and IgG immunoglobulins in the cell-mediated immune response developed during the infection produced by the fungus Histoplasma capsulatum was also studied. The results demonstrated: a) That there was a cyclic distribution of cellular and humoral immune responses in infected mice; b) That the passive transfer of anti-Histoplasma antibodies abrogated the survival of mice sublethally infected, when the sera were transferred 3 hrs prior to infection; c) That the transfer of immune sera and purified IgG modified the immune responses in the animals depending upon the time of transfer, and d) That the IgG appears to abrogate the delayed-type response more efficiently when transferred 10 days after infection. The results obtained from this experimental model suggest that antibody may play a modulating role in cell-mediated responses in histoplasmosis.

INTRODUCTION.

Histoplasmosis is a fungal disease produced by Histoplasma capsulatum which induces a typical intracellular host-parasite relationship. It shares with other intracellular microorganisms the characteristic that the pathogenic mechanism by which the etiologic agent causes tissue damage during the infection is unknown (1-3).

Throughout the illness, the immune response is characterized by the inefficiency of the host in developing an optimal response; sometimes this circumstance is manifested by hyper-reactivity of the cell mediated response committed with the pathology of the infectious process (3). Consequently, an adequate modulation of the immune mechanisms implicates its efficiency in the outcome of the disease.

It is accepted that regulatory functions of the immune system involve different mechanisms of the immune response. Among the diversity of the immunoregulatory mechanisms, humoral effectors have a special interest due to the critical role that antibodies could play on the regulation of the humoral and cellular immune responses. Today it is assumed that anti-idiotypic antibodies suppress delayed-type hypersensitivity (DTH) to haptens like p-azobenzene arsonate (4), phosphoryl choline (5), etc. However, little consideration has been given to the specific antibody as a regulatory component, although its influence on antibody production via a feedback mechanism was described many years ago (6-7). The role of specific antibodies on the intracellular infection is contradictory, their participation

on immune damage has been proposed in some illnesses (3) and their usefulness as a diagnostic and prognostic tool has been discussed.

Some evidence points to antibodies as regulatory elements in infectious processes (8-11), furthermore auto-anti-idiotypic antibodies have been shown to inhibit delayed-type hypersensitivity to purified protein derivatives (PPD) in BCG infected mice (11).

Different observations support the role of the antibody as a regulatory component over cellular mediated immunity in histoplasmosis: first, the relationship between high antibody titers and low cellular response which concurs with a critical outcome of the disease (1-3); second, the inhibition of lymphocyte transformation induced by the antigen histoplasmin in the presence of anti-Histoplasma antibodies (12); and third, the inverse correlation between cellular and humoral response during the course of experimental histoplasmosis (13).

However, evidence is circumstantial and more studies are necessary to support the regulatory role of antibodies on cellular response in models of intracellular infections. We examined the development of the cellular and humoral response using a murine Histoplasma infection model in attempts to elucidate the influence of antibodies on the cellular immune response triggered by this infection.

MATERIALS AND METHODS.

Microorganism. H. capsulatum strain 5037 tested for its virulence was grown in yeast-phase cells at 37°C in brain heart infusion broth (BHI)

4

(Bioxon, México) supplemented with 1% glucose and 0.1% L-cysteine. Mycobacterium tuberculosis H37 Rv was used as control and maintained in Lowenstein-Jensen medium and PBY (Proskauer, Beck, Youmans) in order to obtain biomass.

Animals. Young (1 month) and adult (4.5 month) inbred BALB/c male mice were used and maintained in our laboratory with animal facilities. Mice were originally separated by age and given mouse chow (Purina de México, S.A. de C.V.) and water ad libitum.

Histoplasma inocula. The fungus was grown in supplemented BHI for three days and harvested by centrifugation at 300 x g for 30 minutes. Organisms were then inoculated into a synthetic medium (14) for 24 hours. They were harvested again and suspended in a balanced saline solution (BSS) at the desired concentration. All inocula were tested for viability and conversion to mycelial phase at 28°C on BHI agar slants.

Histoplasma infection. Yeast cells contained in one ml of BSS were inoculated intraperitoneally into mice. A sublethal dose for young (3.16×10^7 cells/ml) and for adult (1.99×10^8 cells/ml) mice was used throughout the study as determined in a previous experiment (15). Another group of animals was processed in the same manner in order to obtain only antisera.

Mycobacterium antisera. Mycobacterium tuberculosis was harvested by centrifugation of a PBY culture, suspended in BSS at a sublethal dose for adult male BALB/c mice (2.34×10^7 bacteria/ml), and inoculated intraperitoneally into mice. Sera were separated and pooled for purification procedures.

Histoplasma and Mycobacterium Immune sera purification. Blood was collected from animals 30 days after infection. Globulins were obtained at 4°C by ammonium sulfate precipitation at 33% saturation, pH 6.8. The precipitated globulins were centrifuged at 2500 x g, redissolved in distilled water and dialyzed against phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 (16). Globulins from control mice were fractionated by the same method. Proteins concentration were determined according to Lowry et.al. (17).

IgG purification. Immunoglobulin G from mice infected with Histoplasma was purified by affinity chromatography as described by Goudswaard et.al. (18). Five milliliters of sera were passed through a column (1 x 6 cm) of protein A sepharose CL-4B (Sigma Fine Chemical). Non-attached proteins were eliminated by washing the column with phosphate buffered saline (PBS) 0.01M pH 7.2 until the optical density was 0.02 at 280 nm. Bound IgG was eluted with 5 ml of 1.5 M ammonium thiocyanate pH 6.5. They were dialyzed against PBS extensively and stored at -20°C.

Antibody determination. The antibody titers for passive serum transfer of anti-Histoplasma, anti-Mycobacterium immune sera and Histoplasma IgG were determined by ELISA method (19) using mouse anti-gammaglobulin and anti-IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma). This method has been standardized in our laboratory using histoplasmin antigen, at a concentration of 100 µg of protein for each well of polystyrene plates, and using PPD as Mycobacterium antigen at 200 µg of protein for coated plates.

Passive serum transfer. Histoplasma immune sera, Mycobacterium immune sera, purified Histoplasma IgG or normal sera, were injected subcutaneously (300 µg of protein/0.3 ml), 3 hrs prior to, or, 10 days after Histoplasma infection. The specificity of sera was tested by ELISA.

Correlation between cellular and humoral immune response throughout infection. A total of 120 mice for each experimental group were used, using 5 animals for each point. Groups of mice aged one or 4.5 months were tested at different times. Infection with a sublethal dose of Histoplasma yeast cells for each age group was carried out as described above. Cellular and humoral responses were monitored every 8 days.

Cellular response was measured by delayed-type hypersensitivity (DTH), expressed by the footpad swelling test as described previously (20, 21) using histoplasmin (30 µg protein/0.05 ml) from a single lot, reading the test 24 hrs after antigen challenge. The humoral response was detected by passive hemagglutination assay (22) using sheep erythrocytes (SRBC) coated with histoplasmin at 1 mg protein/ml (23). The titer recorded is the highest dilution of antiserum in which agglutination was demonstrated. Two experiments per age group were analyzed by statistical methods and in a third experiment, cellular response was also checked by macrophage inhibition factor (MIF) production and the humoral response was confirmed by the ELISA method.

