



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

**CAMBIOS DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA CELULAR  
POR LA TRANSFERENCIA DE ANTICUERPOS  
ANTI-*Histoplasma* Y ANTI-*Mycobacterium* EN RATONES  
INFECTADOS CON *Histoplasma capsulatum***

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**B I O L O G O**

**P r e s e n t a :**

**Nora Elvia Elizondo Sepúlveda**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# INDICE

	pág.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
HIPOTESIS.....	5
OBJETIVO.....	5
MATERIALES Y METODOS.....	7
Microorganismos.....	7
Animales.....	7
Medios, reactivos y soluciones.....	7
Antígenos para pruebas inmunes.....	8
Medios de cultivo.....	8
Amortiguadores.....	10
Determinaciones químicas.....	11
Obtención del inóculo.....	11
Determinación del número de microorganismos por el método de turbidimetría.....	12
Infección con <i>Histoplasma</i> .....	14
Obtención del suero anti- <i>Mycobacterium</i> .....	14
Purificación del suero anti- <i>Histoplasma</i> y anti- <i>Mycobacterium</i> .....	14
Intradermorreacción.....	14
Determinación de anticuerpos.....	15
Correlación entre la respuesta inmune celular y la respuesta inmune humoral durante la infección histoplasmosa.....	16
Transferencia pasiva de suero contra el por ciento de sobrevida y la respuesta celular a la infección histoplasmosa.....	16
Cultivo de órganos.....	17
RESULTADOS.....	18
Determinación de anticuerpos.....	18
Correlación entre la respuesta inmune celular y humoral durante la infección histoplasmosa.....	18
Efecto de la transferencia pasiva del suero en la infección histoplasmosa.....	19
1. En la sobrevida de los animales infectados.....	19
2. En la manifestación de respuesta celular.....	19
Cultivos de hongos.....	20
DISCUSION.....	21
CONCLUSIONES.....	25
BIBLIOGRAFIA.....	26

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	pág.
FIGURA 1. RELACION GRAFICA ENTRE TRANSMITANCIA Y EL NUMERO DE CELULAS LEVADURIFORMES.	31
FIGURA 2. CORRELACION ENTRE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL EN RATONES JOVENES DURANTE LA INFECCION CON <i>Histoplasma</i> .	32
FIGURA 3. CORRELACION ENTRE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL EN RATONES ADULTOS DURANTE LA INFECCION CON <i>Histoplasma</i> .	33
FIGURA 4. PORCIENTO DE SOBREVIDA DE RATONES ADULTOS MACHOS BALB/c INFECTADOS CON <i>Histoplasma capsulatum</i> Y TRANSFERIDOS PASIVAMENTE CON SUERO ANTI- <i>Histoplasma</i> .	34
FIGURA 5. INTRADERMORREACCION EN RATONES TRANSFERIDOS CON SUERO INMUNE 3 HORAS ANTES DE LA INFECCION.	35
FIGURA 6. INTRADERMORREACCION EN RATONES TRANSFERIDOS CON SUERO INMUNE 10 DIAS DESPUES DE LA INFECCION.	36
TABLA 1. ESTANDARIZACION DE LA SUSPENSION BACTERIANA POR NEFELOMETRIA.	37
TABLA 2. AISLAMIENTO DE <i>Histoplasma capsulatum</i> DEL BAZO DE RATONES INFECTADOS Y TRANSFERIDOS CON SUERO.	38

## RESUMEN

Se siguió el curso de la respuesta inmune humoral y celular durante la infección histoplasmosa en un modelo experimental en ratones BALB/c. Se estudió la influencia del suero inmune total y parcialmente purificado sobre la respuesta celular desarrollada durante la infección producida por *Histoplasma capsulatum*. Los resultados demostraron: a) Que existe una distribución cíclica de la respuesta inmune humoral y celular en los ratones infectados; b) Que la transferencia pasiva de anticuerpos anti-*Histoplasma* 3 horas antes de la infección abate la sobrevida de los ratones infectados con dosis subletal; c) Que la transferencia de suero inmune total o parcialmente purificado modifica la respuesta inmune de los animales, dependiendo del tiempo de transferencia con respecto al momento de la infección, y d) Que la transferencia de sueros no afecta aparentemente la manifestación de la intradermoreacción (IDR) tanto en los animales transferidos 3 horas antes de la infección como en los transferidos 10 días después de la infección, a pesar de que los porcentajes de la IDR de los ratones transferidos 3 horas antes de la infección fueron más bajos. Los resultados obtenidos en este modelo experimental sugieren que los anticuerpos pueden jugar un papel modulador sobre la respuesta mediada por células en la infección histoplasmosa.

## INTRODUCCION

La histoplasmosis es una enfermedad que cursa generalmente en forma benigna, sin embargo en sujetos susceptibles da origen a formas clínicas más severas, produciendo con frecuencia la muerte. El agente causal de esta enfermedad, *Histoplasma capsulatum*, es un hongo dimórfico, que a temperatura ambiente y en medios de cultivo artificiales presenta una fase de crecimiento micelial, la cual produce esporas que al ser inhaladas inducen infección en el hombre o en animales. La fase levaduriforme del hongo se obtiene a 37°C en medios enriquecidos con cisteína y en los tejidos del huésped, encontrándose con frecuencia en el citoplasma de las células mononucleares y a veces en los polimorfonucleares (1).

Según González Ochoa (2) la enfermedad presenta tres fases: la fase primaria sintomática que puede ser leve, moderada o grave; la residual de la fase primaria y la reinfección endógena que puede ser aguda o crónica, siendo la aguda frecuentemente fatal.

Este padecimiento micótico cobra particular importancia en el centro de Estados Unidos, Centro y Sudamérica (1, 3, 4). En México la infección por *H. capsulatum* está distribuida en toda la República a excepción del estado de Tlaxcala (5). La histoplasmosis predomina en determinadas zonas geográficas donde existen minas y grutas abandonadas que aunado a otros factores de humedad, detritus y excretas de murciélago conforman el nicho ecológico ideal para el desarrollo del hongo. En tales zonas endémicas los habitantes pueden contraer la micosis, sin embargo la mayoría de las personas infectadas no presentan síntomas y únicamente en una

pequeña minoría de la población, la infección progresa hacia una enfermedad.

Observaciones clínicas muestran que individuos normales expuestos al hongo bajo idénticas condiciones cursan un estado histoplasmoso diferente, sin considerar dosis y virulencia de la cepa; lo que sugiere que existen factores predisponentes para la infección, tales como los genéticos, nutricionales, estados de stress, hormonales, diferencias de sexo y edad, etc. (6).

Una vez establecida la enfermedad, produce lesiones granulomatosas en diversos órganos. El sistema fagocítico mononuclear es afectado presentándose linfadenopatía, esplenomegalia y hepatomegalia. Además también produce fiebre elevada, anemia y algunas veces puede desarrollar ulceraciones en la nariz, boca, lengua e intestino. Las células fagocitarias de la sangre y los macrófagos fijos del hígado, bazo y médula ósea contienen las levaduras del hongo.

La histoplasmosis así como otros tipos de infecciones intracelulares, induce en el huésped una respuesta inmune celular protectora. Esta respuesta está mediada por la participación de diferentes subpoblaciones de linfocitos T (T cooperadores, T supresores, T citotóxicos, etc.) y está caracterizada por la actividad biológica dirigida por las linfocinas (mediadoras de la respuesta celular) que tienen acción directa sobre varias células y en particular sobre macrófagos. Sin embargo, la óptima eficiencia de la respuesta celular como elemento de defensa, se encuentra relacionada con las demás funciones y componentes de la respuesta inmune.

