

11261
2e)
14

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FAGOCITOSIS DE Histoplasma capsulatum:
CINÉTICA DE INTERNALIZACIÓN DE
LEVADURAS EN MACRÓFAGOS

TESIS

Que para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias Biomédicas
Área: Inmunología

P r e s e n t a

MARÍA ESTELA LEÓN ISLAS

FALLA DE ORIGEN

México, D.F.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Planteamiento del problema.....	12
Hipótesis.....	13
Objetivos.....	13
Materiales y Métodos.....	14
Resultados.....	19
Discusión.....	24
Conclusiones.....	30
Abstract.....	31
Referencias.....	32
Esquemas y figuras.....	39
Apéndice de Medios y Soluciones.....	49

RESUMEN

Se estudió la cinética de fagocitosis de levaduras de Histoplasma capsulatum en macrófagos murinos sincronizando el inóculo y la ingestión (internalización) de levaduras a 4°C por 1 h, a fin de permitir un mejor contacto de los fagocitos y las levaduras, durante la fase de adherencia. La fagocitosis se llevó a cabo a 37°C con diferentes periodos de incubación (0, 15, 30, 60 min, 3 y 24 h) para determinar el tiempo de internalización de las células levaduriformes a los macrófagos. El seguimiento de la fagocitosis fue realizado por microscopía electrónica de transmisión y de barrido en una línea celular de macrófagos (J774.2), así como por la determinación del mecanismo oxidativo por quimioluminiscencia, en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c. Se utilizó Mycobacterium tuberculosis como microorganismo de referencia.

La fagocitosis de H. capsulatum fue retardada en comparación con la del bacilo tuberculoso y los macrófagos (J774.2) internalizaron levaduras en un tiempo aproximado de 15-30 minutos. Mientras H. capsulatum fue observado en el interior del macrófago solamente a partir de los 15 min de fagocitosis, M. tuberculosis fue observado desde los 0-5 minutos. Además, a los 60 min aún se encontraron levaduras adheridas, siendo que los macrófagos infectados con M. tuberculosis presentaron daño y muerte celular. Estos resultados apoyan las diferencias en la internalización de ambos microorganismos.

La técnica de quimioluminiscencia no fue útil para determinar el tiempo de internalización del hongo, en virtud de que H. capsulatum inhibe el estallido respiratorio, mientras que los testigos de zimosano y M. tuberculosis estimularon el mecanismo oxidativo de los macrófagos.

Histoplasma capsulatum, el agente etiológico de la micosis profunda llamada histoplasmosis americana, es un parásito intracelular con gran afinidad por el sistema fagocítico mononuclear. Presenta la característica de ser un hongo dimórfico que crece a temperatura ambiente en la naturaleza en forma de micelio. Posee dos tipos de esporas: las macroconidias tuberculadas (8-19 μm de diámetro) y las microconidias (2-4 μm de diámetro). Estas esporas son la forma infectante del hongo que, por vía respiratoria, penetran al huésped, se transforman en levaduras y sobreviven como patógeno intracelular dentro del macrófago [1,2].

La ubicación geográfica de la histoplasmosis en el continente americano abarca desde los Estados Unidos hasta Sudamérica [1,2]. En México, se han identificado casos de esta enfermedad en toda la república, cobrando mayor importancia en nuestro país por la alta tasa de letalidad descrita para la fase pulmonar primaria. Esto puede ser debido a su frecuente adquisición en recintos cerrados como minas abandonadas, donde se presentan las condiciones óptimas para el desarrollo de H. capsulatum, como son la humedad, el calor y los nutrientes presentes en el guano del murciélago que es rico en fosfatos y productos nitrogenados.

La histoplasmosis se encuentra principalmente en zonas mineras productoras de oro y plata debido a que muchas minas son abiertas periódicamente a la explotación con el descubrimiento de nuevas vetas, originando brotes epidémicos que afectan fundamentalmente al trabajador minero [3,4].

Según la clasificación clínica de la histoplasmosis realizada por González Ochoa y modificada por Velasco Castrejón [5],

se reconocen tres fases de la enfermedad: 1) La primaria sintomática presenta tres formas clínicas: la leve, la moderada y la grave. La leve simula un ataque gripal, con malestar general, cefalea, dolores musculares y óseos, febrícula, sudoración, serología positiva débil; desaparecen las molestias de una a dos semanas. La moderada presenta remisiones y se desarrolla con fiebre y signos respiratorios discretos, tos seca, disnea leve, estertores húmedos y pequeñas áreas de submatidez; contrasta la pobreza del cuadro respiratorio con las acentuadas sombras pulmonares observadas desde los primeros días de la infección; además, presenta serología positiva intensa y el proceso termina de tres a cuatro semanas, continuando el enfermo con sensación de debilidad por un tiempo variable. La grave, con fiebre alta, escalofríos, sudoración profusa, cefalea, dolores musculares y óseos, debilidad, así como profundo decaimiento; y del cuadro respiratorio, lo más llamativo, es una disnea sumamente acentuada; presenta toda clase de ruidos respiratorios, lesiones cavitarias o tumorales encapsuladas, serología positiva muy alta y cuando hay recuperación, la sintomatología desaparece después de uno o dos meses, pero el alivio va seguido de una convalecencia prolongada. 2) La segunda fase es la residual de la fase primaria donde encontramos lesiones cavitarias o tumorales encapsuladas, sintomatología respiratoria mínima y serología negativa o positiva débil. 3) La última fase es la de reinfección endógena que presenta dos formas clínicas: la aguda y la crónica. En la aguda se observa un cuadro respiratorio febril agudo, hepato y espleno megalia, adenopatías, diarrea, serología positiva intensa, siendo mortal a corto plazo. En la crónica hay un cuadro respiratorio

similar al de la tuberculosis, fiebre moderada y cuando disemina se encuentran: adenopatías, hepato y esplenomegalia, lesiones en mucosas, especialmente en faringe y cavidad oral. Normalmente la infección cursa en una forma benigna, lo que indica que el huésped es capaz de resolverla [6]. Sin embargo, en los casos en que la infección progresa, la sobrevivencia del hongo en los macrófagos es un factor importante en el desarrollo de la enfermedad. La persistencia y multiplicación del hongo en los fagocitos se debe a que los mecanismos fungicidas para destruirlo presentan una alteración, ya sea por fallas propias del fagocito, o bien porque la respuesta inmune no promueve una activación adecuada de los macrófagos, capaz de llevar a cabo la eliminación del parásito. Además, se plantea que este hongo puede contar con mecanismos de escape a la muerte intramacrofágica [7,8], los cuales podrían facilitar su persistencia y diseminación en el huésped.

Se sabe que las infecciones intracelulares, estimulan en sujetos susceptibles un respuesta inmune preferentemente celular. Esta respuesta, dada por la participación de diferentes subpoblaciones de linfocitos T con distintas funciones, está caracterizada por una amplia variedad de actividades biológicas, dirigidas por mediadores denominados linfocinas, que tienen acción principal sobre los macrófagos. Siendo el macrófago el que determina el destino final de la infección histoplasmosa y la fagocitosis la actividad más relevante en el binomio macrófago/hongo, es conveniente destacar algunos conceptos del proceso fagocítico.

Se utiliza el término genérico endocitosis para definir el proceso por el cual algunas células son capaces de ingerir macromoléculas o partículas, las cuales son encerradas en una porción

de la membrana plasmática, seguida de invaginación y posterior formación de una vesícula intracelular que contiene el material ingerido [9]. Dos términos se han distinguido para caracterizar la actividad de ingestión, según el tamaño de la vesícula formada o según el tamaño del material a ser ingerido. El primero es la pinocitosis, que implica la ingestión de líquidos o moléculas solubles de tamaño menor a $0.5 \mu\text{m}$, por vía de pequeñas vesículas. El segundo es la fagocitosis, que corresponde a la ingestión de partículas mayores que $0.5 \mu\text{m}$, como microorganismos o células dañadas, por medio de la formación de vesículas grandes llamadas vacuolas. Sin embargo, el tamaño preciso del material, que define la utilización de ambos términos, no está bien caracterizado y, además, cambia con el tipo de célula fagocítica. Los macrófagos poseen una gran capacidad para ingerir tanto partículas que varían enormemente en su tamaño, como moléculas solubles, las cuales son ingeridas a través de receptores, mientras que los polimorfonucleares presentan una menor capacidad de ingestión relacionada al tamaño del material ingerido [10]. Sin embargo, el término fagocitosis sigue siendo empleado por varios autores para denominar al fenómeno mediante el cual una partícula es ingerida, digerida y, finalmente, sus productos de digestión exocitados. Actualmente, existe la tendencia para denominar fagocitosis al proceso de ingestión (también llamado internalización), separando los eventos posteriores del procesamiento del material fagocitado en las etapas subsecuentes de fusión fagosoma-lisosoma, digestión y exocitosis.

El término endocitosis también ha sido empleado en diferentes circunstancias y muchos especialistas lo utilizan para defi

nir la ingestión de moléculas solubles a través de receptores específicos y se denominan "endocitosis mediada por receptores", que corresponden al término usado por otros autores de "pinocitosis mediada por receptores" [9,10]. En la fagocitosis, conceptualizada como ingestión de partículas, se distinguen dos fases. La primera es la adherencia y comprende una serie de interacciones específicas y no específicas, de la partícula con la superficie externa de la membrana plasmática del fagocito. Es un proceso pasivo de tipo unión receptor-ligando que no requiere de energía. La segunda comprende la internalización de la partícula. Se realiza a través de la fusión de la membrana plasmática de la célula fagocítica que rodea la partícula, con la consecuente formación de la vacuola fagocítica o fagosoma. Este es un proceso activo, dependiente de temperatura y con alto gasto energético [11]. La fase de internalización de la fagocitosis, se realiza a través de receptores. Para los macrófagos se han determinado los siguientes: 1.- Receptores para la porción Fc de varias subclases de inmunoglobulina G; 2.- Receptores para fragmentos del complemento; 3.- Receptores para glicoconjugados con residuos terminales de manosa y/o fucosa; 4.- Receptores para fibronectina, lactoferrina, α -2-macroglobulina; 5.- Receptores que median la ingestión de partículas inertes, como por ejemplo las de látex [11]. Durante la interacción ligando-receptor se lleva a cabo mediante un mecanismo semejante a una cremallera; en una porción localizada en la membrana plasmática de esta manera que los receptores del macrófago se van uniendo a las moléculas complementarias del ligando (partícula o molécula soluble) hasta rodearla por completo, formándose la vesícula endocítica. Un paso similar entre fa

gocitosis y endocitosis (pinocitosis) mediada por receptores es el ensamblaje de una proteína fibrosa de 180,000 daltones llamada clatrina, que junto con un polipéptido pequeño de 35,000 daltones forman una cobertura sobre las vesículas endocíticas [9,11]. En el caso de pequeñas vesículas endocíticas, la clatrina juega un papel directo en la formación de la vesícula, mientras que en la vesícula fagocítica se planteaba que la clatrina no jugaba un papel importante; sin embargo, Aggeler y Werb [11], han demostrado que la mitad de los fagosomas observados después de un breve período de fagocitosis, presentaban áreas asociadas a la clatrina. Aunque no está bien definido el papel de la clatrina en la fagocitosis, se cree que esta proteína participa probablemente en el reciclaje rápido de los receptores involucrados en la internalización de la partícula, a la membrana plasmática.