Passive serum transfer versus percent survival and cellular response to Histoplasma infection. Two types of experiments were performed each

in duplicate. Initially, only normal and Histoplasma immune sera were transferred and the percent survival was determined. A total of 62 mice were used in the first series of experiments. A second series of experiments included normal sera, Histoplasma and Mycobacterium immune sera and the purified anti-Histoplasma IgG fractions. Ten animals were used for each group. The percent survival and DTH reactivity were determined over 30-40 days throughout the experiments. Animals deaths were checked by organ culture for the fungus.

Organ cultures. Spleen, lung and liver from infected dead mice were homogenized in BSS supplemented with 50 µg/ml of gentamicin. Homogenates were inoculated in duplicate onto Sabouraud agar with antibiotics (Mycobiotic Bioxon de México) and BHI-agar at 26-28°C.

Statistical analysis. Statistical studies were performed using Student's t test (24).

RESULTS.

Correlation between cellular and humoral immune response throughout infection. Young and adult mice with sublethal infection, were monitored for their cellular and humoral responses every 8 days over a 3 months period. Both responses are plotted together to establish a comparison between the immune manifestations throughout the infection. Figure 1 and 2 illustrate the results for the two age groups used. The

results exhibit a cyclic distribution with a displacement between each immune response. A special characteristic that can be observed is the decrease of the cellular response measured by the footpad swelling tests, which apparently precedes the increase of antibody titers detected by hemmagglutination. For young mice (Fig. 1) there was a depression in cell mediated responses at two points, days 40 and 88. While the humoral response increased at days 32, 80 and 88. With the adult mice (Fig. 2), the cellular response decreased at 24, 64 and 88 days respectively, while antibodies increased at 32 and 72 days. MIF and ELISA showed similar results to the previous tests.

Antibody determination. Antibodies to Histoplasma or Mycobacterium were detected by the ELISA method for all experiments of passive transfer. Using histoplasmin as antigen, a whole anti-Histoplasma sera gave a titer of 1:1280; the ammonium sulfate precipitated anti-Histoplasma gammaglobulin showed a titer of 1:640 and the purified anti-Histoplasma IgG 1:160. For anti-Mycobacterium sera, PPD was used as an antigen and the ammonium sulfate precipitated anti-Mycobacterium sera had a titer of 1:2560. Normal sera were always negative to histoplasmin and PPD antigens.

Passive serum transfer versus percent survival to Histoplasma infection. Figure 3 illustrates a drastic abrogation of survival (10%) of adult mice, when anti-Histoplasma antibodies were transferred 3 hrs prior to infection, but antibody transferred 10 days postinfection did not modify the survival of the infected animals (100%). Seventy percent survival was observed in the infection controls without serum transfer: Normal sera did not interfere

with the outcome of the disease, since a 66.6% survival was detected when it was transferred 3 hrs prior to infection.

Passive serum transfer versus cellular response to Histoplasma infection. Six groups of animals were used in each experiment. One was performed with transfer 3 hrs prior to infection and another 10 days after infection. Mice which received sera 3 hrs before infection developed a lower delayed-type hypersensitivity (DTH) (Fig. 4). The lowest levels of DTH were detected at 16 and 24 days post infection ($p < 0.02$) in the groups which received normal serum or anti-Histoplasma purified IgG ($p < 0.001$ and $p < 0.05$). Animals which received sera 3 hrs prior to infection developed the typical signs of disease such as irritability and weight loss, and followed the usual course of infection. However, animals which received adoptive transfer 10 days post infection (Fig. 5) developed a less severe course of disease and the DTH response was only abrogated by anti-Histoplasma IgG ($p < 0.001$) at 16 and 24 days when compared with the nontransferred infection control group. In a repeated experimental series, anti-Histoplasma antibody determination was performed at the same time as the footpad test. Results in the DTH response were similar, while antibodies to Histoplasma were detected at high levels only in the groups of animals which received specific transfer.

Organs cultures. Table 1 shows the isolation of the fungus, particularly

from the spleens of infected mice which were transferred with immune sera. H. capsulatum was isolated at days 15, 24 and 32 from all groups of transferred and infected mice, except at day 8 when the transfer of immune sera was made 3 hrs prior to infection.

DISCUSSION.

Literature concerning the relationship between antibody and cell mediated response in histoplasmosis is controversial. Serum causes specific suppression in active human histoplasmosis, since responses to mitogen and other fungal antigens were unaffected (25). Sera of patients with histoplasmosis suppressed lymphocyte transformation (LT) of healthy histoplasmin-positive reactors, while sera of healthy histoplasmin reactive persons increased histoplasmin responses of patients (12, 26). Some authors have suggested that antibodies may increase or decrease LT responses depending on the ratio of antigen to antibody (27).

The little evidences concerning a definite role for antibodies in the process of Histoplasma infection adds to the concept of its diminished importance in the defense against this disease, prompting us to investigate the probable function of these molecules in the course and the outcome of this intracellular illness.

Using an experimental murine model of histoplasmosis, in which disease is characterized by the typical signs of the infection in mice and the isolation of fungus from the tissue, our results support the possible

participation of antibodies in the immune modulation mechanisms of the cell mediated response. The first series of assays demonstrate a correlation between cellular and humoral responses during the infectious process in young and adult mice, and provide evidence for a cyclic distribution in both immune responses with a special characteristic of displacement between them (Fig. 1 & 2). These circumstances, whereby the increase of one response precedes the decrease of another response, suggests the existence of a modulation mechanism. Furthermore, in some experiments a good correlation among hemagglutination and ELISA titers was detected. Using the MIF method to test the cellular response, we also observed the same phenomenon.

It is important to note that these results are only observed with a sublethal infection, because in other circumstances (severe acute phase) the drastic resolution of the illness abbreviates the animals survival. In order to determine if sera were capable of changing the cellular defense, passive serum transfer was performed. The next series of experiments suggest an interference of antibodies in the efficiency of the cellular defense mechanism and delayed type response (DTH) in histoplasmosis. The effect of anti-Histoplasma antibodies depends on the time of transference in accordance with the moment of infection. In animals, the disease has a drastic outcome if anti-Histoplasma antibodies are injected 3 hrs prior to infection, however, if the transference occurs 10 days after infection there is no influence in the percent survival of the infected animals (Fig. 3). It is possible that the behavior of each group of transferred mice involved different mechanisms. The serum transfer at

3 hrs prior infection, could interfere with the afferent phase of the immune reaction and the macrophage could be the target cell for the sera effect. Two circumstances support this idea: first, sera altered the efficiency of the defense by modifying the induction of the immune response, and one would expect that the macrophage is blocked to resolve the infection; the second circumstance, is compatible with the IgG effect observed along all our experiments (Fig. 4 & 5). Considering that macrophages have Fc receptor (Fc RI or Fc RII) for this immunoglobulin class (28), it is possible that the phagocytic efficiency could be altered by IgG. Also, it is possible that immunoglobulin contributes to trigger any kind of suppressor cells such as macrophage-like cells and T suppressor cells, which have been described as mediating suppressor activity in histoplasmosis and other intracellular infections (29-32), although it is not very clear, how antibodies would act in these circumstances.

The capability to develop a complete and functional protective cellular response by sublethally infected animals was abrogated only by the immune sera transfer 3 hrs prior infection in all experiments. However, we could detect some variations in the particular manifestation of cellular response, the delayed-type hypersensitivity.