Cuando la infección cursa en forma leve, el huésped tiene la capacidad de resolver la infección y por lo tanto de eliminar el hongo (1, 3). Sin embargo, la infección histoplasmosa esta asociada con estados de supresión provocados por el hongo en huéspedes susceptibles (7). Artz y Bullock (7, 8) demostraron un estado supresivo producido por la infección, utilizando un modelo en ratones. Observaron que en la fase aguda de la enfermedad se desarrollaba una marcada supresión de la inmunidad celular, de la actividad citotóxica de células de bazo, así como de la respuesta primaria de anticuerpos para el antígeno específico y para antígenos no relacionados. Este estado supresivo se observó únicamente en los animales que fueron inoculados con hongo vivo y no se manifiesta al utilizar el hongo muerto.

Mientras que no existen dudas sobre el papel decisivo de la respuesta celular en la defensa hacia la histoplasmosis (9-13), el de los anticuerpos constituye un interrogante.

La participación de los anticuerpos en la defensa contra el hongo es poco aceptada, su manejo como herramienta de diagnóstico y pronóstico es de utilidad, pero quizás esté reservado a ellos alguna otra función más definida, dentro del complejo que constituye las relaciones entre el huésped y el parásito hongo durante el proceso infeccioso.

En este sentido estudios de Taylor y colaboradores (14), muestran que existe una relación inversa en la expresión de la respuesta celular y la respuesta humoral en ratones sensibilizados con *H. capsulatum*. En el estudio epidemiológico realizado en pacientes con histoplasmosis a lo largo de un año de duración, Amil Estrada y colaboradores (15) determinaron una relación fluctuante entre la producción de anticuerpos y la mani



festación de respuesta celular. En otros modelos infecciosos como nocardiosis (16), blastomycosis y paracoccidioidomicosis (1, 3) se ha establecido también una correlación entre nivel de respuesta humoral y celular en las diferentes formas de manifestaciones del curso de la infección. Estos antecedentes nos sugieren que ambas respuestas están interactuando entre sí.

#### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que los anticuerpos específicos contra *H. capsulatum* son producidos a lo largo de la enfermedad; considerando que ellos deben jugar un papel en la respuesta montada hacia la infección histoplasmosa y que además este papel no es el de protector como ya se señaló anteriormente, planteamos que los anticuerpos anti-*Histoplasma* actúan a través de una interacción moduladora de la respuesta celular.

Para comprobar lo anterior se realizó la presente investigación en base a los antecedentes previamente considerados (14-16).

#### HIPOTESIS

Los anticuerpos anti-*Histoplasma* interfieren en la respuesta celular de ratones infectados con *Histoplasma capsulatum*.

**OBJETIVO**

1. Determinar el efecto de los anticuerpos anti-*Histoplasma* en la defensa montada por la respuesta celular hacia la infección histoplasmosa, midiendo la eficiencia de defensa a través de la sobrevivencia de los animales y la expresión de la respuesta celular por un parámetro medible *in vivo*, o la intradermorreacción.

## MATERIAL Y METODO

### Microorganismos.

Se trabajó con *Histoplasma capsulatum* cepa 5037 procedente del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET) México, obtenidas por cortesía del Dr. Oscar Velasco Castrejón. El hongo fue aislado de un caso humano y conservado en el laboratorio por cultivos periódicos en Agar Micobiotico (Bioxón, México).

*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv procedente del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) México, fue utilizado como control y mantenido en medios de Löwenstein-Jensen y PBY (Proskawer, Beck, Youmans) para obtener la biomasa.

### Animales.

Se utilizaron ratones machos de la cepa singénica BALB/c, de dos diferentes edades, un mes y 4.5 meses. Los animales fueron mantenidos por cruzamiento cerrado bajo control estricto de singenicidad y alimentados con purina (Purina de México, S.A. de C.V.) y agua acidulada pH 3.5, *ad libitum*. La singenicidad de los animales fue comprobada por transplantes de piel y cultivo mixto de linfocitos (17).

### Medios, reactivos y soluciones.

Todos los reactivos empleados, salvo los que se especifican, provi-

nieron de Merck de México, S.A.

Antígenos para pruebas inmunes.

Se utilizó histoplasmina obtenida en el Laboratorio de Micología Básica del Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M., México, gentilmente cedida por la Dra. Conchita Toriello. El PPD (derivado protéico purificado) procedió de la Gerencia General de Biológicas y Reactivos de la S.S.A.

Medios de cultivo:

1. Agar Micobiótico (Bioxón) para conservación del hongo.

Agar Micobiótico.....	36.0 g
Agua destilada cbp .....	1000 ml
pH 6.9	

2. Medio Sintético (18) para obtener inóculos uniformes del hongo en fase levaduriforme.

Fosfato de potasio dibásico anhidro .....	2.5 g
Cloruro de amonio .....	0.5 g
Sulfato de amonio .....	0.5 g
Glucosa .....	5.0 g
Sulfato de magnesio 7 H <sub>2</sub> O .....	0.1 g
Cloruro de fierro .....	0.001 g
Clorhidrato de L-cisteína.....	0.1 g
L-glutamina .....	0.1 g
Agua destilada cbp .....	1000 ml
Adicionar 50 µg/ml de gentamicina	
Ajustar pH 7.2	

3. Agar BHI (Agar Infusión Cerebro Corazón) (Bioxón) suplementado con, glucosa, L-cisteína y antibióticos.

Agar BHI .....	52.0 g
Glucosa .....	1.0 g
Clorhidrato de L-cisteína .....	10.0 g
Agua destilada cbp .....	1000 ml

4. PBY (Proskawer, Beck, Youmans).

L-asparagina .....	5.0 g
Fosfato monopotásico .....	5.0 g
Sulfato de potasio .....	0.5 g
Glicerol .....	20.0 ml
Citrato de magnesio .....	1.5 g

Se disuelve cada componente separadamente y se mezclan en el orden dado, cuidando de que cada sustancia quede bien disuelta antes de agregar la siguiente. Se ajusta a pH de 7.0 con hidróxido de sodio al 40% y finalmente se agrega citrato de magnesio. Se afora con agua destilada cbp 1000 ml. Se esteriliza por filtración en membranas Millipore de 0.45  $\mu$ m y de 0.22  $\mu$ m.

5. Löwenstein-Jensen.

Löwenstein-Jensen .....	37.3 g
Glicerina .....	12.0 ml
Huevos .....	15 pzas.
Agua destilada cbp .....	1000 ml

Se lavan los huevos con agua y jabón, tallando con gasa.

Se enjuagan y se pasan a un recipiente con alcohol al 70% por 15 minutos. El medio se prepara mezclando el Löwnstein-Jensen y la glicerina en 600 ml de agua destilada, calentando hasta ebullición. Se esteriliza por filtración. Se rompen de 15 a 20 huevos en un vaso de precipitado estéril y se agitan en un matraz conteniendo 400 ml de agua destilada y trozos de vidrio estéril, moviendo hasta completa homogeneización, procurando no hacer espuma. Se vierte el homogeneizado a un matraz donde previamente se colocó el medio, en frío, completando el volumen para 1000 ml. Se homogeneiza nuevamente y se pasa por gasa estéril. Se llenan los tubos y se llevan éstos a un coagulador por 45 minutos a 85°C por 2 veces, con una diferencia de 24 horas. Todo el procedimiento se hace en las más estrictas condiciones de esterilidad.