Cuando la partícula ha sido internalizada y se ha formado el fagosoma, ocurre una serie de eventos encaminados a digerirla. Inicialmente se presenta la acidificación del fagosoma [12]; posteriormente, éste es dirigido al centro de la célula donde se fusiona con lisosomas primarios, iniciándose así el proceso de la digestión.

Los mecanismos mediante los cuales los macrófagos digieren y eliminan a las partículas o microorganismos, operan de dos maneras separadas durante el proceso fagocítico: una, dependiente y otra, independiente de oxígeno.

El mecanismo microbicida dependiente del oxígeno parece ser el de mayor importancia en los macrófagos (13,14,15).

La mayoría de los macrófagos, a excepción de los alveolares, utilizan la glicólisis anaeróbica como fuente de energía. En esta

vía los carbohidratos son convertidos a ácido láctico y no hay consumo de oxígeno. Durante y después de la fagocitosis, los fagocitos empiezan a consumir oxígeno, cuando cambian su vía de metabolismo de carbohidratos por otra que produce gran cantidad de energía como es la vía del monofosfato de hexosa. Los fagocitos pueden incrementar su consumo de oxígeno cerca de cien veces cuando son estimulados por la fagocitosis. La enzima NADPH-oxidasa, íntimamente relacionada a esta vía, puede estar asociada físicamente con receptores quimioatrayentes, complejos inmunes, lectinas y adyuvantes que estimulan la vía oxidativa del metabolismo del oxígeno de los fagocitos.

La NADPH-oxidasa reduce al oxígeno del medio (O_2) a radical superóxido ($\cdot O_2^-$), adicionando un electrón. Este anión superóxido lleva una carga negativa y tiene un electrón no apareado que lo vuelve más reactivo. El anión superóxido por sí solo es poco tóxico, pero fácilmente se convierte en otros derivados de oxígeno de alta letalidad. La enzima superóxido dismutasa (SOD) atrapa radicales superóxido y a través de la adición de protones de hidrógeno produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno único o single de oxígeno (1O_2).

El oxígeno único tiene el mismo número de electrones que el oxígeno normal, pero los electrones no apareados rotan en direcciones opuestas, uno con relación al otro. El oxígeno único es un estado excitado de oxígeno con alta energía y puede disipar su exceso de energía por la emisión de fotones [16]. La liberación de luz es una característica importante de los fagocitos estimulados.

El fenómeno denominado quimioluminiscencia proviene de estas especies excitadas de oxígeno, principalmente del oxígeno único.

Otra forma tóxica del oxígeno es el producido dentro de los fagocitos cuando el H_2O_2 reacciona con los radicales superóxido en presencia de hierro, dando oxígeno, ión hidroxilo (OH^-) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$).

El radical hidroxilo es el más potente oxidante que se produce en los sistemas biológicos y se considera como un participante importante en la muerte intrafagocítica.

En los granulocitos (polimorfonucleares, eosinófilos y basófilos) la toxicidad de los metabolitos reactivos de oxígeno aumenta considerablemente por la participación de la enzima mieloperoxidasa que cataliza la reacción de H_2O_2 e ión cloro (Cl^-) a ión hipoclorito (OCl^-), el cual es un poderoso agente microbicida y además es precursor de las cloraminas que son un grupo de halógenos oxidados con acción tóxica (14).

Aunque los macrófagos no tienen mieloperoxidasa, se cree que la catalasa puede actuar de manera similar y, posiblemente, éstos utilicen peroxidasa proveniente de granulocitos para intensificar su acción microbicida [13,15].

Los mecanismos independientes de oxígeno han sido menos estudiados como son: la acción de la lactoferrina, proteínas catiónicas, enzimas líticas lisosomales como la lisozima, las hidrolasas ácidas y neutras [13,15].

Los parásitos intracelulares han desarrollado mecanismos que los permiten escapar de la destrucción en diferentes etapas del proceso fagocítico: ya sea por impedir su reconocimiento y adherencia, inhibir la fusión fagosoma-lisosoma, escapar del fagolisosoma, desarrollar resistencia a la acción de enzimas líticas, escapar al efecto letal de las especies oxígeno tóxicas a través de la

inhibición de la producción de metabolitos reactivos de oxígeno, la neutralización de sus efectos tóxicos o la prevención de la interacción del parásito con los metabolitos tóxicos [17].

En el caso de H. capsulatum, se han planteado algunos de estos mecanismos. Dummont y Robert [8], por microscopía electrónica observaron que a los 5 y 30 min después de la infección in vivo con H. capsulatum se identificaron fusiones fagolisosomales. Sin embargo, a medida que avanzaba el tiempo de infección, las fusiones disminuían. Determinaron dos tipos de vacuolas, unas carentes de fosfatasa ácida, lo que indicaba ausencia de fusión fagolisosomal y otras que contenían esta enzima, las cuales se encontraban en los tiempos más largos de la infección. La observación de estas últimas vacuolas les permitió proponer que la enzima provenía de macrófagos parasitados que fueron fagocitados por otros macrófagos, hecho que pone en duda la fusión fagolisosomal de vacuolas conteniendo el hongo, ya que el marcador lisosomal fosfatasa ácida, se presentaba en vacuolas que contenían restos de macrófagos parasitados. Esto sugiere que el hongo pudiera inhibir la fusión fagolisosomal para escapar de su destrucción intracelular. Sin embargo, otros autores encontraron unión fagolisosomal en macrófagos infectados con Histoplasma [18,19]. Por ejemplo, Patiño et al. [19] observaron por inmunocitoquímica, después de 6 h de fagocitosis, un antígeno de pared de H. capsulatum el cual parecía estar asociado a la membrana de los fagolisomas. Estos resultados reflejan circunstancias ocasionales de la relación huésped/parásito ya que al utilizar una dosis muy baja de infección, se puede encontrar fusiones más fácilmente.

En nuestro laboratorio se ha observado que el índice de fusión fagosoma-lisosoma disminuye a medida que aumenta la dosis y el tiempo de infección [7]. Con base en estos hallazgos se ha planteado que la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma puede darse, pero no es un factor primario para la sobrevivencia de H. capsulatum dentro de los macrófagos [7].

Se sabe que existen variaciones en el comportamiento antifúngico de los macrófagos, dependiendo de su procedencia: animales normales o infectados; diferentes especies; distintas localizaciones (alveolares, peritoneales, circulantes, médula ósea, etc.). Extractos lisosomales de macrófagos alveolares de conejo son capaces de inhibir el crecimiento y la síntesis de proteínas del hongo. Se propone que este efecto involucra la inhibición selectiva del transporte de aminoácidos a través de la membrana de la célula fúngica, debido a alteraciones en la permeabilidad general y en las permeabilidades específicas de varios aminoácidos [20].

Observaciones in vitro han demostrado que los macrófagos por sí solos no matan a H. capsulatum, pero cuando se añaden linfocitos de ratones inmunizados, linfocinas o bien interferón gamma, a los cultivos celulares de macrófagos, éstos son capaces de reducir el crecimiento intracelular del hongo [21,22,23,24,25]. Resultados experimentales in vivo indican que la multiplicación del hongo en el estado parasitario ocurre en el ratón a partir de las 2 primeras semanas después de la infección [25]. Se plantea que las células levaduriformes de Histoplasma son rápidamente fagocitadas por macrófagos alveolares [27,28]. Sin embargo, Kimberlin et al. [29], proponen que los macrófagos alveolares de ratón fagocitan

microconidias de 3 a 5 μm y pequeñas partículas de hifa de 3 a 10 μm a una velocidad similar a la que fagocitan células levaduriformes. Estos autores observan que la fagocitosis de levaduras, esporas y fragmentos hifales comienza de 4 a 6 h después de la infección de los macrófagos. Esta aseveración sobre el tiempo de ingestión del hongo no está confirmada experimentalmente. No obstante, los resultados obtenidos con células levaduriformes de Histoplasma en nuestro laboratorio, sugieren que el hongo requiere de un tiempo de ingestión (internalización) más prolongado. Esta afirmación se fundamenta en una cinética de infección de macrófagos peritoneales de ratón observada por microscopía fotónica y con el método de marcaje del patógeno con isotiocianato de fluoresceína en microscopía de fluorescencia, determinando tanto la dosis óptima de infección resolutive como las diferencias que existen en el tiempo de internalización comparado con otro parásito intracelular [30].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por falta de información sobre la interacción huésped/parásito que ocurre dentro y en la superficie de las células fagocíticas y tomando en cuenta que los estudios sobre la internalización del hongo por fagocitos, no están dirigidos a aclarar su cinética de infección intracelular, en el presente trabajo se han empleado técnicas finas y de mayor resolución, para seguir la internalización de Histoplasma, utilizando diferentes inóculos del hongo y comparando la fagocitosis de éste, con otro parásito intracelular, el Mycobacterium tuberculosis, con el fin de determinar el tiempo de entrada de levaduras de Histoplasma a macrófagos no activados (ver esquemas 1 y 2).

HIPÓTESIS

La internalización de H. capsulatum en macrófagos no activados requiere más tiempo que la de M. tuberculosis.

OBJETIVOS

- I. Determinar el tiempo de internalización de H. capsulatum, en condiciones de dosis resolutive y no resolutive de la infección in vitro.
- II. Comparar la cinética de infección entre H. capsulatum y M. tuberculosis (organismo de referencia).
- III. Observar el tiempo de eliminación del hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMOS.- La cepa EH-46 de H. capsulatum se obtuvo del cepario del Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, UNAM. Se mantuvo en fase levaduriforme a 37°C en medio de infusión cerebro corazón (Bioxón, Mex.) suplementado con 1% de glucosa, 0.1 % de hidrocloreuro de L-cisteina y 25 µg de gentamicina (Scheramex). La cepa H₃₇R_V de M. tuberculosis, donada por el Dr. Jesus Casasola del Instituto Nacional de Pediatría, se cultivó a 37°C en medio Proskawer-Beck modificado por Youmans (PBY).

REACTIVOS.- Todos los reactivos empleados salvo los que se especifican, procedieron de los laboratorios Merck de México, S.A.

MEDIOS Y SOLUCIONES.- Para la descripción de los medios y soluciones utilizados, ver apéndice.