By checking this phenomenon we observed that the serum transfer 3 hrs prior infection (Fig. 4) did not discriminate the interference effect on DTH among all groups studied, although anti-Histoplasma IgG and normal sera have the most critical effect. The possible explanation

for this observation could be a generalized effect by non specific mechanisms on the DTH expression.

In view that normal sera did not induce a high fatality, normal IgG's were not used.

The fact that only the Histoplasma IgG was capable of producing a critical decrease of DTH response, observed when sera were injected 10 days after infection (Fig. 5), plus the observation that whole anti-Histoplasma serum did not abrogate the survival of infected animals when transferred 10 days after the infection challenge, permits us to postulate that different mechanisms could be involved depending on the time of sera transfer. This also supports the possibility that specific IgG could be the responsible of the effect in mice survival when transferred with immune sera 3 hrs prior infection.

The exact effect of immunoglobulin is not clear, it could interfere with the macrophages either in the processing antigen phase or by altering the efficiency of the phagocytic process, also they could stimulate suppressor cells, by the FcR receptor (33). The importance of IgG as a regulatory molecule is assumed by the suppressive effect of IgG₂ anti-idiotypic antibody detected in other systems (34).

Human immunoglobulin in histoplasmosis has been studied by many authors, Cox has observed that the serum level of IgG, IgA and IgE are increased in histoplasmosis (25, 35, 36). With the exception of IgA, the other two immunoglobulins have been related to the level expression

of cell mediated immune response. IgG₂ has been committed with the delayed-type hypersensitivity abrogation in a system carrier-hapten, where the DTH response to carrier BGG (bovine gammaglobulin) has been inhibited by IgG₂ subclass antibodies to the hapten (34). In a related fungal disease, coccidioidomycosis, an IgG mediated T cell suppression was observed (37).

The role of specific antibodies in intracellular infections is a very interesting problem. For example it would appear that an antibody, when present before Coxiella burnetti infection accelerates the initial interactions of the inductive phase of the cellular immune response (38), however it is difficult to characterize the exact effect of antibodies in these circumstances.

Regulatory mechanisms have many variations in their specificity, one of the most interesting aspects involves immune complex and anti-idiotypic antibodies. It is possible that specific antibodies or some immunoglobulins produced during the infectious process act like anti-idiotypic antibodies (39). They could react with antigen receptors present on the lymphocyte membrane, which share analogous epitopes with the idiotypes, therefore anti-idiotypic antibodies could have anti-receptor activity (40). It is possible also that antigen-antibody complex are efficient to induce anti-idiotypic antibodies and some reports suggest that they activate suppressor cells (4), and circulating immune complexes have been described in histoplasmosis (41). We would like to check these possibilities in the future.

We know that antibodies are not the only serum factors that could interfere with the cellular response, non specific factors and non immunoglobulin factors have also been reported (42, 43), perhaps explaining why we observed the influence of normal sera on the abrogation of DTH. However, there is an abundance of evidence which strongly support the regulatory function of antibody molecules, either by mechanisms which involve specificity or by cross reactivity.

REFERENCES.

1. Rippon J W. Histoplasmosis. In: Saunders W B, ed. Medical mycology 1st ed. Philadelphia 1974; 321-47.
2. Emmons C W, Binford C H, Utz J P, Kwong-Chung K J. Histoplasmosis. In: Lea & Febiger, ed. Medical mycology 3rd ed. Philadelphia 1977; 305-41.
3. Youmans G P, Paterson P Y, Sommers H M. Histoplasmosis, coccidioidomycosis, blastomycosis. In: Saunders W B, ed. The biologic and clinical basis of infectious diseases. 2nd ed. Philadelphia. 1980; 404-27.
4. Sy M S, Bach B A, Dohi Y, Nisonoff A, Benacerraf B, Greene M I. Antigen and receptor driven regulatory mechanisms. I. Induction of suppressor T cells with anti-idiotypic antibodies. J Exp Med 1979; 150: 1216-28.
5. Yamamoto H, Katz D H. Effective suppression of hapten-specific delayed-type hypersensitivity (DTH) responses in mice by anti-idiotypic antibodies. In: Bach F H, Bonavida B, Vitetta E S, Fox C F, eds. T and B lymphocytes: Recognition and function. ICM. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. Vol XVI Academic Press. New York 1979; 305-15.
6. Uhr J W, Baumann J B. Antibody formation. I. The suppression of antibody formation by passively administered antibody. J Exp Med 1961; 113: 935-57.
7. Uhr J W, Möller G. Regulatory effect of antibody on the immune response. Adv Immunol 1968; 8: 81-127.

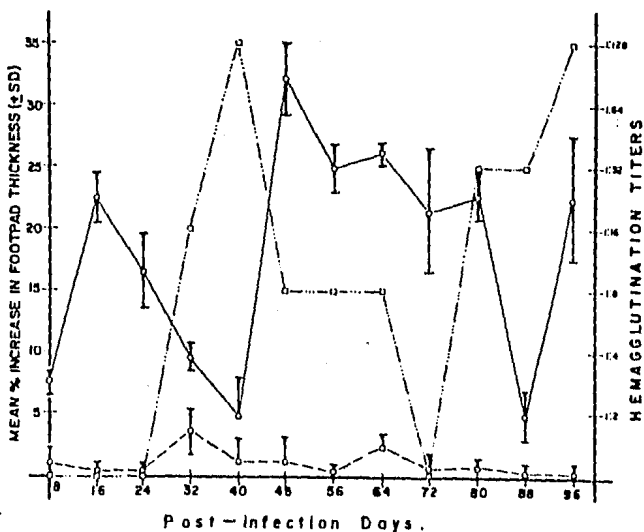
8. Lenzini L, Rottoli P, Rottoli L. The spectrum of human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 1977; 27: 230-7.
9. Ridley D S, Jopling W H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr* 1966; 34: 255-73.
10. Taylor ML, Dfaz S, González P A, Sosa A C, Toriello C. Relationship between pathogenesis and immune regulation mechanisms in histoplasmosis: A hypothetical approach. *Rev Infect Dis* 1984; 6: 775-82.
11. Colizzi V, Giuntini M, Garzelli C, Campa M, Falcone G. Auto-anti-idiotypic antibodies inhibit T-cell mediated hypersensitivity in BCG-infected mice. *Cell Immunol* 1983; 80: 205-10.
12. Newberry Jr W M, Chandler Jr J W, Chin T O Y, Kirkpatrick C H. Immunology of the mycoses. I. Depressed lymphocyte transformation in chronic histoplasmosis. *J Immunol* 1968; 100: 436-43.
13. Taylor ML, Eslava-Campos C, García-González R, Hernández-Ramírez A. Relation between cellular and humoral immune response in mice immunized with Histoplasma capsulatum. In: Kuttin E S, Baum G L, eds. Human and animal mycology: proceedings of the 7th Congress of ISHAM, Jerusalem, Israel. March 11-16, 1979. New York: Elsevier/North Holland, 1980; 97-101.
14. Tewari R P, Kugel H L. Suppressive effect of streptomycin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages for Histoplasma capsulatum. *Mycopathol Mycol Appl* 1971; 44: 231-40.