Amortiguadores:

SBS (Solución Balanceada de Sales)

Solución I

Dextrosa .....	10.0 g
Fosfato potásico monobásico anhidro .....	0.66 g
Fosfato de sodio dibásico anhidro .....	0.925 g
Rojo de fenol al 0.5% en agua destilada ...	2.0 ml
Aforar con agua destilada cbp .....	1000 ml

Solución II

Cloruro de calcio anhidro .....	1.4 g
Cloruro de potasio .....	4.0 g

Cloruro de sodio .....	80.0 g
Cloruro de magnesio anhidro .....	1.04 g
Sulfato de magnesio $7H_2O$ .....	2.0 g
Aforar con agua destilada .....	1000 ml

#### Mezcla (SBS)

Solución I .....	100 ml
Solución II .....	100 ml
Aforar con agua destilada.....	1000 ml

pH 7.0

#### PBS (Amortiguador de Fosfatos)

Cloruro de sodio .....	8.0 g
Cloruro de potasio .....	0.2 g
Fosfato de sodio dibásico .....	0.95 g
Fosfato ácido de potasio.....	0.2 g
Aforar con agua destilada.....	1000 ml

pH 7.2

#### Determinaciones químicas.

La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry (19).

#### Obtención del inóculo:

1. *Histoplasma capsulatum*. La conversión del hongo de la fase micelial a levaduriforme se llevó a cabo por cultivos semanales en medio Agar BHI adicionado con glucosa y L-cisteína hidrociorada con subsecuente incubación a 37°C, hasta obtener las levaduras. Una vez obtenida esta fase, el hongo fue cosechado y disgregado

en forma estéril en un mortero, para separar la masa celular. Después de este procedimiento, se sembró en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio sintético (18). A fin de individualizar mejor las levaduras se incubaron los matraces en baño María con agitación a 150 rpm durante 48 horas a 37°C. Al cabo de ese tiempo, el cultivo se cosechó y se lavó dos veces con solución salina (SS) estéril al 0.85% para proceder a su cuantificación.

2. *Mycobacterium tuberculosis*. De la superficie del medio sólido (Löwenstein-Jensen) se tomaron muestras con hisopo estéril, pasándolas a un matraz con el medio líquido (PBY). Se descargó el contenido del hisopo en las paredes del matraz, cerca de la superficie del medio, con movimientos ligeros hasta que se distribuyó en la superficie del medio. Se llevó a incubación a 37°C y se observó el crecimiento, de 8 a 16 días. Después de los 20 días de incubación se obtuvo el paquete de bacterias que fue transferido a un tubo con perlas de vidrio y se disgregó en un vortex. Se lavaron las células bacterianas con SS estéril y se procedió a su cuantificación.

Determinación del número de microorganismos por el método de turbidimetría.

*Histoplasma capsulatum*. Al paquete de levaduras del hongo obtenido del medio sintético se adicionaron 10 ml de SS y a partir de esta mezcla se hicieron ocho diluciones al doble. Cada dilución se determinó por turbidimetría en fotocolorímetro Klett-Summerson (Klett-Manufacturing Co., Inc. New York) utilizando un filtro de 400 a 450 nm. A la par se



cuantificó el número de microorganismos por conteo directo en un hematocitómetro. Finalmente las diluciones fueron sembradas en medio Agar BHI para determinar la cuenta viable. Se graficó el número de células de cada dilución determinada en el hematocitómetro contra el porcentaje de transmisión de las mismas diluciones, obteniendo una curva modelo (Fig. 1).

La cuenta de las células en el hematocitómetro se llevó a cabo en la región W de modo idéntico a la cuenta de células blancas. Las células fueron teñidas con azul de algodón y los agregados de 5 células se tomaron arbitrariamente como una sola célula (20).

$N^2$  de células en  $1 \text{ mm}^3 = N^2$  de células en  $0.4 \text{ mm}^3$  x factor de corrección (Fc).

Fc = dilución de Fc x volumen de Fc

Dilución de Fc = 20

$$\text{Volumen de Fc} = \frac{\text{volumen deseado}}{\text{volumen usado}} = \frac{1 \text{ mm}^3}{0.4 \text{ mm}^3} = 2.5$$

Luego,  $Fc = 20 \times 2.5 = 50$

Donde, el  $N^2$  de células en  $1 \text{ mm}^3 = N^2$  de células en  $0.4 \text{ mm}^3 \times 50$

Si,  $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ mm}^3 \times 1000$  y  $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}$

Luego,  $N^2$  de células en  $1 \text{ ml} = N^2$  de células en  $1 \text{ mm}^3 \times 1000$

*Mycobacterium tuberculosis*. La cuantificación de estas bacterias se realizó por el método de turbidimetría de McFarland (21). La turbidez de la suspensión es comparada con la turbidez de una serie de 10 tubos conteniendo sulfato de bario, preparados por la mezcla de cantidades variables de cloruro de bario al 1% y ácido sulfúrico al 1%. Cada tubo equivale a una concentración diferente de bacterias (Tabla 1). Se compararon la turbidez de un tubo estándar de McFarland con un tubo conteniendo una suspensión de las bacterias en SS, determinándose la cantidad bacteriana

por turbidimetría en un fotocolorímetro Klett-Summerson utilizando un filtro 400 a 450 nm. A partir de este tubo se realizaron diluciones al doble, graficando la turbidez en UK y relacionando el número de bacterias de cada tubo con la escala de McFarland.

#### Infección con Histoplasma.

Los animales fueron inoculados por vía intraperitoneal. Se utilizó una dosis subletal para ratones de un mes de  $3.16 \times 10^7$  levadura/ml de SBS y para ratones de 4.5 meses de  $1.99 \times 10^8$  levadura/ml de SBS.

#### Obtención del suero anti-Mycobacterium.

El suero anti-Mycobacterium se obtuvo de ratones BALB/c machos de 4.5 meses, infectados por vía retroorbital con una dosis subletal de  $2.43 \times 10^8$  bacterias/0.05 ml de SS.

#### Purificación del suero anti-Histoplasma y anti-Mycobacterium.

Se colectaron las muestras sanguíneas por punción cardíaca 30 días después de la infección. Las inmunoglobulinas se obtuvieron a 4°C por precipitación con sulfato de amonio a 33% de saturación, pH 6.8. Las inmunoglobulinas precipitadas fueron centrifugadas a 2500 X g, resuspendidas en agua destilada y dializadas contra PBS pH 7.2 (22). Las inmunoglobulinas de los ratones controles fueron fraccionadas por el mismo método. La concentración de proteínas fué determinada de acuerdo al método de Lowry (19).