CÉLULAS.- Se utilizó la línea celular de macrófagos J774.2 que es una clona derivada de una línea original obtenida de un reticulosarcoma de ratones BALB/c [31,32] y donada por el Dr. Federico Goodsaid del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Las células fueron mantenidas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (MEMD) (Microlab, Mex.) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. El medio fue enriquecido con 10 % de suero fetal de ternera (In Vitro S.A., Mex.) inactivado por calor a 56°C, 30 min, 3.5 g/l de glucosa, 3.7 g/l de bicarbonato de sodio, 1 % de L-glutamina (Microlab), 100 µg/ml de estreptomina (Lakeside) y 100 U/ml de penicilina (Lakeside). La viabilidad de los macrófagos fue determinada por la técnica de exclusión con azul tripano.

Como otra fuente de macrófagos, se utilizaron células peritoneales de ratones BALB/c mantenidas en las mismas condiciones que la línea celular de macrófagos.

OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.- Ratones machos de 4 meses de edad de la cepa singénica BALB/c fueron descerebrados para proceder a la extracción de las células peritoneales. Estas fueron cosechadas por lavados sucesivos introduciendo 5 ml de solución balanceada de sales (SBS) pH 7.0 en el peritoneo del animal. Las células obtenidas se lavaron dos veces con SBS, se resuspendieron en medio de cultivo MEMD suplementado y se incubaron en botellas de cultivo (NUNC) a 37°C con 5 % de CO₂ durante 2 h, para separar las células adherentes de las no adherentes. Después de eliminar las células no adherentes, se incubaron las células adheridas o macrófagos, por 12-24 horas. Se desprendieron los macrófagos de las botellas de cultivo por agitación mecánica y se determinó la viabilidad por la técnica de azul tripano. Por último, se ajustaron a 1×10^6 células/ml de MEMD, previo a su utilización.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO.- Los microorganismos cultivados en sus respectivos medios fueron cosechados en fase logarítmica de crecimiento, por centrifugación, lavados en amortiguador salino de fosfatos (ASF) 0.2 M pH 7.2, mezclados y resuspendidos en medio de MEMD para su cuantificación en la región W de la cámara de Neubauer. Finalmente fueron ajustados a las dosis de infección, utilizando 5×10^6 células/ml de MEMD (dosis baja) y 5×10^7 células/ml de MEMD (dosis alta). Al momento de la aplicación de cada inóculo en la monocapa de macrófagos, se tomaron alícuotas para ser sembradas en los medios correspondientes y corroborar la viabilidad y morfología de cada microorganismo.

FAGOCITOSIS.- 1.- Para microscopía electrónica.- Los cultivos celulares de macrófagos J774.2 se procesaron en tubos de vidrio que contenían en su fondo plano una lenteja de vidrio de 13 mm de diámetro, sobre el cual se añadió 1 ml de una suspensión de 1×10^6 macrófagos/ml de MEMD. Se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Después se eliminaron las células no adheridas por aspiración del medio y se procedió a la infección. Se agregó a los tubos, 1 ml del inóculo del microorganismo preparado en MEMD, según las dosis mencionadas previamente, quedando una relación parásito/macrófago de 5:1 para la dosis baja y 50:1 para la dosis alta. Para sincronizar el inóculo y la adherencia del microorganismo, la infección se realizó a 4°C por 1 hora. Después de la sincronización, se lavaron los tubos para eliminar los microorganismos no adheridos y se dejó que procediera la internalización incubando a 37°C, durante diferentes tiempos: 0, 5, 15, 30, 60 min, 3 y 24 horas. Se realizaron 3 experimentos por dosis de microorganismos y de cada experimento se tomaron duplicados simultáneos para examen por microscopía de transmisión y barrido. Como testigo de no infección se procesaron macrófagos sin infectar.

2.- Para quimioluminiscencia.- Se realizaron los experimentos de quimioluminiscencia fundamentalmente en macrófagos peritoneales de ratón. Una vez obtenidas estas células, se cultivaron en viales de vidrio de 20 ml de capacidad que contenían una suspensión de 1×10^6 células/ml de MEMD suplementado. Se incubaron 2 h a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Se procedió a la fagocitosis utilizando diferentes partículas: 1) Levaduras de H. capsulatum

en relación 50:1; 2) Bacilo tuberculoso en relación 50:1; 3) Zi mosano (Sigma) 10 mg/ml de MEMD. Después de la adición de las diferentes partículas a cada monocapa de macrófagos, se procedió a la sincronización de la adherencia por 1 h a 4°C y se permitió la fagocitosis a 37°C, determinando el estallido respiratorio por quimioluminiscencia a tiempo cero (testigo) y 15 min de fagocitosis.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.- Los macrófagos adheridos a lentes de vidrio, fueron inicialmente fijados en 2 % de glutaraldehído [33] por 1 h y posteriormente con una mezcla de tetróxido de osmio al 2 % en amortiguador de cacodilatos 0.2 M pH 7.4 en proporción 1:1 por 15 minutos. La deshidratación se realizó con etanol en concentraciones crecientes de 70, 80, 90 y 100 %. En la preinclusión las muestras se pasaron a diferentes proporciones de óxido de propileno-epon, hasta epon puro. La inclusión se realizó en EPON 812 en cápsula Beem a 60 °C por 24 h [34]. Se colocó la lenteja con las células sobre una cápsula, previamente llena, hasta el borde con epon, quedando en contacto los macrófagos con la resina. Una vez polimerizada la resina a 60 °C, se separó la lenteja de la cápsula, sumergiéndola en nitrógeno líquido a -173 °C por 1 minuto. Se hicieron cortes finos contrastándolos con citrato de plomo y acetato de uranilo. Para la observación se utilizó un microscopio electrónico de transmisión ZEISS (EM-10 C) a 60 KV.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.- Los macrófagos fijados en 2 % de glutaraldehído por 1 h [33], fueron lavados en amortiguador de cacodilatos 0.1 M pH 7.4 y se deshidrataron en etanol a

diferentes concentraciones (50, 70, 80, 90 y 100 %) durante 10 minutos en cada alcohol, continuando la deshidratación en un de secador de punto crítico (Polaron) con bióxido de carbono como líquido de sustitución. Las lentes se montaron en cilindros de bronce pegándolas con pintura de plata, después se cubrieron con oro en un ionizador de oro (Polaron 11 HD) a 2.4 KV por 7 minutos [35]. Finalmente, las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido JEOL (JSM 35 C) con una ace leración de 15 KV.

QUIMIOLUMINISCENCIA.- Para esta prueba las muestras se procesaron por duplicado y la determinación de la quimioluminiscencia se llevó a cabo a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad, colocando en cada vial 1 ml de luminol (5 amino-2,3 dehidro-1,4 ftalacinediona) (Eastman Kodak Co. USA) [36]. Este reactivo se utiliza como amplificador de la respuesta de quimioluminisci encia, ya que cuando es oxidado por alguna especie reactiva de oxígeno generada durante el estallido respiratorio, produce un an ión aminoftalato excitado que al regresar a su estado basal emi te fotones. Los fotones liberados durante la reacción de quimio luminiscencia son captados por un contador de centelleo (Beckman LS-7500) que está diseñado para percibir la emisión de partícu las beta de radionucleótidos y posee además, dos tubos fotomulti plicadores que captan fotones. Las lecturas se expresan en c.p.m. a intervalos de 1 min, leyéndose la quimioluminiscencia de 1 a 9 minutos.

RESULTADOS

DESCRIPCIÓN DE LOS EVENTOS FAGOCÍTICOS.- Los resultados de los experimentos con microscopía electrónica de la fagocitosis de H. capsulatum y M. tuberculosis, mostraron diferencias en la internalización de ambos microorganismos según los distintos tiempos de fagocitosis.

MICROSCOPIA DE BARRIDO.- Este tipo de técnica permite la observación de lo ocurrido en la superficie de las células fagocíticas y por ende la identificación de la presencia del parásito fuera del fagocito.

En la infección con H. capsulatum para los tiempos de 0-5 min de fagocitosis se encontraron macrófagos con pocos pseudópodos y una cantidad variable de levaduras de Histoplasma adheridas a éstos. Esta observación fue válida tanto en la relación parásito/macrófago de 5:1 como en la de 50:1 (Fig. 1a,b). Por esta técnica no fue posible observar M. tuberculosis adherido, por lo que la ausencia de bacilos en el exterior de la célula fagocítica, desde los tiempos cortos de 0-5 min, sugiere su rápida internalización. Los resultados obtenidos en transmisión apoyan esta aseveración.

De los 15-30 min de fagocitosis, en las muestras con H. capsulatum, se encontraron muchas levaduras adheridas previo a la internalización (Fig. 2a, b) y los macrófagos se presentaban más heterogéneos en su morfología, algunos con depresiones membranales en la superficie, lo que sugiere huellas de endocitosis de la partícula fúngica (Fig. 2c). En la infección con M. tuberculosis, al igual de lo señalado anteriormente, no se observó el bacilo

fuera del fagocito, pero se encontraron un gran número de macrófagos dañados, con las dos dosis de microorganismos utilizadas; algunos macrófagos presentaban deformaciones a semejanza de perforaciones en su superficie (Fig. 3), lo que indica un proceso destructivo.

A los 60 min de infección con H. capsulatum todavía se observaron células fúngicas adheridas al macrófago (Fig. 4a). A partir de este tiempo, en las muestras infectadas con M. tuberculosis se apreciaron escasos macrófagos a causa probablemente de su muerte y consiguiente desprendimiento celular.

A las 3 h de infección con H. capsulatum, se encontraron pocas levaduras adheridas al macrófago (Fig. 4b) mientras que en el tiempo más largo de 24 h con relación 50:1, no se observaron macrófagos en ninguna de las preparaciones. Por el contrario, en las muestras de la relación 5:1 se encontraron muchos fagocitos con campos libres de levaduras, observándose que estos macrófagos volvieron a adoptar su morfología original y una mayor homogeneidad en su superficie (Fig. 4c).

MICROSCOPÍA DE TRANSMISIÓN.— Esta técnica, a diferencia de la de barrido, permite la observación del parásito intracelularmente, así como de las estructuras celulares características tanto de la célula huésped como del parásito. Además, proporciona información sobre los diferentes pasos del proceso fagocítico.

Los resultados obtenidos por transmisión revelaron que, en la fagocitosis de 0-5 min con H. capsulatum no se observaron levaduras intramacrofágicas, mientras que para M. tuberculosis, el parásito fue internalizado durante este tiempo, presentándose seccionado en diferentes planos en el interior de varios fagosomas

(Fig. 5). En la fagocitosis de 15-30 min con H. capsulatum, utilizando las diferentes dosis, fue posible identificar levaduras adheridas (Fig. 6a), así como dentro del macrófago en las proximidades de la membrana macrofágica, además de una actividad aumentada del macrófago, representada por mayor presencia de pseudópodos (Fig. 6b). En la fagocitosis de M. tuberculosis se observó un mayor número de pseudópodos, presentándose el microorganismo dentro de vesículas fagocíticas (Fig. 7).

Para H. capsulatum, a los 60 min, se encontraron más levaduras dentro del citoplasma del macrófago, ubicadas en diferentes fagosomas, continuando la actividad macrofágica (Fig. 8), mientras que para M. tuberculosis en la mayoría de los experimentos no se obtuvieron muestras suficientes a partir de este tiempo, debido a que los macrófagos se desprendieron por posible muerte celular.