15. Taylor ML, Reyes-Montes MR, González G R, Casasola J, Hernández-Ramírez A. Immune response changes with age and sex as factors of variations in resistance to Histoplasma infection. In: Baxter M, ed. Human and animal mycology: proceedings of the 8th Congress of ISHAM. Palmerston North, Massey University, New Zealand 1982; 260-4.
16. Heide K, Schwick H G. Salt fractionation of immunoglobulins. In: Weir D M, ed. Handbook of experimental immunology. 3th ed. Blackwell Scientific Pu London 1978; 7.1-7.11.
17. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. Protein measurements with the folin-phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-75.
18. Goudswaard J, Vander Donk J A, Van Dam Noordzij R H, Vaerman J P. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. Scand J Immunol 1978; 8: 21-8.
19. Yolken R B. Enzyme immuno assays for the detection of infectious antigen in body fluids. Current limitation and future prospects. Rev Infect Dis 1982; 4: 35-68.
20. Rifkin D, Frey J A, Davis J R, Peterson E A, Dinowitz M. Delayed hypersensitivity to fungal antigen in mice. I. Use of the intradermal skin and footpad swelling test as assays of active and passive sensitization. J Infect Dis 1970; 133: 50-6.

21. Taylor ML, Reyes-Montes MR, Lachica A, Eslava-Campos C, Olvera J, Maxwell R. Immunology of histoplasmosis: Humoral and cellular activity from a polysaccharide protein complex and its deproteinized fraction in experimentally immunized mice. *Mycopathologia* 1980; 71: 159-66.
22. Avrameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochem* 1967; 6: 43-52.
23. Reyes-Montes MR, Martínez A, Toriello C, Taylor ML. Antigens from Histoplasma capsulatum and Blastomyces dermatitidis. I. Immunological comparative studies from polysaccharide-protein complexes of both fungi. *Mycopathologia* 1982; 78: 17-23.
24. Fisher R A. Statistical methods for research workers. In: Oliver & Bayd, ed. 5th ed. Edinburg. 1934.
25. Cox R A. Immunologic studies of patients with histoplasmosis. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120: 143-9.
26. Kirkpatrick CH, Chandler Jr J W, Smith T K, Newberry Jr W H. Cellular immunologic studies in histoplasmosis. In: Balows A, ed., *Histoplasmosis*, Thomas Springfield, Ill. 1971; 371-9.
27. Alford R H, Goodwin R A. Patterns of immune response in chronic pulmonary histoplasmosis. *J Infect Dis* 1972; 125: 269-75.

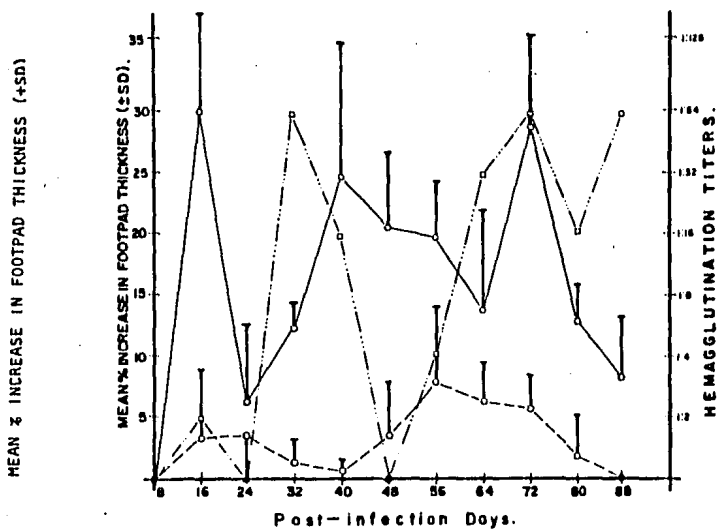
28. Leslie R G G. The characterization of cell receptors for IgG. *Immunology today* 1982; 3: 265-7.
29. Ellner J J. Suppressor adherent cells in human tuberculosis. *J Immunol* 1978; 121: 2573-9.
30. Stobo J D. Immunosuppression in man: suppression by macrophages can be mediated by interactions with regulatory T cells. *J Immunol* 1977; 119: 918-24.
31. Nickerson D A, Havens R A, Bullock W E. Immunoregulation in disseminated histoplasmosis: Characterization of splenic suppressor cell populations. *Cell Immunol* 1981; 60: 287-97.
32. Bullock W E, Carlson E H, Gershon R K. The evolution of immunosuppressive cell populations in experimental mycobacterial infection. *J Immunol* 1978; 120: 1709-16.
33. Moretta L, Mingari M C, Moretta A, Haynes B F, Fauci A S. T cell Fc receptors as markers of functional human lymphocyte subsets. In: Fougereaud M, Dausset J, eds. *Immunology 80 "Progress in Immunology IV"* Academic Press New York. 1980; 1: 223-38.
34. Neveu P J, Micusani V V, Fajfard A, Borduas A G. Modulation of the immune response by passive antibodies. IV. Effects of IgG₁ and IgG₂ antihapten antibodies. *Immunology* 1978; 35: 129-32.
35. Chandler Jr J W, Smith T K, Newberry Jr W H, Chin T D Y, Kirkpatrick C H. Immunology of mycosis. II. Characterization of the immunoglobulin and antibody responses in histoplasmosis. *J Infect Dis* 1969; 119: 247-54.

36. Cox R A, Douglas A R . Immunoglobulin E in histoplasmosis. *Infect Immun* 1980; 29: 290-3.
37. Cox R A, Pope R H, Yoshinoya S. Immune complexes in sera of patients with coccidioidomycosis. *Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol* 1979; F33, 368.
38. Humphres R C, Hinrichs D J. Role for antibody in Coxiella burnetii infection. *Infect Immun* 1981; 31: 641-5.
39. Dressman G R, Kennedy R C. Perspective. Anti-idiotypic antibodies: Implications of internal image-based vaccines for infectious diseases. *J Infect Dis* 1985; 151: 761-5.
40. Binz H, Wigzell H. Shared idiotypic determinants on B and T lymphocytes reactive against the same antigenic determinants. I. Demonstration of similar or identical idiotypes on IgG molecules and T cell receptors with specificity for the same alloantigens. *J Exp Med* 1975; 142: 197-211.
41. Bullock W E, Artz R P, Bhatena D, Tung K S K. Histoplasmosis: Association with circulating immune complexes, eosinophilia and mesangio-pathic glomerulonephritis. *Arch Intern Med* 1979; 139: 700-2.
42. Levene G M, Turk J L. Reduced lymphocyte transformation due to a plasma factor in patients with active syphilis. *Lancet* 1969; ii: 246-7.
43. Bullock Jr W E, Fasal P. Studies of immune mechanisms in leprosy. III. The role of cellular and humoral factors in impairment of the in vitro immune response. *J Immunol* 1971; 106: 888-99.



POST-INFECTION DAYS

FIGURE 1. CORRELATION BETWEEN CELLULAR AND HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN YOUNG MICE DURING THE *Histoplasma* INFECTION. Footpad swelling test vs hemagglutination. Syngeneic male BALB/c mice were used. O—O mean per cent of increase in footpad thickness in infected mice using histoplasmin antigen (30 μ g protein/0.05 ml) minus the histoplasmin antigen value in normal mice; O---O mean percent of increase in footpad thickness in infected mice using control with saline solution minus the value in normal mice; \square — \square hemagglutination test performed by the glutaraldehyde method. Histoplasmin at 1 mg protein/ml was used as antigen. \pm SD—Standard Deviation.