#### Intradermorreacción.

La intradermorreacción se realizó por la prueba de hinchazón del cojine te plantar (23). Se utilizaron ratones machos infectados con el hongo, así co

mo machos normales. Se procedió a la realización de la prueba cada 8 días post-infección. El antígeno de desafío histoplasmina fué inoculado en una dosis de 30 µg de protefina/0.05 ml en el cojinete plantar derecho, siendo el control de SS inoculado en igual volumen en el cojinete plantar izquierdo. La medida del espesor del cojinete plantar se hizo con un microcalibrador antes y después de 24 horas del desafío con el antígeno o con SS (23). El porcentaje del incremento ( $\Delta\%$ ) de la hinchazón del cojinete plantar está dado por la diferencia entre la lectura después de 24 horas del desafío con el antígeno o con SS ( $X_{t_{24}}$ ) y la lectura antes del desafío ( $X_{t_0}$ ).

$$\Delta\% = \frac{X_{t_{24}} - X_{t_0}}{X_{t_0}} \times 100$$

Luego se resta el  $\Delta\%$  de los ratones infectados (RI) del  $\Delta\%$  de los ratones normales (RN) de cada lectura de antígeno o de SS para obtener el valor real corregido de cada lectura.

$$\begin{aligned} \text{Ejem: } \Delta\% \text{ RI}_{(\text{pata derecha})} - \Delta\% \text{ RN}_{(\text{pata derecha})} &= \Delta\% \text{ corregido/pata/} \\ &\text{derecha/animal} \\ \text{e } \Delta\% \text{ RI}_{(\text{pata izquierda})} - \Delta\% \text{ RN}_{(\text{pata izquierda})} &= \Delta\% \text{ corregido/pata} \\ &\text{izquierda/animal} \end{aligned}$$

Lo anterior se lleva a cabo para cada animal, se promedia el valor del  $\Delta\%$  corregido entre todos los animales trabajados por cada punto; de ahí se obtiene la media ( $\bar{X}$ ) y la desviación estándar (DS).

#### Determinación de anticuerpos.

Los títulos de anticuerpos para transferencia pasiva de suero anti-*Histoplasma* y anti-*Mycobacterium* fueron determinados por el método de ELISA (24) utilizando conjugado anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma). Este método ha sido adaptado en nuestro Laboratorio,

con el empleo del antígeno histoplasmina a una concentración de 100 µg de proteína para cada pozo de la placa de ELISA. Como antígeno de *Mycobacterium* se utilizó PPD a una concentración de 200 µg de proteína por pozo/placa. Estos datos fueron obtenidos previa titulación de cada antígeno en el laboratorio.

Correlación entre la respuesta inmune celular y la respuesta inmune humoral durante la infección histoplasmosa.

Se utilizaron un total de 120 ratones para cada grupo experimental. Los grupos de ratones de 1 mes y de 4.5 meses fueron probados a diferentes tiempos. Los ratones fueron infectados con una dosis subletal para los de 1 mes  $3.16 \times 10^7$  levaduras/ml y los de 4.5 meses  $1.99 \times 10^8$  levaduras/ml. La respuesta humoral y celular fueron monitoreadas cada 8 días. La respuesta celular fue medida por la hipersensibilidad retardada manifestada por la intradermorreacción obtenida con la prueba de hinchazón del cojinete plantar, con algunas modificaciones de la técnica original descrita por Rifkin (23). La respuesta humoral fue determinada por hemaglutinación pasiva (25), siendo el título expresado por la más alta dilución del suero que muestra hemaglutinación.

Transferencia pasiva de suero contra el por ciento de sobrevivida y la respuesta celular a la infección histoplasmosa.

Dosis de 300 µg proteína/0.3 ml de suero inmune homólogo (anti-*Histoplasma*), suero inmune heterólogo (anti-*Mycobacterium*) y suero normal fueron inyectados respectivamente a 3 diferentes grupos de ratones por vía subcutánea. Un grupo de animales recibió la transferencia tres ho-

ras antes de la infección y el otro grupo 10 días después de la infección con *Histoplasma*. La especificidad de los sueros transferidos fue previamente probada por ELISA.

Se llevaron a cabo dos tipos de experimentos de transferencia de suero, cada uno se realizó por duplicado. En el primero, a un total de 62 ratones se les transfirió suero normal y suero inmune contra *Histoplasma* y se determinó el porcentaje de sobrevivencia de los animales infectados con el hongo.

En el segundo tipo de experimento, se incluyó suero normal, suero inmune de *Histoplasma* y de *Mycobacterium* además de inmunoglobulinas parcialmente purificadas. En cada grupo de transferencia se utilizaron 10 animales, a los cuales se les determinó el porcentaje de sobrevivencia y la reactividad de la hipersensibilidad retardada. La infección de los mismos, fue verificada por cultivo de órganos para aislamiento del hongo.

#### Cultivo de órganos.

El bazo de cada ratón infectado fue homogeneizado en SBS suplementado con 50 µg/ml de gentamicina. El homogeneizado fue inoculado por duplicado en Agar Micobiotico y Agar BHI e incubado a 26-28°C.

## RESULTADOS

### Determinación de anticuerpos.

Para todos los experimentos de transferencia pasiva, los anticuerpos anti-*Histoplasma* y anti-*Mycobacterium* fueron determinados por ELISA. Al usar se el antígeno histoplasmina, el suero total anti-*Histoplasma* dió un título de 1:1280, mientras que en las inmunoglobulinas precipitadas con sulfato de amonio el título fué de 1:640. La determinación del título de anticuerpos anti-*Mycobacterium*, se realizó con el antígeno PPD, dando un título de 1:2560. Por otro lado, el suero normal fue siempre negativo para los antígenos probados.

### Correlación entre la respuesta inmune celular y humoral durante la infección histoplasmosa.

Ratones de un mes y de 4.5 meses de edad se infectaron con una dosis subletal de levaduras de *Histoplasma*. La respuesta celular y humoral fue seguida durante un período de aproximadamente 3 meses. Para establecer una comparación entre ambas manifestaciones inmunes a lo largo de la infección, se hizo la determinación de ambas respuestas a intervalos de 8 días. Las figuras 2 y 3 ilustran los resultados para los dos grupos de ratones usados. Se observa una distribución cíclica entre ambas respuestas, con un desfaseamiento entre la expresión medible de cada una de ellas. Una característica que puede ser resaltada en los experimentos realizados, es que la caída de la respuesta celular aparentemente precede al incremento de los títulos de anticuerpos. Para los ratones jóvenes (Fig. 2), encontramos que la caída de la respuesta mediada por células se ve en los días 40 y 88, mientras que el incremento en la respuesta humoral se manifiesta en los días 32, 80 y 88. Con los ratones adultos (Fig. 3), la respuesta celular cae en los días

24, 64 y 88, y los anticuerpos incrementan sus títulos en los días 32 y 72.

Efecto de la transferencia pasiva del suero en la infección histoplasmosa.

1. En la sobrevivencia de los animales infectados.

Cuando el suero anti-*Histoplasma* fue transferido 3 horas antes de la infección, esto indujo un abatimiento drástico en el porciento de sobrevivencia (10%) de los ratones transferidos, como puede apreciarse en la figura 4. Asimismo, el suero normal transferido 3 horas antes de la infección no interfirió con el resultado de la enfermedad ya que el porcentaje de sobrevivencia (66.6%) es similar al control. El control de la infección sin transferencia, desarrolló un 70% de sobrevivencia. Mientras que la transferencia realizada 10 días después de la infección, aumentó el porciento de sobrevivencia con respecto al control de los animales infectados (100%).

2. En la manifestación de respuesta celular.

El efecto de la transferencia pasiva de los anticuerpos en la manifestación del parámetro medible de la respuesta celular a la infección histoplasmosa, la intradermorreacción (IDR), fue estudiada en grupos de animales que recibieron diferentes transferencias.