En los tiempos largos de 3 y 24 h de fagocitosis de H. capsulatum con la relación 50:1 no se encontraron macrófagos, mientras que en las preparaciones que contenían la relación 5:1, los macrófagos, se presentaron en número inferior al que se había observado para el mismo tiempo con la técnica de barrido. Por el contrario, los testigos de macrófagos no infectados permanecieron unidos a las lentejas cuando fueron sometidos a los dos tipos de tratamiento para microscopía electrónica.

QUIMIOLUMINISCENCIA.- Como una medida cuantificable de evidencia de internalización de los microorganismos estudiados se procedió a la utilización de la técnica de quimioluminiscencia, la cual es un método sensible que puede revelar la presencia de microorganismos

mos internalizados por la inducción del disparo del mecanismo oxidativo del fagocito, el cual lleva a la producción de luz. Inicialmente se utilizaron macrófagos de la línea celular J774.2, empleada en los experimentos de microscopía electrónica. Sin embargo, en los ensayos preliminares de quimioluminiscencia no se observaron evidencias de estallido respiratorio con ninguno de los microorganismos empleados; incluso con las partículas de zimomoso, razón por la que recurrimos a la utilización de otro tipo de célula fagocítica.

Los resultados con esta metodología al utilizar macrófagos peritoneales de ratones normales, se pueden apreciar en la figura 9A, donde se muestra la ausencia de emisión de fotones después de 15 min de fagocitosis de levaduras de H. capsulatum, comportándose estos macrófagos de modo similar a macrófagos no infectados, los cuales fueron utilizados como testigos de no estimulación del estallido respiratorio. Por otro lado, M. tuberculosis produjo una estimulación del mecanismo oxidativo a los 7 min, con una c.p.m. de 50×10^3 , siendo que el zimomoso que funciona como testigo positivo de estimulación, dio en casi todos los tiempos lecturas superiores a 20×10^3 c.p.m. La figura 9B muestra los eventos al tiempo cero de fagocitosis; como la inducción de la internalización es dependiente de la temperatura a 37°C , este tiempo fue procesado como un testigo de internalización no inducida.

Se observó que en condiciones no favorables de internalización, los macrófagos normales, así como los macrófagos infectados con Histoplasma se comportaron de manera similar. No así los macrófagos infectados con M. tuberculosis que fueron capaces de disparar el estallido respiratorio en los diferentes tiempos, para el

canzando lecturas de hasta 40×10^3 c.p.m. y dando valores superiores al testigo positivo de zimosano.

DISCUSIÓN

En general, los estudios de fagocitosis de la célula fúngica, dejan al azar la posibilidad de contacto de la partícula fúngica con la célula fagocítica.

Como el presente trabajo estaba orientado a establecer la cinética de internalización, fue necesario inicialmente uniformar la etapa de adherencia de los microorganismos a ser fagocitados y, consecuentemente, el inóculo. Se procedió a la sincronización de la adherencia de los microorganismos a 4°C por 1 h, antes de la inducción de la internalización a 37°C, para garantizar que en la mayoría de los macrófagos se encontraran adheridos un número homogéneo de microorganismos, minimizando así los posibles errores derivados de una adherencia al azar.

En un trabajo previo utilizando macrófagos peritoneales de ratón [30], se obtuvieron evidencias que sugieren un retardo en la internalización de levaduras de H. capsulatum con respecto a lo observado con M. tuberculosis. Sin embargo, el uso de una línea celular de macrófagos, constituida por una población más homogénea de células fagocíticas mantenidas por largo tiempo in vitro, permitió establecer con mayor precisión que el retardo en la internalización del hongo es un hecho real y no un producto de las diferencias de activación de la población macrofágica, cuando la fuente de células fagocíticas proviene directamente de un animal que puede estar sujeto a una amplia gama de estímulos. La línea celular J774.2, obtenida de un reticulosarcoma de ratón, para pesar a de tener un alto grado de homogeneidad, guarda al mismo tiempo

cierta heterogeneidad morfológica y posiblemente funcional, a causa de variaciones en el tamaño de los macrófagos y por el hecho de que algunas células no ejercen la función fagocítica. No obstante lo anterior, los resultados obtenidos al utilizar los macrófagos de la línea celular J774.2, no fueron diferentes a los obtenidos con macrófagos peritoneales de ratón [30], confirmando que existe un retardo en la internalización de levaduras de Histoplasma.

Wu-Hsieh y Howard [25] describieron que las células levaduriformes liberadas de macrófagos activados después de 20.5 y 44.5 h de residencia intramacrofágica, germinaron igual que las células liberadas de macrófagos normales. Esto indica que el hongo puede sobrevivir dentro de los fagocitos. Esta capacidad está en relación con el número de microorganismos y el número de macrófagos utilizados. La determinación del índice fagocítico [30], señala que una relación levadura/macrófago de 5:1 (5×10^6 levaduras/ 1×10^6 macrófagos), constituye una dosis resolutive de la infección in vitro y muchos macrófagos se encuentran íntegros a las 24 horas. Mientras que, por lo contrario, la relación 50:1 (5×10^7 levaduras/ 1×10^6 macrófagos) corresponde a una dosis no resolutive de la infección. Esto podría explicar el hecho de que no se encontraran macrófagos a la observación tanto por microscopía de barrido como de transmisión en las muestras de 24 h de fagocitosis, debido a que fueron dañados por el hongo y desprendidos de la lenteja a consecuencia de su muerte.

La adherencia de levaduras de Histoplasma se ve ilustrada

en diferentes figuras (Fig. 1a, 1b, 2a, 2b) mientras que la adherencia y fagocitosis de M.tuberculosis no fue perceptible por microscopía de barrido, aún en tiempo de 15-30 min. de fagocitosis, observándose únicamente macrófagos alterados que presentaban múltiples perforaciones (Fig. 3). Estos resultados sugieren que M.tuberculosis causa un daño más intenso y rápido a la célula fagocítica y su presencia en el interior de los macrófagos, se determinó por microscopía de transmisión desde los 5 min de fagocitosis (Fig. 5). El hecho de que se encuentren levaduras de Histoplasma adheridas a la superficie de macrófagos aún a los 60 min. (Fig. 4a) a pesar de la sincronización, apoya la aseveración de que el hongo entra tardíamente a la célula fagocítica. Después de 3 h de fagocitosis, posiblemente se culmina el proceso de internalización y se define el destino del hongo intramacrófagicamente, ya que no existe hongo fuera de la célula fagocítica.

Por lo anterior, se sugiere que las levaduras de H.capsulatum, a diferencia del bacilo tuberculoso, llevan a cabo su internalización en un período aproximado de 15 a 30 min, e incluso de hasta 60 min, y que este mecanismo es independiente de la cantidad de levaduras utilizadas, puesto que la cinética de internalización de H.capsulatum fue similar en ambas relaciones de parásito/macrófago empleadas. Sin embargo, las dosis marcan diferencias en cuanto al destino del hongo una vez internalizado, ya que la relación 5:1 permite a algunos macrófagos resolver la infección, no así la relación 50:1.

Para confirmar los eventos observados por microscopía elec-

trónica, se procedió a la utilización de una técnica que permitiera evidenciar la presencia del microorganismo dentro del fagocito a través de un evento cuantificable. Para esto, se llevó a cabo la medición de los mecanismos oxidativos disparados por la presencia del microorganismo intrafagocíticamente. Entre las metodologías existentes para determinar los mecanismos oxidativos, se eligió la quimioluminiscencia por ser la más sensible y disponer de los elementos necesarios para llevar a cabo su elaboración. Inicialmente se empleó en estos experimentos la línea celular J774.2, sin embargo los resultados preliminares no mostraron estallido respiratorio, hecho que fue respaldado por el comportamiento de una línea celular relacionada, la J774.1, la cual fue descrita como deficiente en el estallido respiratorio [37]. Por tal motivo, para la determinación de quimioluminiscencia fue necesario cambiar la célula fagocítica utilizando macrófagos peritoneales de ratón, de los cuales ya existían antecedentes sobre el tiempo de internalización por microscopía electrónica [30].

Los resultados demostraron que H.capsulatum no fue capaz de estimular el estallido respiratorio aún a los 15 min de fagocitosis, tiempo ideal escogido para determinar el estallido con base en los resultados de microscopía electrónica, que sugerían una internalización entre los 15 y 30 minutos.

Considerando que los testigos de zimosano dieron respuesta positiva y que M.tuberculosis produjo una respuesta oxidativa por parte del fagocito, hecho por demás conocido [38], nos encontramos frente a la disyuntiva, o bien H.capsulatum no induce el estallido respiratorio y utiliza esto como un posible mecanismo

mo de escape a la muerte intramacrofágica, o bien H.capsulatum no es internalizado en cantidad suficiente para producir el estallido oxidativo a los 15 minutos. Durante la realización de nuestros experimentos se publicó la información obtenida por Wolf et al. [39], de que efectivamente H.capsulatum inhibe el estallido respiratorio e incluso es capaz de suprimir la respuesta al zimosano en macrófagos preincubados con el hongo. Estos resultados sugieren que la quimioluminiscencia no es una técnica indicada para determinar la internalización de H.capsulatum, razón por la cual no se justificaba proseguir la determinación de quimioluminiscencia en tiempos más largos de fagocitosis.

Esta característica de inhibir el estallido respiratorio no es exclusivo de Histoplasma, puesto que mecanismos similares se han descrito para Mycobacterium leprae [40] y Toxoplasma gandii [41].

Cabe mencionar que el estallido respiratorio no sólo se da por la internalización de partículas o microorganismos que son capaces de estimular el mecanismo oxidativo, en ocasiones basta la unión de un ligando-receptor para que se dispare el estallido respiratorio [42]. Tal es el caso cuando las partículas son opsonizadas con IgGs induciendo la participación de receptores Fc (FcγR) [40]. Aunque se sabe que no todos los receptores participan en este evento, por ejemplo, los receptores C₃b y C₃bi promueven la fagocitosis, pero no la liberación de productos tóxicos de oxígeno [16, 43]. Por lo tanto, en la metodología de quimioluminiscencia se tuvo el cuidado de no utilizar microorganismos opsonizados para evitar el disparo del estallido

respiratorio previo a la internalización del microorganismo.

En vista de que la quimioluminiscencia no fue una técnica útil para corroborar el evento de internalización, en la actualidad en nuestro laboratorio se busca implementar otras metodologías que apoyen, con datos cuantitativos, a las observaciones de la fagocitosis de Histoplasma por microscopía electrónica. En ese sentido, en un trabajo realizado utilizando el marcaje de membranas del fagocito con ^{125}I por la técnica de lactoperoxidasa/glucosa oxidasa y dirigido a estudiar la participación de receptores Fc en la fagocitosis de Histoplasma, se encontró que la opsonización de levaduras del hongo con IgG anti-Histoplasma no aceleraba la internalización del hongo y que ésta se realizaba en el tiempo ya señalado de 15 min de fagocitosis (44).