POST-INFECTION DAYS

FIGURE 2. CORRELATION BETWEEN CELLULAR AND HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN ADULTS MICE DURING THE *Histoplasma* INFECTION. Footpad swelling test vs hemagglutination. Syngeneic male BALB/c mice were used. All experimental conditions and symbols are the same as figure 1.

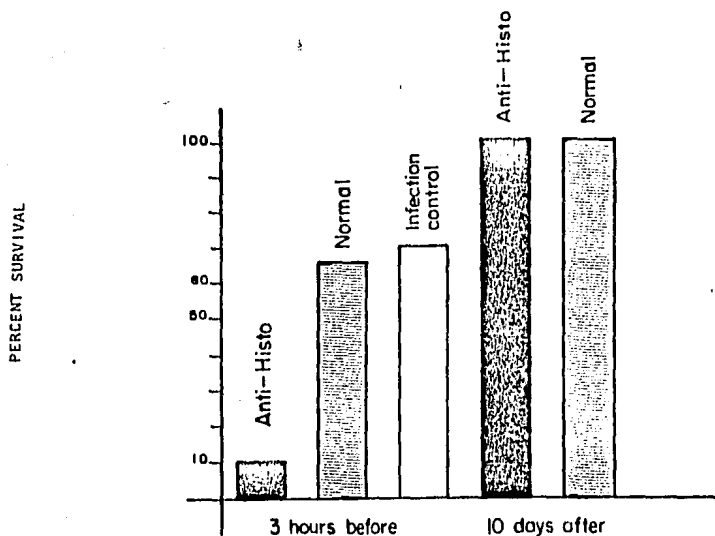


FIGURE 3. PERCENT SURVIVAL OF MALE ADULT BALB/c MICE INFECTED WITH *Histoplasma capsulatum* AND TRANSFERRED PASSIVELY WITH ANTI-HISTOPLASMA SERA. Mice were infected intraperitoneally with a sublethal dose (1.9×10^6 yeast cells/ml) of a low virulent strain of *Histoplasma capsulatum* N^o 5037. Passive serum transfer was done subcutaneously with 0.3 ml of normal or anti-*Histoplasma* serum, containing high antibody titers detected by ELISA. [stippled] Anti-*Histoplasma* serum; [cross-hatched] Normal serum; [white] Control of infection with no transfer.

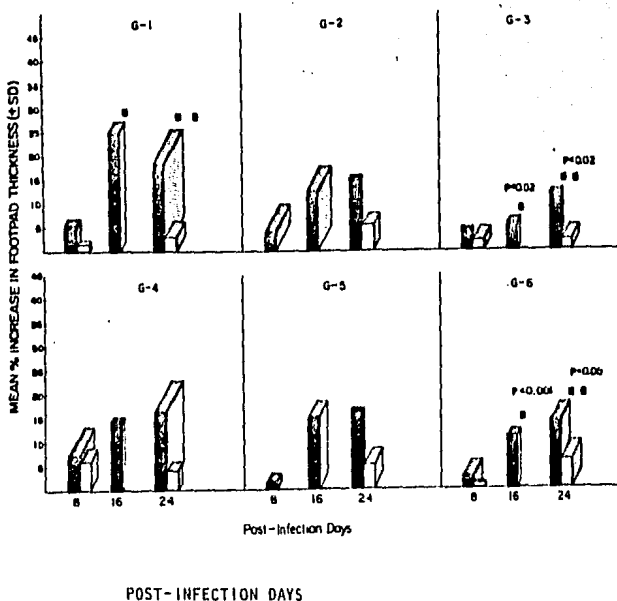



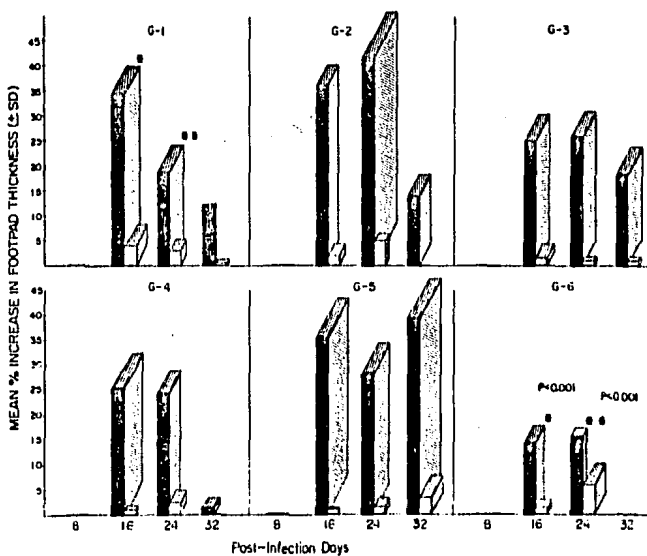


FIGURE 4. DELAYED TYPE HYPERSENSITIVITY IN MICE TRANSFERRED WITH IMMUNE SERA 3 HRS PRIOR TO INFECTION. Adult BALB/c mice intraperitoneally infected with *H. capsulatum* (1.99×10^6 yeast cells/ml) received different sera before infection. DTH response was performed by footpad swelling test and the values were corrected by the value obtained with saline solution controls. Histoplasmin at 30 μ g protein/0.05 ml was used as antigen challenge. Transferred groups formed were: G-1 control without transfer, G-2 anti-Histoplasma serum; G-3 Normal serum; G-4 Ammonium sulfate precipitated anti-Histoplasma serum; G-5 Ammonium sulfate precipitated anti-Mycobacterium serum; G-6 Purified anti-Histoplasma IgG.  The perspective projection represents the standard deviation;  infected mice;  non infected mice.



POST-INFECTIONS DAYS

FIGURE 5. DELAYED TYPE HYPERSENSITIVITY IN MICE TRANSFERRED WITH IMMUNE SERA 10 DAYS AFTER INFECTION. Adult BALB/c mice intraperitoneally infected with *H. capsulatum* (1.99×10^8 yeast cells/ml) received different sera after infection. DTH response was performed by footpad swelling test and the values were corrected by the value obtained with saline solution controls. Histoplasmin at $30 \mu\text{g}$ protein/0.05 ml was used as antigen challenge. Transfer groups were the same as figure 4.
 ■ Infected mice; □ non infected mice.

TABLE 1. Histoplasma capsulatum ISOLATED FROM SPLEEN OF INFECTED AND SERUM TRANSFERRED BALB/c MICE.

SERUM TRANSFER	TRANSFER TIME					
	3 HRS PRIOR INFECTION			10 DAYS AFTER INFECTION		
	post infection days			post infection days		
	8	16	24	16	24	32
Non transfer control	- -	++	++	++	- -	++
Anti- <u>Histoplasma</u> serum	- -	++	++	++	++	++
Normal serum	- -	++	++	++	- +	++
Anti- <u>Histoplasma</u> ammonium sulfate precipitated serum	- -	++	++	++	++	++
Anti- <u>Mycobacterium</u> ammonium sulfate precipitated serum	- -	++	- -	++	++	++
Anti- <u>Histoplasma</u> IgG	- -	++	++	++	++	++
Non infected control	- -	- -	- -	- -	- -	- -

Spleen cell homogenates in BSS with antibiotics were inoculated in BHI agar supplemented with 50 µg/ml of gentamicin, 0.1% of L-cysteine and 1% of glucose.