Los ratones que recibieron material transferido 3 horas antes de la infección desarrollaron una baja respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado, que fue determinado por IDR en cojinete plantar (Fig. 5). De modo general, los niveles de IDR fueron bajos en los grupos de animales que recibieron suero anti-*Histoplasma*, anti-*Mycobacterium* o bien suero normal. Estos animales se presentaron más enfermos y desarrollaron los signos típicos de la enfermedad, tales como irritabilidad, erizamiento del pelo y pérdida de peso. Sin embargo, los animales que recibieron transferencia 10 días después de la

infección (Fig. 6) desarrollaron una infección leve y altos niveles de IDR, en todos los grupos transferidos.

Cultivos de hongos.

La tabla 2 muestra el aislamiento del hongo, particularmente de los bazo de ratones infectados que fueron transferidos con suero inmune.

El *H. capsulatum* fue aislado en los días 16, 24 y 32 de todos los grupos de ratones infectados y transferidos, salvo a los 8 días, del grupo que recibió la transferencia 3 horas antes de la infección.



## DISCUSION

Tomando en cuenta el desconocimiento del papel de los anticuerpos en el proceso de la infección histoplasmosa y dando por hecho que éstos no participan en la defensa contra esta enfermedad, decidimos investigar la probable función de esas moléculas a lo largo del curso y la resolución de ese padecimiento. Para lo cual utilizamos un modelo experimental en ratones donde la enfermedad se desarrolla con signos típicos, caracterizados por erizamiento del pelo, irritabilidad, pérdida de peso e inmovilización, confirmando la infección por aislamiento del hongo en los tejidos.

En el presente trabajo se plantea que la participación de los anticuerpos en la infección histoplasmosa involucra un mecanismo de modulación inmune de la respuesta mediada por células. La demostración de una interacción entre la respuesta humoral y la respuesta celular durante el proceso infeccioso, tanto en ratones jóvenes como en adultos, donde se muestran que el aumento de una respuesta precede de la caída de la otra, sugieren la existencia de un mecanismo modulador entre ellas (Fig. 2 y 3).

Es importante hacer notar que estos resultados fueron únicamente observados con una infección subletal, ya que si produjéramos una infección aguda severa la resolución drástica de esta acortaría la vida de los animales, circunstancia que no permitiría observar la manifestación de ambas respuestas inmunes.

Para determinar si el suero fue capaz de modificar la defensa del animal, dada por la respuesta celular, se realizó la transferencia pasiva de sueros conteniendo altos títulos de anticuerpos. Los resultados de los ex-

perimentos, sugieren una interferencia de los anticuerpos específicos en la expresión de la defensa celular y la respuesta a la intradermorreacción a la histoplasmina. Sin embargo, el efecto de los anticuerpos anti-*Histoplasma* es dependiente del tiempo de transferencia con respecto al momento de la infección, ya que en los ratones infectados, el resultado de la enfermedad es drástico si los anticuerpos anti-*Histoplasma* son transferidos 3 horas antes de la infección, mientras que la transferencia 10 días después de la infección no influye en el porcentaje de sobrevivencia de los animales infectados (Fig. 4).

Es posible que el efecto de la transferencia sobre el comportamiento de cada grupo de ratones transferidos se deba a mecanismos diferentes, puesto que el suero transferido 3 horas antes de la infección abate la defensa mientras que la transferencia a los 10 días no disminuye la sobrevivencia de los animales. Se puede plantear que el suero específico transferido 3 horas antes de infectar a los animales actuarían en la fase aferente de la respuesta inmune y los macrófagos así como otras células con receptores para Fc de inmunoglobulinas podrían ser el blanco celular para su efecto. Mientras que la transferencia a los 10 días post-infección encuentra una respuesta de defensa ya establecida y el efecto sobre las poblaciones celulares podría darse por mecanismos distintos produciendo otros efectos, entre ellos una estimulación inespecífica de la respuesta mediada por células, ya que el suero normal como el específico parecen capacitar, bajo estas circunstancias, una mejor defensa celular (Fig. 4).

Por otro lado, la respuesta de intradermorreacción, cuando el suero es transferido 3 horas antes de la infección (Fig. 5), mostrando que los diferentes tipos de suero utilizados no discriminan su efecto sobre la IDR, entre todos los grupos de ratones estudiados, así como la ausencia de cam-

bios trascendentes en la respuesta tardía de los animales transferidos 10 días post-infección (Fig. 6), sugiere expresiones independientes entre el fenómeno de hipersensibilidad y manejo de la defensa celular, como se ha planteado en otro modelo infeccioso (26, 27), dados posiblemente por la participación de diferentes mecanismos supresores o estimuladores que dependen de la fase de montaje de la respuesta inmune.

El mecanismo exacto de como participan las inmunoglobulinas sobre la manifestación de la respuesta celular se desconoce. Ellas podrían actuar sobre los macrófagos en la fase de procesamiento del antígeno o bien alterando la eficiencia del proceso fagocítico. Otra posibilidad sería su efecto sobre células supresoras, ya que en estas células se han encontrado receptores (FcR) para inmunoglobulinas. Se conoce por ejemplo, que la IgG actúa como molécula reguladora y se asume un efecto supresivo de los anticuerpos anti-idiotipo de la clase IgG<sub>2</sub> en otros modelos inmunológicos (28).

Las inmunoglobulinas humanas en histoplasmosis han sido estudiadas por otros autores, quienes han observado que las IgG, IgA e IgE del suero de pacientes histoplasmosos se encuentran en altos niveles (29, 30, 31). Con excepción de la IgA, las otras dos inmunoglobulinas están relacionadas a mecanismos de expresión de la respuesta mediada por células. La IgG<sub>2</sub> ha estado comprometida con el abatimiento de la intradermorreacción en un sistema acarreador-hapteno, en donde la respuesta de la IDR al acarreador BCG (gama-globulina bovina) es inhibida por los anticuerpos para el hapteno de subclase IgG<sub>2</sub> (28). En una enfermedad fúngica relacionada, la coccidioidomicosis, se ha visto que la IgG específica abate la respuesta mediada por células T (32).

Los mecanismos regulatorios de la respuesta inmune tienen muchas variaciones en sus especificidades, uno de sus más interesantes aspectos involucran complejos inmunes y anticuerpos anti-idiotipo. Es posible que los anticuerpos específicos o algunas inmunoglobulinas producidas durante el proceso infeccioso actúen como anticuerpos anti-idiotipos (33). Estos podrían reaccionar con receptores para el antígeno presentes en la membrana de los linfocitos, los cuales comparten epítopes análogos con los idiotipos, razón por la cual los anticuerpos anti-idiotipo podrían tener actividad antireceptor (34). También se sabe que complejos antígeno-anticuerpo son eficientes para inducir anticuerpos anti-idiotipo y algunos trabajos sugieren que estos complejos activan células supresoras (35). Esto podría ocurrir en la histoplasmosis ya que complejos inmunes circulantes han sido descritos por Bullock y colaboradores (36).

Sabemos que los anticuerpos no son los únicos componentes séricos capaces de interferir en la respuesta celular. Factores no específicos y de origen no inmunológicos, han sido descritos por su efecto inhibitorio de la respuesta celular (37, 38), esto explicaría porque en la infección histoplasmosa hay de cierto modo, un abatimiento en la defensa mediada por la respuesta celular producida por el suero normal. Sin embargo, el efecto más contundente de los anticuerpos específicos sobre la respuesta celular apoya la función regulatoria de los anticuerpos anti-*Histoplasma*, sea por mecanismos que involucran especificidad o por reacción cruzada con actividad anti-idiotípica.