Aunque no podemos extrapolar nuestros resultados al fenómeno fagocítico ocurrido in vivo, éstos aportan algunas evidencias al conocimiento del binomio macrófago/hongo, así como diferencias comparativas con otros parásitos intracelulares. Para corroborar nuestras observaciones, planteamos la necesidad de utilizar métodos cuantitativos, tales como el marcaje con radioisótopos, con el objeto de establecer un mejor conocimiento sobre la fagocitosis y cinética del tiempo de internalización de H. capsulatum.

CONCLUSIONES

- I. Las levaduras de Histoplasma capsulatum llevan a cabo su endocitosis (internalización) en un período comprendido entre 15 y 30 min, a diferencia de Mycobacterium tuberculosis.
- II. La internalización de H. capsulatum es similar independientemente de la dosis utilizada (5×10^6 , 5×10^7 levaduras/ml).
- III. Con la dosis baja resolutive los macrófagos son capaces de resolver la infección mientras que no lo hacen con la dosis alta.
- IV. Se comprueba que H. capsulatum es capaz de inhibir el estado respiratorio en macrófagos.

ABSTRACT

Phagocytosis kinetics of Histoplasma capsulatum yeasts was studied in murine macrophages by synchronizing the yeast inocula and internalization, at 4°C for 1 h during the adherence phase, to allow a better contact of phagocytes with the yeast cells. To determine the yeasts internalization time by macrophage, phagocytosis was realized at 37°C with different times of incubation: 0, 5, 15, 30, 60 min, 3 y 24 h. Phagocytosis was monitored in a macrophage cell line (J774.2) by transmission and scanning electron microscopy and in BALB/c mice peritoneal macrophages by chemiluminescence for oxidative mechanisms determination. Mycobacterium tuberculosis was used as a reference microorganism.

Results showed that Histoplasma yeast phagocytosis was delayed in contrast with tubercle bacilli and J774.2 macrophages internalized yeast cells in approximately 15-30 minutes. Although H. capsulatum was observed in an increased number inside the macrophages only after 15 min of phagocytosis, M. tuberculosis was detected earlier (0-5 min). Furthermore, adhered yeast were still observed at 60 min, whereas M. tuberculosis infected macrophages developed damage and death.

These results support internalization differences between the two microorganisms studied.

The chemiluminescence technique used was not appropriate in measuring Histoplasma internalization time, since H. capsulatum inhibits the respiratory burst, while zymosan and M. tuberculosis controls induce the macrophage oxidative burst.

REFERENCIAS

- 1.- EMMONS, C.W.; C.H. BINFORD; J.P. UTZ & K.J. KWON-CHUNG. 1977. Histoplasmosis, In: LEA & FEBIGER, Medical Mycology. 3rd. ed. p. 305-341. Philadelphia.
- 2.- RIPPON, J.W. 1974. Histoplasmosis, In: SAUNDERS, W.S., Medical Mycology. p. 321-347. Philadelphia.
- 3.- VELASCO CASTREJON, O. & A. GONZALEZ OCHOA. 1977. Primary epidemic histoplasmosis in an abandoned mine. Mykosen 20:393-399.
- 4.- VELASCO CASTREJON, O. & A. FUJIGAKI. 1984. Importancia de la histoplasmosis pulmonar primaria en trabajadores de minas. Neumol. Cir. Tórax 44: 7-9.
- 5.- VELASCO CASTREJON, O. & J. TAY ZAVALA. 1978. Histoplasmosis, En: Introducción a la Micología Médica. p. 141. Francisco Mendez Cervantes; México.D.F.
- 6.- TAYLOR, M.L.; B. RICO GALINDO & M.E. LEON ISLAS. 1987. Conocimiento actual de la fagocitosis de Histoplasma capsulatum. Rev. Fac. Med. UNAM 30: 51-56.
- 7.- TAYLOR, M.L.; M.E. ESPINOSA-SCHOELLY; R. ITURBE; B. RICO; J. CASASOLA & F. GOODSID. 1988. Evaluation of phagolysosome fusion in acridine orange stained macrophages infected with Histoplasma capsulatum. Clinical Experimental Immunology. En prensa.

- 8.- DUMMONT, A. & A. ROBERT. 1970. Electron microscopic study of phagocytosis of Histoplasma capsulatum by hamster peritoneal macrophages. Laboratory Invest. 23: 278-286.
- 9.- ALBERTS, B.; D. BRAY; J. LEWIS; M. RAFF; K. ROBERTS & J.D. WATSON. 1983. Membrane transport of macromolecules and particles: Exocytosis and Endocytosis, In: Molecular Biology of the cell. p. 302-314. Garland Publishing Inc. New York.
- 10.- STEINMAN, R.M. & Z.A. COHN. 1974. The metabolism and physiology of the mononuclear phagocytes, In: B.W ZWEIFACH; L. GRANT; R.T. MC OUSTEY, The Inflammatory Process. 2nd. ed. p. 449-510. Academic Press. New York.
- 11.- AGGELER, J. & Z. WERB. 1984. Ultrastructural aspects of phagocytosis by macrophages, In: G. WEISSMANN, Advance in Inflammation Research. p. 35-54. Raven Press. New York.
- 12.- McNEIL, P.L.; L. TANASUGARN; J.B. MEIGS & D.L. TAYLOR. 1983. Acidification of phagosomes is initiated before lysosomal enzyme activity is detected. J. Cell. Biol. 97: 692-702.
- 13.- KLEBANOFF, S.J. 1984. Cytocidal mechanisms of phagocytic cells, In: M. FOUGEREAU & L. DAUSSET, Fourth International Congress of Immunology 80. Progress in Immunology IV. p. 720-736. Academic Press. New York.
- 14.- BABIOR, B.M. 1984. The respiratory burst of phagocytes. J. Clin. Invest. 73: 599-601.

- 15.- SKANENE, E. & P. GROS. 1983. Role of macrophages in resistance against infectious diseases, In: R.B. HERBERMAN, Clinics in Immunology and Allergy.p. 539-560. Philadelphia.
- 16.- YAMAMOTO, K. & R.B. JOHNSTON. 1984. Dissociation of phagocytosis from stimulation of oxidative metabolic burst in macrophages. J. Exp. Med. 159: 405-416.
- 17.- DENSEN, P. & G.L. MANDELL. 1980. Phagocytes strategy vs. Microbial tactic. Serie Feature. Rev. Infect. Dis. 2: 817-838.
- 18.- VON BEHREN, L.A.; S. RABINOVICH & R.P. TEWARI. 1985. Evaluation of phagosome-lysosome fusion in mouse peritoneal macrophages after exposure to yeast cells of Histoplasma capsulatum. Abstract 9th International Congress of ISHAM, p. R. 10-4. Atlanta, Georgia, USA.
- 19.- PATIÑO, M.M.; J.T. HANSEN & J.R. GRAYBILL. 1986. Immunocytochemical staining of Histoplasma capsulatum at the electron microscopic level. Mycopathologia 94: 157-161.
- 20.- CALDERONE, R.A. & E.M. PETERSON. 1979. Inhibition of amino-acid uptake and incorporation into Histoplasma capsulatum by lysosomal extract from rabbit alveolar macrophage. J. Reticuloendothel. Soc. 26: 11-19.
- 21.- HOWARD, D.H.; V. OTTO & R.T. GUPTA. 1971. Lymphocyte mediated cellular immunity in histoplasmosis. Infect. Immun. 4: 605-610.

- 22.- HOWARD, D.H. & V. OTTO. 1977. Experiments on lymphocyte mediated cellular immunity in murine histoplasmosis. Infect. Immun. 16: 226-231.
- 23.- WU-HSIEH, B. & D.H. HOWARD. 1984. Inhibition of growth of Histoplasma capsulatum by lymphokine-stimulated macrophages. J. Immunol. 132: 2593-2597.
- 24.- WU-HSIEH, B.; A. ZLOTNIK & D.H. HOWARD. 1984. T-cell hybridoma-produced lymphokine that activates macrophages to suppress intracellular growth of Histoplasma capsulatum. Infect. Immun. 43: 380-385.
- 25.- WU-HSIEH, B. & D.H. HOWARD. 1986. Inhibition of the intracellular growth of Histoplasma capsulatum by recombinant murine gamma interferon. Infect. Immun. 55: 1014-1016.
- 26.- WILLIAMS, D.M.; J.R. GRAYBILL & D.J. DRUTZ. 1978. Histoplasma capsulatum infection in nude mice. Infect. Immun. 21: 973-977.
- 27.- BERRY, C.L. 1969. The production of disseminated histoplasmosis in the mouse: The effect of changes in reticuloendothelial function. J. Pathol. 97: 441-452.
- 28.- GOODWIN, R.A. & R.M. DES PREZ. 1978. Histoplasmosis. Am. Rev. Respir. Dis. 117: 929-956.
- 29.- KIMBERLIN, C.L.; A.R. HARRI; H.O: HEMPEL & 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.