INMUNORREGULACION DE INFECCIONES INTRACELULARES: PAPEL DE LOS ANTICUERPOS EN LOS MODELOS TUBERCULOSIS E HISTOPLASMOSIS

DRES. TAYLOR MARIA, LUCIA,* MEDA LOPEZ HERLINDA,* RUBIO MONTEVERDE HORACIO**
VACA GARCIA OLIVIA*, REYES MORTES M. ROCIO*, VILLALBA CALDOCA JAIME**
CRUZ CHAVEZ ANDRES**, CHRISTERNA AGUIRRE JUAN MANUEL**

SUMMARY

Evidencias experimentales y diferentes observaciones clínicas apoyan el papel regulador de los anticuerpos en la respuesta celular de ciertas infecciones intracelulares. En este trabajo se relacionan y discuten los resultados iniciales obtenidos en nuestros estudios con el modelo tuberculosis e histoplasmosis, que permiten contemplar un efecto inmunomodulador de los anticuerpos en las infecciones citadas.

RESUMEN

Experimental evidence and clinical observations support the regulatory role of antibodies in the cellular response of some intracellular infections. This paper tries to relate and discuss the initial results obtained with two models: tuberculosis and histoplasmosis, which point out the possible immunomodulation effect of antibodies in the afore-mentioned infections.

Al ser crítica la respuesta de defensa en la sobrevida y vigilancia de un huésped apto es de esperarse que se encuentre supeditada a diferentes mecanismos de regulación, mismos que determinarán la intensidad, eficacia y duración de la reacción inmunológica, que está bajo el control de diferentes procesos, algunos de ellos inherentes a la propia respuesta inmune y otros que derivan de procesos fisiológicos de índole no inmunológico pero que, sin embargo, ejercen su efecto en la manifestación de la defensa. Entre los mecanismos propios o no de la reacción inmunológica que son capaces de incidir sobre la regulación inmune, se destacan en particular los enlistados en el cuadro 1.

Cada uno de estos mecanismos es objeto de estudio de distintos grupos de investigación. En los últimos años se ha visto un gran avance en el conocimiento de las interacciones celulares, la producción de factores celulares y sus efectos sobre la regulación de la respuesta inmune; sin embargo, persisten espacios vacíos en el entendimiento y secuencia de muchos eventos involucrados en este fenómeno, especialmente la regulación de la respuesta celular que se encuentra en una etapa muy incipiente de estudio y es motivo de preocupación de muchos investigadores, así

como el posible efecto inmunorregulador de los anticuerpos en modelos intracelulares.

Es bien conocida la participación de los anticuerpos como moléculas de defensa frente a agentes capaces de inducir la respuesta inmune, sobre todo en enfermedades extracelulares; sin embargo en padecimientos infecciosos en donde el parásito es intracelular es muy discutido el papel que desempeñan estas proteínas específicas, ya que aparentemente no proporcionan protección y sí pueden producir daño, como es el caso de vasculitis necrosante observada en el fenómeno de Lucio en lepra.¹

Cuadro 1
Mecanismos de regulación de la
respuesta inmune

PROPIOS	NO PROPIOS
Interacciones celulares	Mutadores de la inflamación
Factores reguladores producidos por linfocitos y macrófagos	Modulación por el antígeno
Función reguladora de anticuerpos	Factores que aumentan la predisposición a la infección: sexo, edad, estado nutricional, fatiga, etc.
Factores genéticos reguladores de la respuesta inmune	Otros

* Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina UNAM.

** Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)
Programa Universitario de Investigación Clínica (PUIC)

La información acumulada en la literatura científica sugiere que en padecimientos infecciosos de etiología bacteriana o fúngica y en estados patológicos tumorales, los anticuerpos juegan un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmune celular.^{1,2}

La función de los anticuerpos como moléculas reguladoras no es novedosa, principalmente si su espectro de acción es sobre células *T*, por lo que desde 1960 se conocía el fenómeno de inhibición de formación de anticuerpos por un mecanismo de retroalimentación.^{3,5}

Trabajos realizados por diferentes investigadores, muestran la influencia de algunos factores séricos sobre manifestaciones *in vivo* de la respuesta inmune mediada por células (cuadro II). De éstos es importante resaltar la presencia de los anticuerpos no comprometidos directamente con la protección del huésped, sino posiblemente con una acción reguladora.⁶

Evidencias *in vivo* muestran la presencia de anticuerpos como inhibidores de la respuesta celular en pruebas de transformación blastoide en modelos de tuberculosis, sífilis, histoplasmosis y lepra⁷ (cuadro III).

La demostración de que los anticuerpos actúan modificando la respuesta celular *in vitro* también ha sido señalada en la literatura, en particular por la acción de anticuerpos anti-idiotipo promoviendo la supresión de la reacción cutánea al hapteno *p*-azofenilacetato,⁸ así como al hapteno fosforilcolina.¹² Por otro lado, se informa la supresión de la respuesta cutánea al acarreador gamaglobulina bovina por acción de anticuerpo anti-hapteno del tipo IgG₁.¹³ Sin embargo, la información sobre la acción de los

anticuerpos inhibiendo *in vivo* la respuesta celular generada por microorganismos ha sido más escasa.

Anticuerpos anti-*Nocardia* transferidos a ratones con micetoma inducen un abatimiento de la intradermorreacción (IDR) a antígenos de *Nocardia*.¹⁴ Descubrimientos recientes demuestran que ratones inmunizados con BCG, producen anticuerpos con actividad de anti-idiotipo que son capaces de inhibir la respuesta celular al PPD en pruebas de reacción cutánea.¹

La relación entre título de anticuerpos (respuesta humoral) y reactividad celular (respuesta celular) permite establecer un rango en la manifestación de ambas respuestas inmunes que funciona como auxiliar pronóstico en varios modelos de infecciones micóticas, nocardiosis, lepra, tuberculosis y otras. Esta relación dada por altos títulos de anticuerpo y baja respuesta celular como indicador de pronóstico malo; bajos títulos de anticuerpo y respuesta celular alta indicador de pronóstico bueno, constituye un argumento más a favor de la interacción entre ambas respuestas inmunes y el posible papel modulador de los anticuerpos en estas infecciones.

Con base en estudios histopatológicos, radiológicos y pruebas de intradermorreacción, así como experimentos *in vitro*, de transformación blastoide, inhibición de la migración de leucocitos y determinación de títulos de anticuerpos, se ha logrado establecer un espectro clínico inmunológico relacionando las diferentes fases de la enfermedad con la intensidad de la respuesta celular o humoral, como lo hicieron Ridley y Jopling para lepra¹⁵ y Lanzini para tuberculosis.¹⁶ Un espectro similar no ha sido establecido en la histoplasmosis, sin embargo, algunos autores consideran que presenta fases semejantes a las enfermedades mencionadas. La figura 1 muestra en un esquema modificado cómo están relacionadas las respuestas celular y humoral a lo largo de procesos infecciosos intracelulares, particularmente en fases de mayor o menor reactividad celular.¹⁷

Cuadro II
Factores séricos capaces de suprimir pruebas de inmunidad celular *in vitro*

<p>π - Globulinas β - Lipoproteínas Protéina C reactiva Inhibidor quimiotaxis α - Fetoproteína Complejo inmune circulante Anticuerpos citotóxicos Anticuerpos (otras acciones)</p>

Cuadro III
Inhibición por anticuerpos de pruebas celulares *in vitro*

Enfermedad	Prueba celular
Histoplasmosis	Transformación con histoplasmina
Lepra	Transformación con FHA
Sífilis	Transformación con FHA
Tuberculosis	Transformación con Ag

FHA = Fatohemaglutinina
 Ag = Antígeno

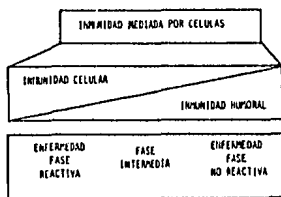


Figura 1. Relación de las fases de reactividad celular en las enfermedades intracelulares con la respuesta inmune.