## CONCLUSIONES

1. Existe una distribución cíclica de la respuesta inmune humoral y celular con un desfazamiento entre ellas en los ratones infectados con *H. capsulatum*.
2. La transferencia pasiva de anticuerpos anti-*Histoplasma* 3 horas antes de la infección abate la sobrevida de ratones infectados con dosis subletal.
3. La transferencia de suero inmune total o parcialmente purificado modifica la respuesta inmune de los animales, dependiendo del tiempo de transferencia con respecto al momento de la infección.
4. La transferencia de suero no afecta aparentemente la manifestación de la IDR tanto en los animales transferidos 3 horas antes de la infección como en los transferidos 10 días después de la infección, a pesar de que los porcentajes de la IDR de los ratones transferidos 3 horas antes de la infección fueron más bajos.

Los resultados obtenidos en este modelo experimental sugieren que los anticuerpos pueden jugar un papel modulador sobre la respuesta mediada por células en la infección histoplasmosa.

## BIBLIOGRAFIA

1. RIPPON J W. Histoplasmosis. In: Saunders W B, ed. Medical Mycology Ist ed. Philadelphia 1974; pp 321-347.
2. GONZALEZ-OCHOA A. Histoplasmosis pulmonar aguda en la República Mexicana. Rev Invest Salubr Enferm Trop (Méx), 1959; 19: 341-349.
3. EMMONS C W, BINFORD C H, UTZ J P, KWONG-CHUNG K J. Histoplasmosis. In: Lea & Febiger, ed. Medical Mycology 3rd ed. Philadelphia 1977; pp 305-341.
4. GONZALEZ-OCHOA A. Las micosis pulmonares en México y Centroamérica. Rev Invest Salud Públ (Méx) 1969; 29: 179-196.
5. VELASCO C O. Aspectos epidemiológicos de la histoplasmosis en México. Neumol Cir Tórax Mex 1985
6. REYES-MONTES MR, CASASOLA J, ELIZONDO NE, TAYLOR ML. Relationship between age and cellular suppressive activity in resistance to *Histoplasma capsulatum* infection. Sabouraudia J Med Vet Mycol 1985; 23: 351-360.
7. ARTZ R P, BULLOCK W E. Immunoregulatory responses in experimental disseminated histoplasmosis: Lymphoid organ histopathology and serological studies. Infect Immun 1979; 23: 884-892.
8. 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.

9. TEWARI R P, SHARMA D, SOLOTORVSKY M, LAFEMINA R, BALINT J. Adoptive transfer of immunity from mice immunized with ribosomes of live yeast cell of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 1977; 15: 785-789.
10. 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: 605-613.
11. WILLIAMS D M, GRAYBILL J R, DRUTZ D J. *Histoplasma capsulatum* infection in nude mice. *Infect Immun* 1978; 21: 973-977.
12. 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.
13. BURT W R, SMITH R A. Studies on experimental murine histoplasmosis: host protection and cellular immunity. *Can J Microbiol* 1983; 29: 102-107.
14. TAYLOR M L, ESLAVA-CAMPOS C, GARCIA-GONZALEZ R, HERNANDEZ-RAMIREZ 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: Proceeding of the 7th Congress of ISHAM*, Jerusalem, Israel. March 11-16, 1979. New York: Elsevier/North Holland, 1980. pp 97-101.
15. 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; pp 52.
16. RICO G, OCHOA R, OLIVO A, ORTIZ-ORTIZ L. Role of antibody in *Nocardia brasiliensis* infection in mice. In: Schaal/Pulverer, eds. *Actino mycetes*. Stuttgart, New York; Gustav Fischer Verlag, 1981: pp 229-233.

17. HERNANDEZ R A. Evaluación de la homología genética en ratones singénicos BALB/c usando pruebas inmunes de actividad celular *in vivo* e *in vitro*. Tesis de Licenciatura, Escuela de Ciencias Químicas. UAP Puebla, México, 1979; pg 14-15.
18. TEWARI R P, KUGEL H L. Supressive effect of streptomycin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. Mycopathol Mycol Appl 1971; 44: 231-240.
19. LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, RANDALL R J. Protein measurements with the folin-phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.
20. MARCUS S, NIELSON B D, RAMBO F R. Isolation of systemic mycotic pathogens: Qualitative and quantitative aspects. J Bacteriol 1956; 72: 473.
21. CAMPBELL D H. Nephelometry. Mc Farland Standard. In: Benjamin W A, Inc. Methods in Immunology. New York. 1963; pp 249-250.
22. HEIDE K, SCHWICK H G. Salt fractionation of Immunoglobulins. In: Weir D H, ed. Handbook of experimental immunology. 3th ed. Blackwell Scientific Pa London, 1978; pp 7.1-7.1j.
23. 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 foodpad swelling test as assays of active and passive sensitization. J Infect Dis 1970; 133: 50-56.
24. YOLKEN R B. Enzyme immuno assays for the detection of infectious antigen in body fluids. Current limitation and future prospect. Rev Infect Dis 1982; 4: 35-68.
25. 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.



26. MACKANESS G B. The relationship of delayed hypersensitivity to acquired cellular resistance. *Brit Med Bull* 1967; 23: 52-54.
27. HUSSEIN S, CURTIS J, AKUFFO H, TURK JL. Dissociation between delayed-type hypersensitivity and resistance to pathogenic mycobacteria demonstrated by T-cell clones. *Infect Immun* 1987; 55: 564-567.
28. NEVEU P J, NICUSANI V V, FAJFARD A, BORDUAS A G. Modulation of the immune response by passive antibodies. IV. Effects of IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub> antihapten antibodies. *Immunology* 1978; 35: 129-132.
29. COX R A. Immunologic studies of patients with histoplasmosis. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120: 143-149.
30. CHANDLER Jr J W, SMITH T K, NEWBERRY Jr W M, 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: 247-254.
31. COX R A, DOUGLAS A R. Immunoglobulin E in histoplasmosis. *Infect Immun* 1980; 29: 290-293.
32. COX R A, POPE R M, YOSHINOYA S. Immune complexes in sera of patients with coccidioidomycosis. *Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol* 1979; F33, 368.
33. DRESSMAN G R, KENNEDY R C. Perspective. Anti-idiotypic antibodies: Implications of internal image-based vaccines for infectious diseases. *J Infect Dis* 1985; 151: 761-765.
34. BINZ H, WIGZELI 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.

35. SY M S, BACH B A, DOHI Y, NISONOFF A, BENACERRAF B, GREENE M I.  
Antigen and receptor driven regulatory mechanism. I. Induction of  
suppressor T cells with anti-idiotypic antibodies. J Exp Med 1979;  
150: 1216-1228.
36. BULLOCK W E, ARTZ R P, BHATHENA D, TUNG K S K. Histoplasmosis:  
Association with circulating immune complexes, eosinophilia and  
mesangiopathic glomerulonephritis. Arch Intern Med 1979; 139: 700-702.
37. LEVENE G M, TURK J L. Reduced lymphocyte transformation due to a  
plasma factor in patients with active syphilis. Lancet 1969; ii:  
246-247.
38. 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: 888-899.