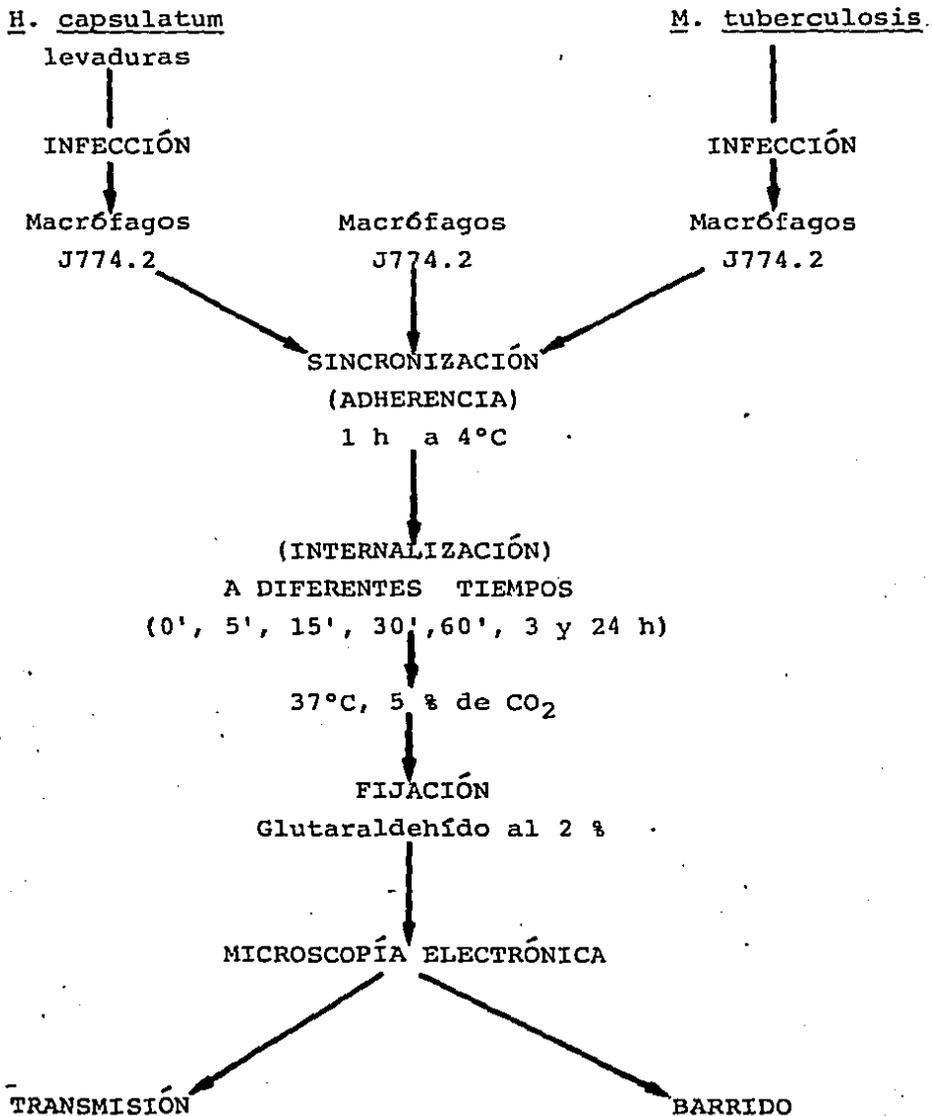
- 30.- TAYLOR, M.L.; B. RICO GALINDO; M.T. BENITEZ; G. DIAZ SANCHEZ; A.M. CASTRO; G. POLITO ALARCON & C. TORIELLO. 1984. Infección in vitro de Histoplasma capsulatum en macrófagos peritoneales de ratón. Bol. Soc. Mex. Mic. 19: 327-342.
- 31.- RALPH, P.; J. PRICHARD & M. COHN. 1975. Reticulum cell sarcoma: An effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. J. Immunol. 114: 898-905.
- 32.- RALPH, P. & I. NAKOINZ. 1975. Phagocytosis and cytotoxicity by a macrophage tumor and its cloned cell line. Nature 257: 393-394.
- 33.- SABATINI, D.F.; K. BENSCH & R.J. BARNETT. 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. J. Cell. Biol. 17: 19-58.
- 34.- LUFT, J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 409-414.
- 35.- DOMAGALA, W.; A.V. KAHAN & L.G. KOSS. 1979. A simple method of preparation and identification of cells for scanning electron microscopy. Acta. Cytol. 23: 140-146.
- 36.- SELVARAJ, R.J.; A.J. SBARRA; G.B. THOMAS; C.L. CETRULO & G.W. MITCHELL. 1982. A microtechnique for studying the chemiluminescence response of phagocytes using whole blood and its application to the evaluation of phagocytes in pregnancy. J. Reticuloendothel. Soc. 31: 3-16.

- 37.- TANAKA, Y.; H. TANOWITZ & B.R. BLOOM. 1983. Growth of Trypanosoma cruzi in a cloned macrophage cell line and in a variant defective in oxygen metabolism. Infect. Immun. 41: 1322-1331.
- 38.- MAY, M.E. & P.J. SPAGNUOLO. 1987. Evidence for activation of a respiratory burst in the interaction of human neutrophils with Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun. 55: 2304-2307.
- 39.- WOLF, J.E.; V. KERCHBERGER; G.S. KOBAYASHI & J.R. LITTLE. 1987. Modulation of the macrophage oxidative burst by Histoplasma capsulatum. J. Immunol. 138: 582-586.
- 40.- HOLZER, T.J.; K.E. NELSON; V. SCHANF; R.G. CRISPEN & B.R. ANDERSON. 1986. Mycobacterium leprae fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation. Infect. Immun. 51: 514-520.
- 41.- WILSON, C.B.; V. ISAI & J.S. REMINGTON. 1980. Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages. J. Exp. Med. 151: 328-346.
- 42.- JOHNSTON, R.B.; J.E. LEHMEYER & L.A. GUTHRIE. 1976. Generation of superoxide anion and chemiluminescence by human monocytes during phagocytosis and on contact with surface-bound immunoglobulin G. J. Exp. Med. 143: 1551-1556.
- 43.- WRIGTH, S.D. & S.C. SILVERSTEIN. 1983. Receptors for C₃b and C₃bi promote phagocytosis but not release of toxic oxygen from human phagocytes. J. Exp. Med. 158: 405-416.

- 44.- RICO GALINDO, B. 1987. Fagocitosis de Histoplasma capsulatum: papel de los receptores membranales de macrófagos en el proceso fagocítico. Tesis para obtener el grado de: Maestra en Ciencias Biomédicas (Inmunología). Div. Est. Posgrado. Fac. Medicina, UNAM. México, D.F.

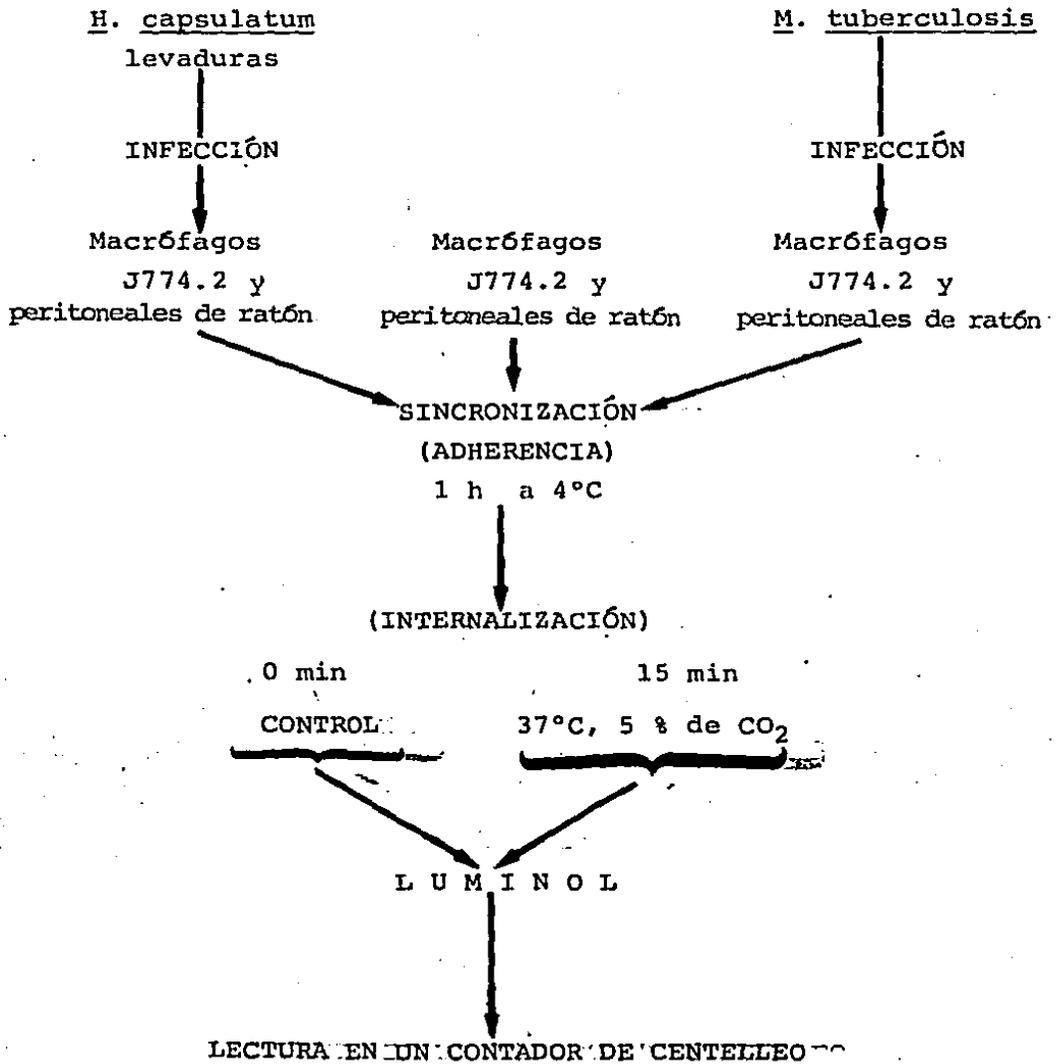
FAGOCITOSIS DE Histoplasma capsulatum POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

DISEÑO EXPERIMENTAL



FAGOCITOSIS DE Histoplasma capsulatum POR LA TÉCNICA DE QUIMIOLUMINISCENCIA

DISEÑO EXPERIMENTAL



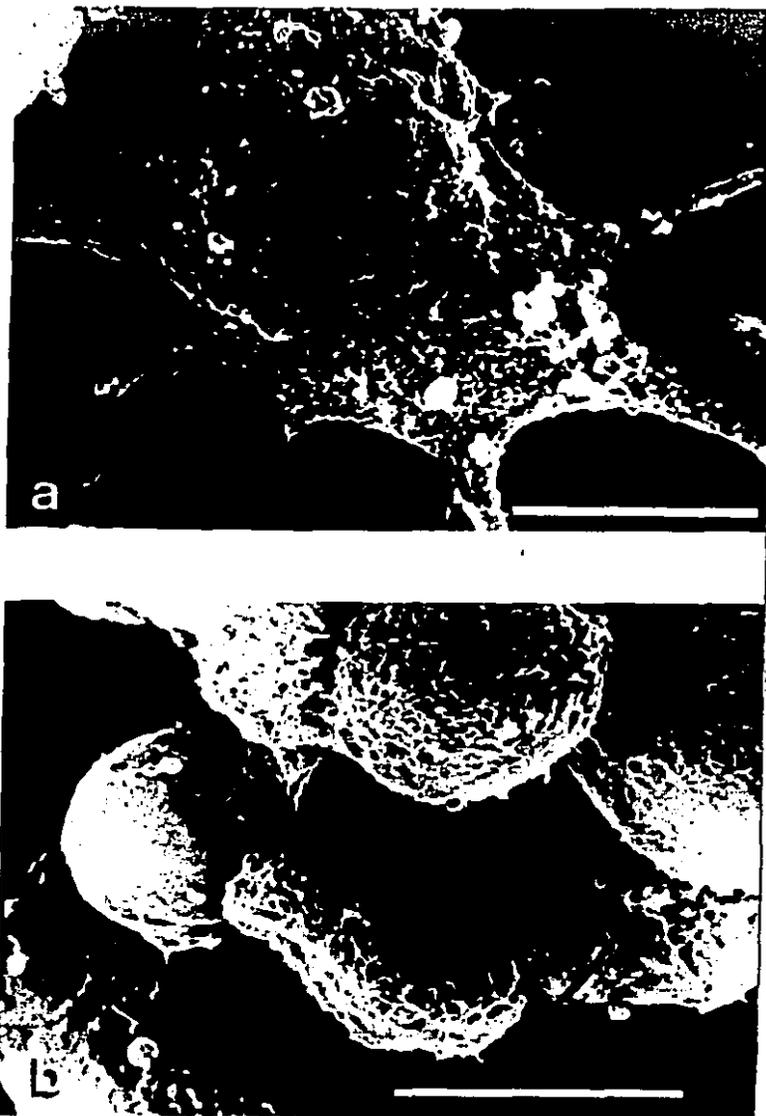


Fig. 1. Microscopía de barrido de la fagocitosis de levaduras de *H. capsulatum*. Tiempo de fagocitosis de 0-5 min, utilizando macrófagos J774.2 con diferentes dosis de levaduras. a) Relación parásito/macrófago 50:1; b) Relación parásito/macrófago 5:1. Las flechas indican levaduras adheridas. Barra = 10 μ m.