(Modificado de Stites, D. P. et al. *Inmunología Básica y Clínica*, 4a. edición. Editorial El Manual Moderno. México, D.F., pág. 636). 1983.

Interesados en estudiar el fenómeno de regulación de la respuesta celular mediada por anticuerpos en infecciones intracelulares, planteamos diferentes proyectos en modelos de infección donde predomina el mecanismo de defensa celular, como son tuberculosis e histoplasmosis. Estos proyectos de investigación se desarrollaron en el Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina en colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) (Proyecto Tuberculosis).

Los trabajos desarrollados en tuberculosis se llevaron a cabo con la siguiente estrategia: células linfoides de pacientes reactivos, que como es sabido presentan alta respuesta celular y bajos títulos de anticuerpos, se incubaron 12 horas con suero inmune de pacientes no reactivos (anérgicos) conteniendo altos títulos de anticuerpos. Previo a la estimulación con el antígeno PPD, las células fueron lavadas para eliminación del exceso de suero. Este tratamiento permitió la inhibición de la respuesta celular

medida por la transformación blástica de las células frente a la dosis óptima de estimulación con el antígeno (50 y 100 μg del Ag/ 1×10^6 células) produciendo así una anergia celular *in vitro*. Esta inhibición de la respuesta celular por la acción del suero fue detectada en tuberculosis (figura 2).

Por otro lado, las células de pacientes reactivos (baja respuesta celular y alta concentración de anticuerpos) se incubaron 6 horas con altas concentraciones de antígeno PPD. Después de eliminar con lavadas subsecuentes el exceso de antígeno, se retó nuevamente a las células con el PPD a dosis de estimulación previamente estandarizadas, observándose que dicho tratamiento restableció en las células la capacidad para responder al antígeno (figura 3).

Los resultados de estos experimentos sugieren que los componentes específicos (anticuerpos) presentes en los sueros inmunes utilizados, participan de algún modo en el bloqueo de las células de pacientes reactivos (figura 2) y posiblemente sean los elementos involucrados en la anergia

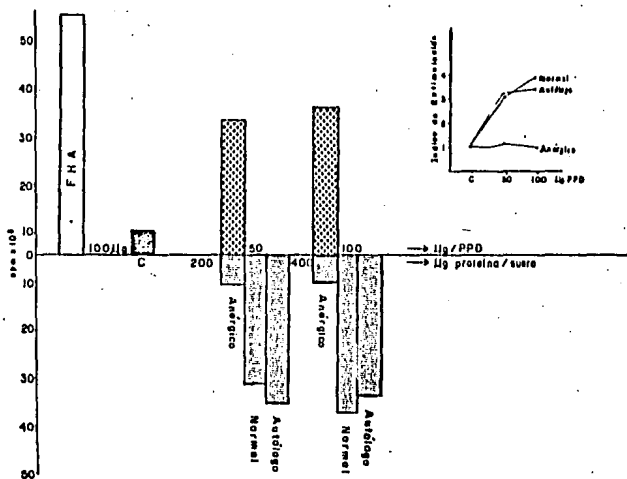


Figura 2. Efecto del suero inmune de paciente anérgico tuberculoso en la transformación blastoide de células de enfermos tuberculosos reactivos.

Las células se preincubaron con sueros autólogo, normal y de paciente tuberculoso anérgico durante 12 horas a 37°C en atmósfera de CO₂. Posteriormente fueron lavadas y estimuladas con el antígeno PPD previa estandarización de la dosis óptima de estimulación para inhibir la

transformación blástica (50 μg y 100 μg /ml de proteína del antígeno). Al mismo tiempo se procesaron células estimuladas con el Ag y sin tratamiento con suero, además de controles sin Ag y controles con mitógeno (FIA). La prueba se midió por incorporación de timidina tritiada (cpm x 10³). Los resultados representados en una muestra de 12 pacientes.

FIA = Fitohemaglutinina
Ag = Antígeno
C = Control de células.

gia de pacientes no reactivos, ya que se logra el "desbloqueo" de células *in vitro* por tratamiento con el componente al que los anticuerpos tienen alta afinidad, o sea el antígeno (figura 3).

Experimentos actuales están encaminados a la demostración del tipo de interacción entre las células involucradas y los anticuerpos, en infecciones intracelulares.

En el modelo histoplasmoso, Taylor y col. obtuvieron resultados que sugieren que los anticuerpos juegan un posible papel modulador en la expresión de hipersensibilidad de tipo tardío en ratones sensibilizados con histoplasma. El aumento en la hipersensibilidad de tipo tardío fue precedido por una inhibición en el título de anticuerpos.¹⁴ Recientemente resultados similares se observaron en el proceso infeccioso experimental. Ratones de la cepa sintética BALB/c (muchos adultos) fueron infectados con una dosis subletal de histoplasma.

La detección tanto de la respuesta inmune celular como humoral, demostró una correlación entre ambas durante el curso de la infección. La figura 4 ilustra una distribución cíclica de estas respuestas en ratones adultos, con la característica de un desfaseamiento entre ellas. Se observa que la disminución en la respuesta celular, aparentemente

precede al aumento en títulos de anticuerpos o viceversa. Similares resultados fueron obtenidos en ratones jóvenes. Posteriormente, por transferencia pasiva de anticuerpos, se observó abatimiento en la sobrevivencia de ratones adultos al ser transferidos con anticuerpos anti-histoplasma,¹⁵ lo que sugiere que la respuesta mediada por células fue deprimida por la presencia de los anticuerpos específicos. Aunque la manera en que actúan los anticuerpos en la histoplasmosis no es bien conocida, es posible que la concentración de ellos pueda jugar un papel importante en la acción y expresión de la respuesta celular, dependiendo de su interacción con el antígeno (cuadro IV). La situación óptima estaría representada por un nivel ideal de títulos de anticuerpos, los cuales no afectan el reconocimiento del antígeno por los linfocitos T y consecuentemente se manifiesta una inmunidad celular adecuada y eficiente (cuadro IV).

Otro enfoque en este estudio sería determinar el tipo de anticuerpo comprometido en este mecanismo y también caracterizar un posible efecto anti-idiotipo manifestado por los anticuerpos producidos durante el proceso infeccioso. En el presente algunos de nuestros proyectos de investigación están encaminados al estudio de estos planteamientos.

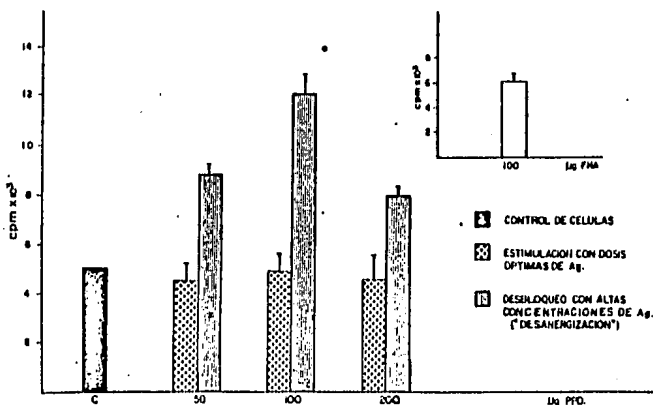


Figura 3. Efecto del tratamiento con altas dosis de antígeno de células de pacientes tuberculosos anérgicos.