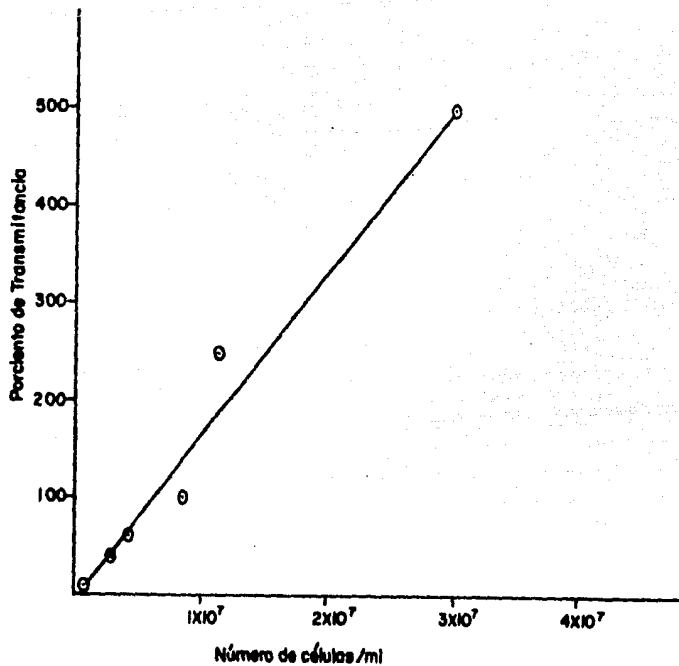


FIGURA 1. RELACION GRAFICA ENTRE TRANSMITANCIA Y EL NUMERO DE CELULAS LEVADURIFORMES. Cada dilución de las células preparadas en SS fue leída en un hematocitómetro contrastando las células con azul de algodón. La lectura en fotocolorímetro se hizo en un aparato Klett-Summerson.

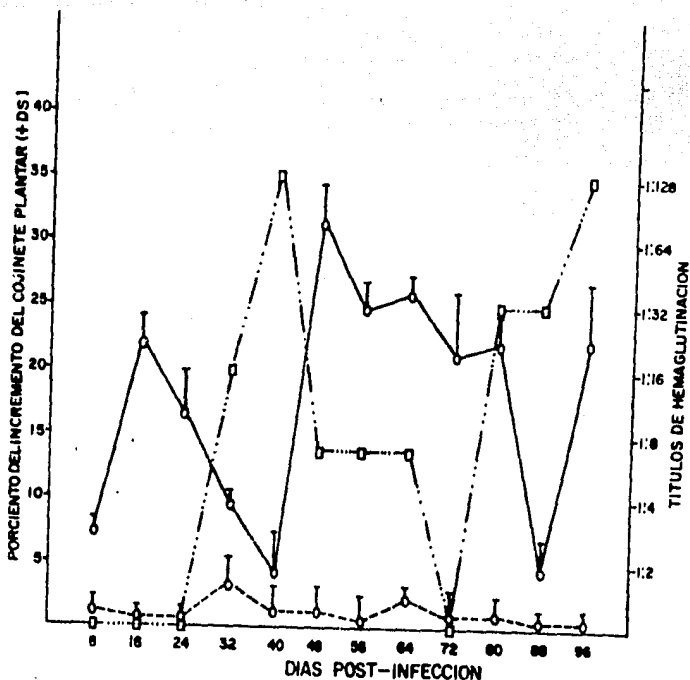


FIGURA 2. CORRELACION ENTRE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL EN RATONES JOVENES DURANTE LA INFECCION CON *Histoplasma*. Prueba de la hinchazón del cojinete plantar (IDR) contra hemaglutinación. 0—0 por ciento del incremento en la hinchazón del cojinete plantar en ratones infectados y desafiados con el antígeno histoplasmina (30  $\mu$ g de proteína/0.05 ml) menos el valor del mismo antígeno en los ratones normales. 0-----0 por ciento del incremento de la hinchazón del cojinete plantar en ratones infectados y desafiados con el control de SS menos el valor de SS en los ratones normales. []-...-[] títulos hemaglutinantes. Se usaron ratones singénicos machos BALB/c. El antígeno histoplasmina se usó a 1 mg de proteína/ml. +DS= Desviación estandar.

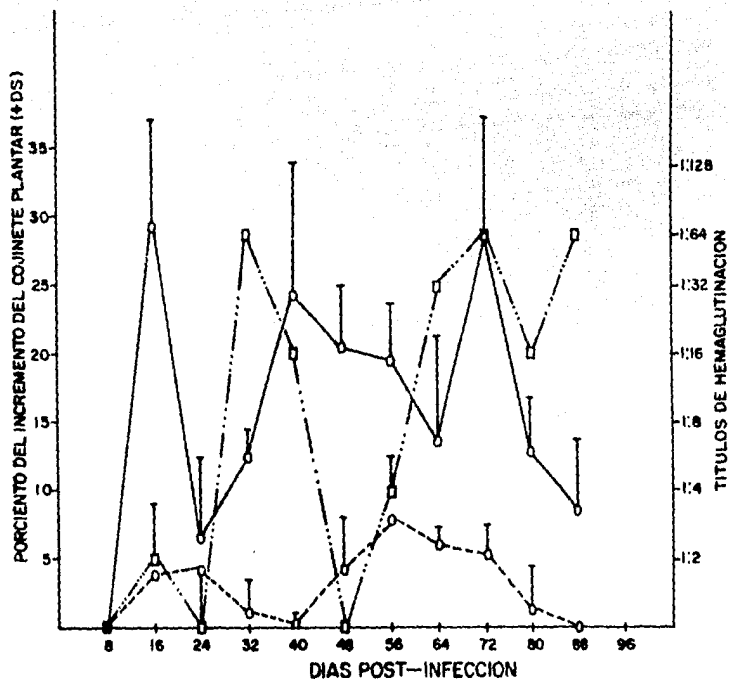


FIGURA 3. CORRELACION ENTRE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL EN RATONES ADULTOS DURANTE LA INFECCION CON *Histoplasma*. Prueba de la hinchazón del cojinete plantar (IDR) contra hemaglutinación. Se usaron ratones machos BALB/c. Las condiciones y símbolos de todos los experimentos son iguales a la figura 2.

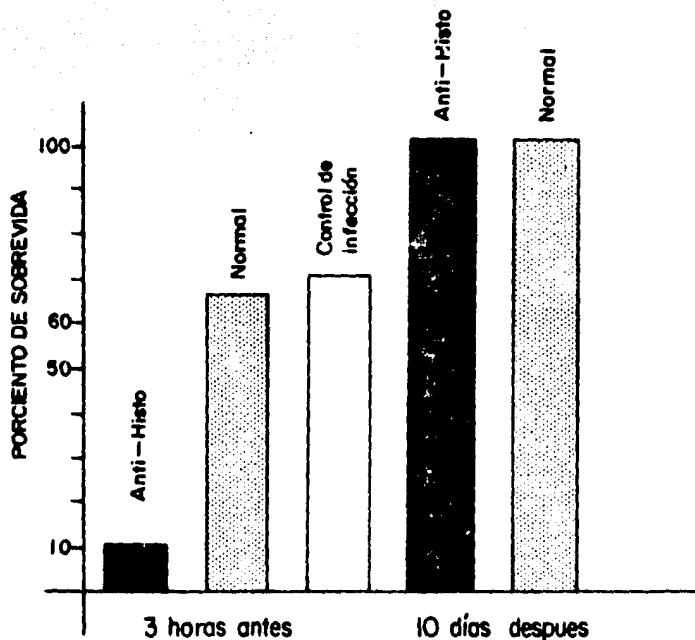


FIGURA 4. PORCIENTO DE SOBREVIVENCIA DE RATONES ADULTOS MACHOS BALB/c INFECTADOS CON *Histoplasma capsulatum* Y TRANSFERIDOS PASIVAMENTE CON SUERO ANTI-*Histoplasma*. Los ratones fueron infectados *in* traperitonealmente con una dosis subletal ( $1.9 \times 10^8$  levaduras/ml) de la cepa 5037 de *Histoplasma capsulatum*. La transferencia pasiva se realizó subcutáneamente con 0.3 ml de cada suero a cada grupo de animales. La especificidad de los sueros transferidos fue determinada por ELISA.