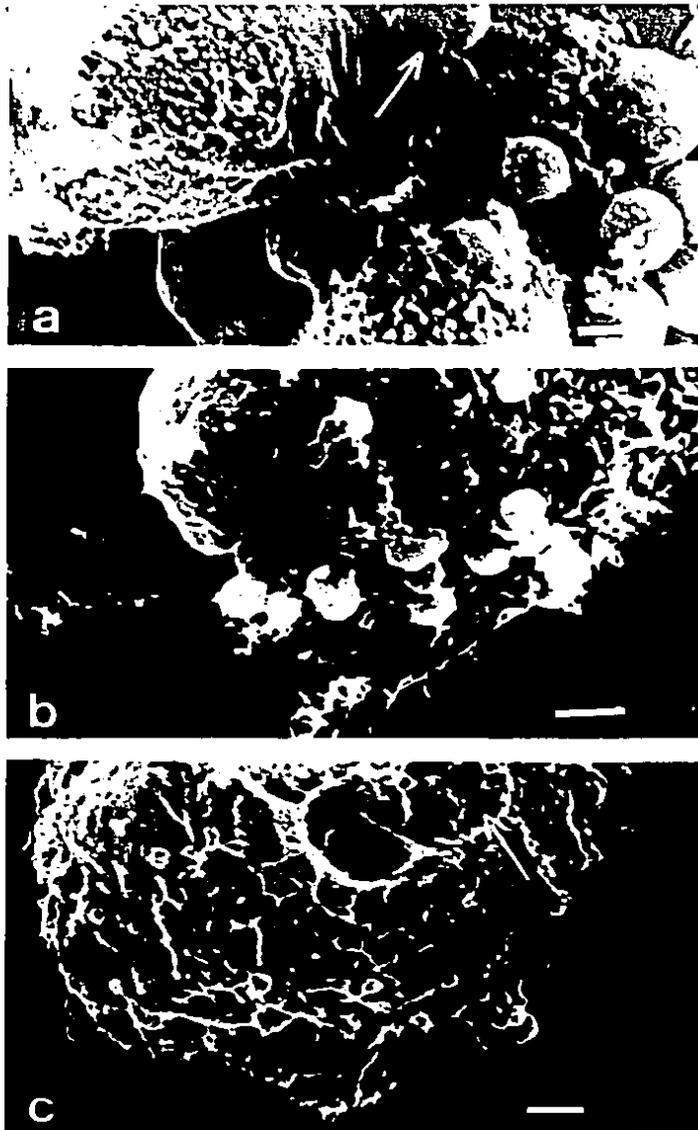


Fig. 2. Microscopía de barrido a los 15 min de fagocitosis de *H. capsulatum*. Se utilizaron macrófagos J774.2. a) Relación 50:1; b) Relación 5:1; c) Macrófagos presentando huellas de endocitosis (internalización). Las flechas indican levaduras con gemación en la figura (a), así como huellas de endocitosis en la figura (c). Barra = 1 μ m.

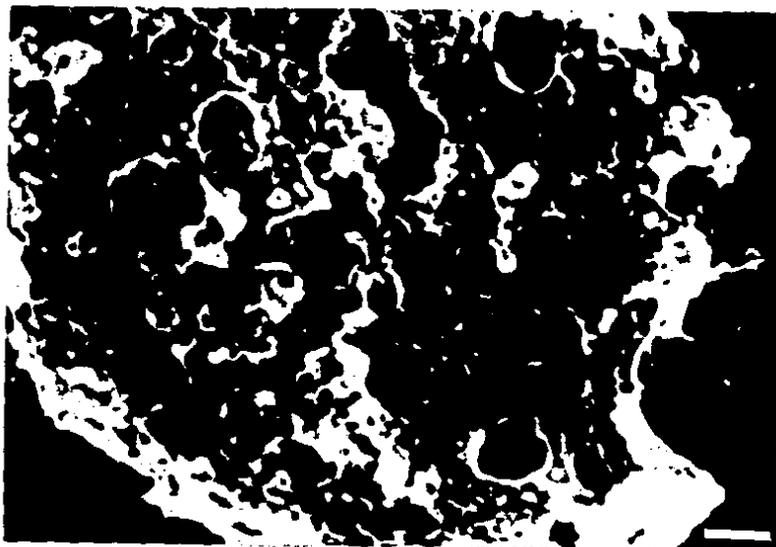


Fig. 3. Microscopía de barrido de la fagocitosis de M. tuberculosis. Tiempo de fagocitosis de 15 min utilizando macrófagos J774.2, relación parásito/macrófago de 5:1. Se observa un macrófago destruido presentando en su superficie alteraciones semejantes a perforaciones. Barra = 1µm.

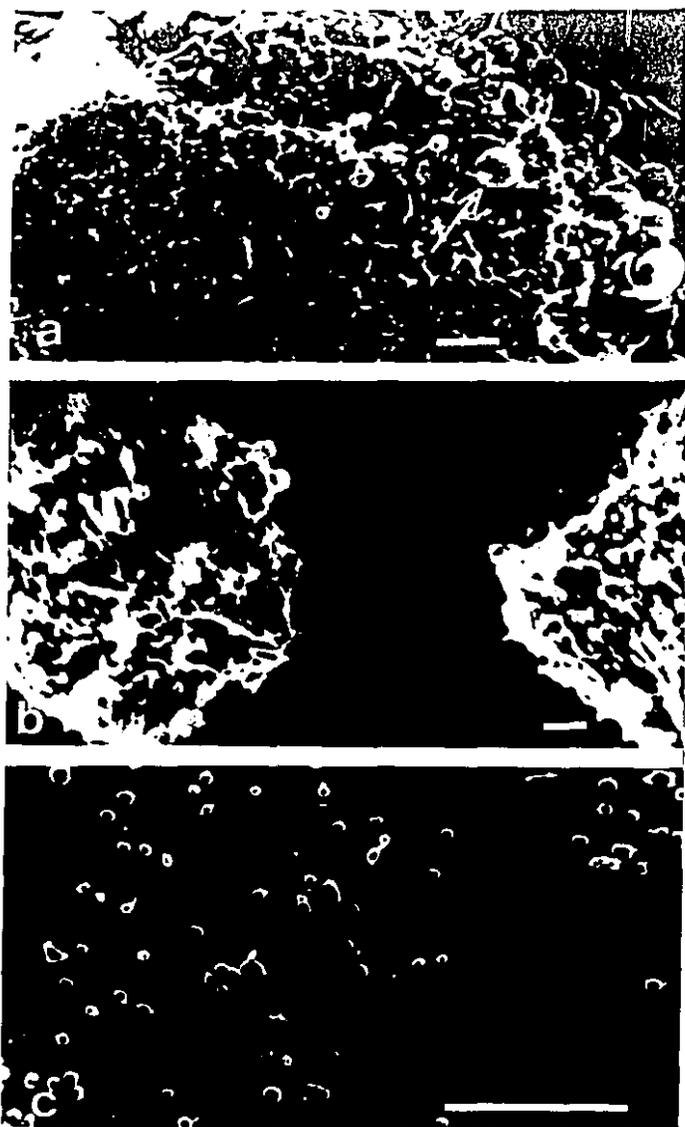


Fig. 4. Microscopía de barrido en tiempos largos de la fagocitosis de *H. capsulatum* por macrófagos J774.2. a) 60 min de fagocitosis; relación 50:1, barra = 1 μ m; b) 3 h de fagocitosis, relación 5:1, barra = 1 μ m; c) 24 h de fagocitosis, relación 5:1, barra = 100 μ m. Las flechas indican levaduras adheridas.

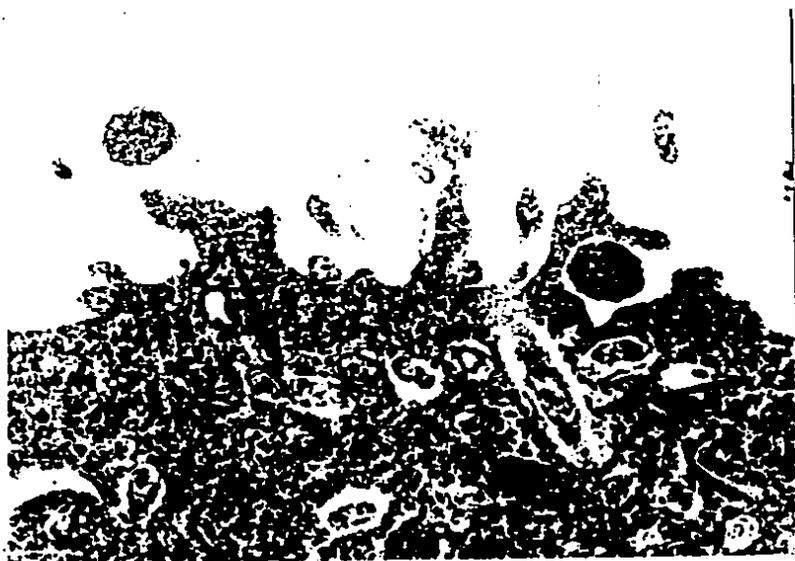


Fig. 5. Microscopía de transmisión de la fagocitosis de *M. tuberculosis*. Tiempo de fagocitosis de 0-5 min utilizando macrofagos J774.2 y una relación de parásito/macrófago de 5:1 (30000X). Las flechas indican la presencia de parásitos intracelularmente.



Fig. 6. Microscopía de transmisión de la fagocitosis de *H. capsulatum* por macrófagos J774.2. Se utilizó una relación de parásito/macrófago 50:1. a) 15 min de fagocitosis (21250X); b) 30 min de fagocitosis (36000X).