Las células de pacientes anérgicos fueron tratadas con altas dosis de antígeno (200 ug y 300 ug de proteína de PPD) en una preincubación inicial durante 6 horas a 37°C en cámara de CO₂. Después del lavado de las células

se procedió a la estimulación final con el antígeno en dosis óptima, previa estandarización en pacientes reactivos. Simultáneamente se estimularon células con 50 y 100 ug de proteína de antígeno en el tratamiento con dosis elevadas del mismo, así como células en ausencia de antígeno (c); los resultados representan una muestra de 6 pacientes.

Cuadro IV
Posible acción reguladora dependiente de la concentración de anticuerpos y su interacción con el hongo (Histoplasma)

Titulos de anticuerpos	Acción	Resultado
Altos	Enmascaran determinantes antígenos del hongo haciéndolos inaccesibles a la respuesta de linfocitos	Hipo reactividad celular
Bajos	No afectan al reconocimiento del antígeno por los linfocitos	Inmunidad celular regulada adecuadamente
Escasos o no	No existe ninguna inhibición por parte del anticuerpo	Hiper reactividad celular

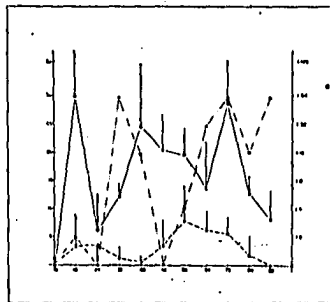


Figura 4. Correlación entre la respuesta inmuno celular y humoral durante el proceso infeccioso con Histoplasma.

La respuesta celular fue determinada por la prueba de hinchazón del cojinete plantar del animal y la respuesta humoral por títulos hemaglutinantes. Se utilizaron ratones machos adultos de la cepa simpática BALB/c O—O por ciento del incremento del cojinete plantar en ratones infectados menos al valor obtenido de los ratones normales, usando como antígeno de desafío histoplasmina (30 µg/0.05 ml de proteína); O—O por ciento del incremento del grosor del cojinete plantar en ratones infectados y desafiados con solución salina menos el valor obtenido en ratones normales; O—O títulos obtenidos por hemaglutinación realizada por el método de glutaraldehído. La concentración de proteínas para el antígeno histoplasmina fue de 1 mg/ml.

(Taylor, M.L. y col. Manuscrito en preparación).

BIBLIOGRAFIA

1. Estrada-Parra S.; Rojas-Espinosa, O.; Quesada-Pascual, F.; Ortiz V. Castro, M.E.; Pacheco, J.; Jimenez, L.: Lepros de Lucio (V). Perfil inmunológico. *Dermatología Rev. Mex.* 22: 175, 1974.
2. Nelson, J.S.: Mouse serum factor depressing lymphocyte transformation. *Experientia* 28: 1277, 1972.
3. Colizzi, V.; Guantino, M.; Garzelli, C.; Campa, N.; Falcone, S.: Auto-anti-idiotypic antibodies inhibit T-cell-mediated hypersensitivity in BCG-infected mice. *Cell Immunol* 30: 205, 1983.
4. Newberry, W.M., Jr.; Chandler, J.W.; Chin, T.D.Y.; Kirkpatrick, C.H.: Immunology of the mycoses I. Depressed lymphocyte transformation in chronic histoplasmosis. *J. Immunol.* 100: 436, 1968.
5. Taylor, M.L.; Ubar, S.; Gonzalez, P.A.; Sosa, A.C.; Turicella, G.: Relationship between *in vivo* pathogenesis and immune regulation mechanisms in histoplasmosis: a hypothesis approach. *Rev. Inf. Dis.* 6: 775-1984.
6. French, M.E.; Hatcher, J.R.: Immunological enhancement of rat kidney grafts. *Lancet* 2: 1103, 1969.
7. Sjogren, H.O.; Hellstrom, I.; Hansson, S.C.; Hellstrom, K.E.: Suggestive evidence that the "blinking antibodies" of tumor-bearing individuals may be antigen-antibody complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68: 1372, 1971.
8. Uhr, J.W.; Baumann, N.: Antibody formation I. The suppression of antibody formation by passively administered antibody. *J. Exp. Med.* 113: 935, 1961.
9. Klotter, G.; Weydel, H.: Antibody synthesis at the cellular level. Antibody-induced suppression of 19S and 7S antibody response. *J. Exp. Med.* 121: 969, 1965.
10. Dick, G.: Immunological aspects of infectious diseases. M.T. Press Limited-International Medical Pr., England, p. 41, 1979.
11. Sy, M.S.; Bach, H.A.; Dohi, Y.; Nisumori, A.; Benacerraf, B.; Greene, M.L.: Antigen and receptor driven regulatory mechanisms. *J. Exp. Med.* 150: 1216, 1979.
12. Yamamoto, H.; Kato, D.H.: Effective suppression of hapten-specific delayed type hypersensitivity (DTH) response in mice by anti-idiotypic antibodies. In F.H. Bach, B. Bonavida, E. Vitetta and C.F. Fox (Ed.), T and B lymphocytes: Recognition and Function. (ICN, UCLA, Symposium on Molecular and Cellular Biology, Vol. XVI Academic Press, New York, p. 305, 1979).
13. Neves, P.J.; Mincus, V.V.; Falad, A.; Dhorudai, A.G.: Modulation of immune response by passive antibodies. IV effects of IgG₁ and IgG₂ antihapten antibodies. *Immunol* 35: 129, 1978.
14. Rico, G.; Ochoa, R.; Olivo, A.; Ortiz-Ortiz, L.: Role of antibody in *Nocardia brasiliensis* infection in mice. In Schall/Publisher (Eds). Actinomycetes. Zbl. Bakt. Suppl. H. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, p. 229, 1981.
15. Ridley, D.S.: Jopling, W.H.: Classification of Leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Leprosy* 34: 255, 1966.
16. Lenzi, L.; Rottoli, P.; Rottoli, L.: The spectrum of human tuberculins. *Chin. Exp. Immunol.* 27: 230, 1977.
17. Sittes, P.D.; Siebo, D.F.; Fudenberg, H.H.; Wells, V.J.: Inmunología Básica y Clínica. Editorial El Manual Moderno, 4a. ed. México, D.F., p. 635, 1983.
18. Taylor, M.L.; Esalva-Campos, C.; García González, W.; Hernández, R.A.: Relation between cellular and humoral immune response in mice immunized with *Histoplasma capsulatum*. In: International Congress Series No. 480. Human and Animal Mycology. Proceedings V Congress of ISHAM, Israel. Kunitz and Baun (Eds) Elsevier, Med. Amsterdam, p. 97, 1979.
19. Taylor, M.L.; Hernández, R.A.; Elizondo, N.; Casavola, J.; Reyes Montes, M.R.: Interferencia del suero inmune específico con la respuesta celular en la histoplasmosis murina: Resumen del V Congreso Nacional de Inmunología, México D.F., p. R. 1903.