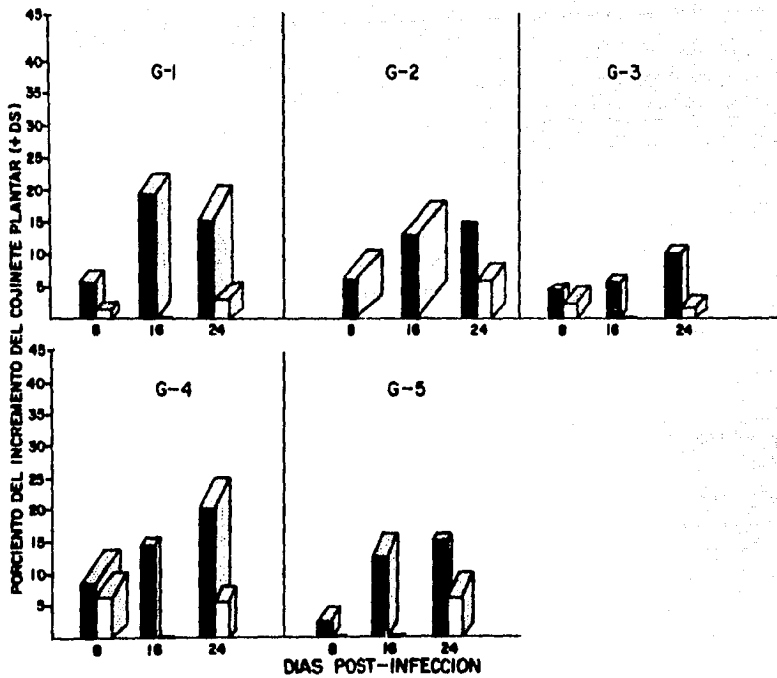


FIGURA 5. INTRADERMORREACCION EN RATONES TRANSFERIDOS CON SUERO INMUNE 3 HORAS ANTES DE LA INFECCION. Ratones adultos BALB/c infectados intraperitonealmente con *Histoplasma capsulatum* ( $1.99 \times 10^8$  levaduras/ml) recibieron diferentes sueros antes de la infección. La respuesta de IDR fue realizada por la prueba de la hinchazón del cojinete plantar y los valores al antígeno específico fueron corregidos por el valor obtenido con los controles de SS, usando como antígeno de desaffo la histoplasmina 30  $\mu$ g proteína/0.05 ml. Los grupos transferidos fueron: G-1 control sin transferir, G-2 suero anti-*Histoplasma*, G-3 suero normal precipitado con sulfato de amonio, G-4 suero anti-*Histoplasma* precipitado con sulfato de amonio, G-5 suero anti-*Mycobacterium* precipitado con sulfato de amonio. [:::] La proyección en perspectiva representa la desviación estandar; [■] Ratones infectados; [ ] Ratones no infectados.

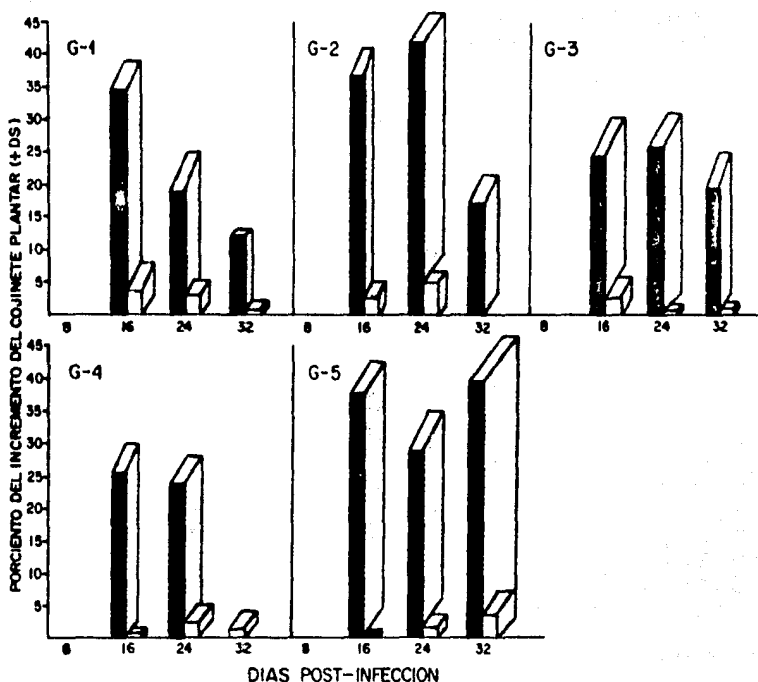


FIGURA 6. INTRADERMORREACCION EN RATONES TRANSFERIDOS CON SUERO INNUNE 10 DIAS DESPUES DE LA INFECCION. Ratones adultos BALB/c infectados intraperitonealmente con *Histoplasma capsulatum* ( $1.99 \times 10^8$  levaduras/ml) recibieron diferentes sueros después de la infección. La respuesta de IDR fue realizada por la prueba de la hinchazón del cojinete plantar y los valores fueron corregidos por el valor obtenido con SS en los controles, usando como antígeno de desafío la histoplasmina 30  $\mu$ g de proteína/0.05 ml. Los grupos transferidos fueron los mismos que los de la figura 6. ■ Ratones infectados; □ Ratones no infectados.



TABLA 1. ESTANDARIZACION DE LA SUSPENSION BACTERIANA POR NEFELOMETRIA

ESCALA DE McFARLAND	BaCl <sub>2</sub> al 1% (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 1% (ml)	Nº bacterias x 10 <sup>6</sup>
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000

Se determinó la cantidad de bacterias por turbidimetría en un fotocolorímetro Klett-Summerson utilizando un filtro de 400 a 450 nm.

TABLA 2. AISLAMIENTO DE *Histoplasma capsulatum* DEL BAZO DE RATONES INFECTADOS Y TRANSFERIDOS CON SUERO

SUERO TRANSFERIDO	TIEMPO DE TRANSFERENCIA					
	3 HORAS ANTES DE LA INFECCION			10 DIAS DESPUES DE LA INFECCION		
	DIAS POST-INFECCION			DIAS POST-INFECCION		
	8	16	24	16	24	32
Control no transferido	--	++	++	++	--	++
Suero anti- <i>Histoplasma</i>	--	++	++	++	++	++
Suero anti- <i>Histoplasma</i> precipitado con sulfato de amonio	--	++	++	++	++	++
Suero anti- <i>Mycobacterium</i> precipitado con sulfato de amonio	--	++	--	++	++	++
Suero normal	--	++	++	++	+	++
Control no infectado	--	--	--	--	--	--

Células de bazo se homogeneizaron con SBS. Se aisló el hongo en BHI suplementado con 0.1% de L-cisteína, 1% de glucosa y gentamicina 50 µg/ml.