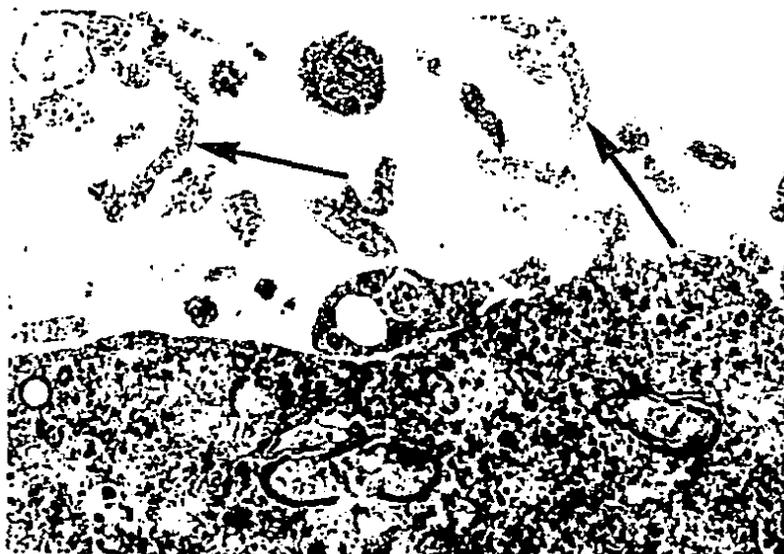


Fig. 7. Microscopía de transmisión a los 15 min de fagocitosis de *M. tuberculosis*. Se utilizaron macrófagos J774.2 y una relación parásito/macrófago 5:1 (26 000X). Las flechas indican pseudópodos en diferentes planos.



Fig. 8. Microscopía de transmisión a los 60 min de fagocitosis de *H. capsulatum*. Se utilizaron macrófagos J774.2 y una relación parásito/macrófago 50:1 (21 280X).

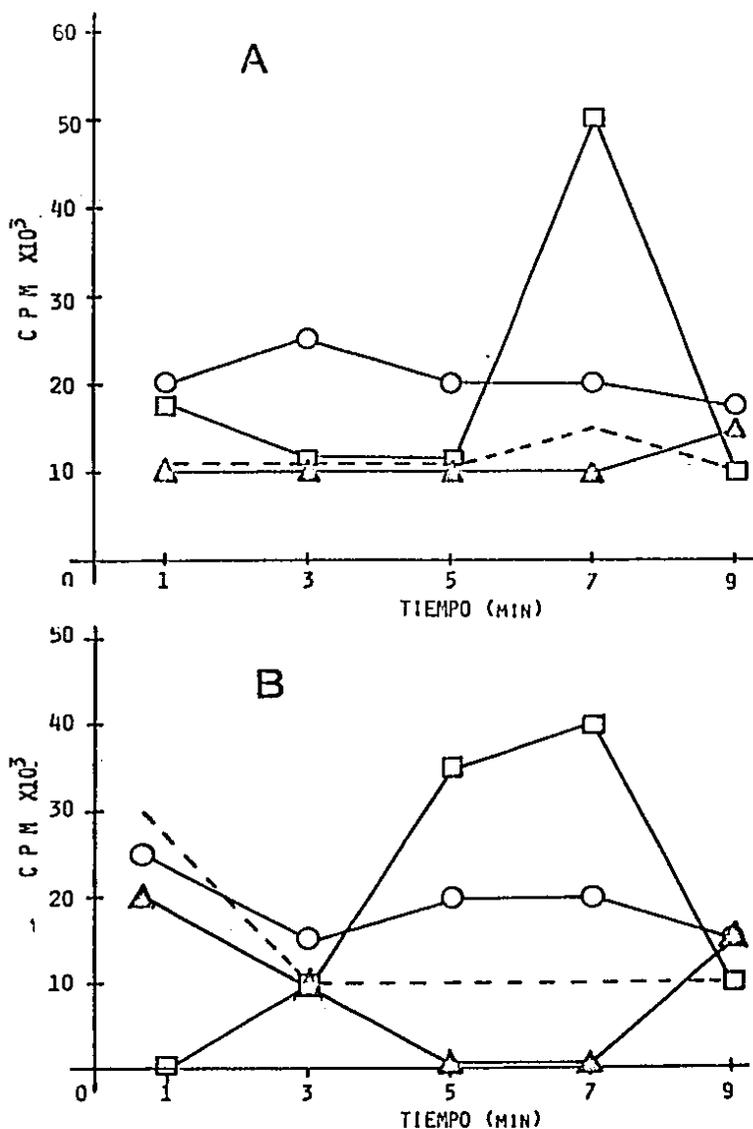


Fig. 9. Determinación de la quimioluminiscencia en macrófagos peritoneales de ratón. Se utilizó luminol como amplificador de emisión de fotones y las lecturas se obtuvieron en un contador de centelleo (ver materiales y métodos). A) Fagocitosis con 15 min de incubación a 37°C, 5% de CO₂. ○—○—○ zimosano (10 mg/ml), — — — — — macrófagos (1x10⁶ cels/ml) sin estimular, □—□—□ macrófagos infectados con *M. tuberculosis* en relación 50:1, ▲—▲—▲ macrófagos infectados con *H. capsulatum* en relación 50:1. B) Testigo de cero min de incubación, ○—○—○ zimosano (10mg/ml), — — — — — macrófagos (1x10⁶ cels/ml) sin estimular, □—□—□ macrófagos infectados con *M. tuberculosis* en relación 50:1, ▲—▲—▲ macrófagos infectados con *H. capsulatum* en relación 50:1.

APÉNDICE

MEDIOS Y SOLUCIONES

MEDIOS DE CULTIVOBHI (Infusión cerebro-corazón).

BHI (Bioxón, Mex.)..... 37 g
 Agua destilada..... 950 ml

Se hidrata el medio y se esteriliza a 15 lb de presión durante 20 minutos. Posteriormente se suplementa con:

Hidrocloreuro de L-cisteína..... 1 g
 Glucosa..... 10 g
 Gentamicina (Scheramex)..... 100 µg/ml
 Agua destilada..... 50 ml
 Esterilizar por filtración con membrana Millipore de 0.22 µm.

MEMD (Medio de Eagle modificado por Dulbecco).

MEMD (Microlab)..... 13.4 g
 Bicarbonato de sodio..... 3.7 g
 Glucosa..... 3.5 g
 L-glutamina..... 10 g
 Agua destilada..... 1000 ml
 Penicilina (Lakeside)..... 100 U/ml
 Estreptomocina (Lakeside)..... 50-100 µg/ml

Una vez hidratado y suplementado el medio se ajusta a pH 7.0 y se esteriliza por filtración con membrana Millipore de 0.22 µm. Antes de ser usado, se agrega 10% de suero fetal de ternera estéril, previamente inactivado por calor a 56°C durante 30 minutos.

**ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA**

PBY (Medio de cultivo Proskawer-Beck modificado por Youmans).

Asparagina.....	5 g
Fosfato monopotásico.....	5 g
Sulfato de potasio.....	0.5g
Glicerol.....	50 ml
Cloruro de magnesio.....	0.197g
Agua destilada.....	1000ml

Se hidrata el medio y se ajusta a pH 7.0. Se agrega el siguiente reactivo.

Citrato de sodio.....	0.68g
-----------------------	-------

Se esteriliza a 10 lb de presión por 10 minutos.

SOLUCIONESSBS (Solución balanceada de sales).Solución I

Dextrosa.....	10.0g
Fosfato de potasio monobásico anhidro.....	0.66g
Fosfato de sodio dibásico anhidro.....	0.925g
Rojo de fenol al. 5% en agua.....	2 ml
Agua destilada.....	1000 ml

Solución II

Cloruro de calcio anhidro.....	1.45g
Cloruro de potasio.....	4 g
Cloruro de sodio.....	80 g
Cloruro de magnesio anhidro.....	1.04g

Sulfato de magnesio $7H_2O$ 2 g
 Agua destilada..... 1000 ml

Mezcla (SBS).

Solución I..... 100 ml
 Solución II..... 100 ml
 Agua destilada..... 800 ml

Se ajusta a pH 7.0 y se esteriliza por filtración con membrana Millipore de 0.22 μm .

ASF (Amortiguador salino de fosfatos 0.2M, pH 7.2).

Cloruro de sodio..... 8 g
 Cloruro de potasio..... 0.2g
 Fosfato de sodio dibásico anhidro..... 0.95g
 Fosfato ácido de potasio anhidro..... 0.2g
 Agua destilada..... 1000ml

Se ajusta el pH y se esteriliza a 15 lb de presión por 20 minutos.

SSI (Solución salina isotónica):

Cloruro de sodio..... 0.85g
 Agua destilada..... 100 ml

Solución de azul tripano.

Azul tripano..... 0.4 g
 Solución salina isotónica..... 100 ml

HCl (Acido clorhídrico) 1N

HCl concentrado.....	9 ml
Agua destilada.....	100 ml

NaOH (Hidróxido de sodio) 1N

NaOH.....	4 g
Agua destilada.....	100 ml

Amortiguador de cacodilatos 0.1M, pH7.4Solución A (Cacodilato de sodio 0.2M).

Cacodilato de sodio.....	42.8 g
Agua bidestilada.....	1000 ml

Solución B (Acido clorhídrico 0.2M).

Acido clorhídrico al 37%.....	10 ml
Agua bidestilada.....	603 ml

Mezclar 50 ml de la solución A y 2.7 ml de la solución B, Aforar a 100 ml con agua bidestilada para obtener una molaridad de 0.1M. Conservar en refrigeración en frasco ámbar.

Amortiguador de maleatos al 0.1M, pH6.0Solución A (Acido maleico 0.2M)

Acido maleico.....	23.2g
Agua bidestilada.....	1000ml

Solución B (Hidróxido de sodio 0.2M)

Hidróxido de sodio.....	8 g
Agua bidestilada.....	1000ml

Mezclar 50 ml de solución A y 27 ml de solución B. Aforar a

200 ml con agua bidestilada para obtener una molaridad de 0.1M y pH 6.0.

Uranilo en amortiguador de maleatos.

Acetato de uranilo.....	0.5 g
Amortiguador de maleatos 0.1M, pH 6.0.....	100 ml

Disolver hasta lograr una solución cristalina de uranilo al 0.5%.
Conservar en refrigeración en frasco ámbar.

Tetróxido de osmio.

Tetróxido de osmio (Ted Pella, Inc.).....	1 g
Agua bidestilada.....	50 ml

Lavar la ampolleta de tetróxido de osmio y el recipiente de la solución con mezcla crómica y agua destilada varias veces. Romper la ampolleta y colocarla en el recipiente, agregar agua bidestilada. Dejar reposar por 24 h, protegido de la luz, antes de usarlo. Todo este proceso se realiza con campana de extracción.

Preparación de la resina.

Epon 812 (Fluka).....	4.4 ml
MNA (Methyl-norbornene-2,3-dicarboxylic anhydride)..	1.9 ml
DDSA (2-Dodecenyl - succinic-anhydride).....	3.7 ml

Agregar a cada 10 ml de resina, el siguiente catalizador.

DMP ₃₀ (2,4,6-tris-dimethylaminomethyl-phenol).....	0.15 ml
--	---------

Realizar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min, procurando prepararla una hora antes de ser usada.

Acetato de uranilo

Acetato de uranilo.....	0.3 g
Agua bidestilada.....	10 ml

Mezclar y agitar hasta formar una solución cristalina. Filtrar con membrana Millipore 0.22 μm y cubrir con papel aluminio para proteger de la luz.

Solución de plomo

Nitrato de plomo.....	1.33g
Citrato de sodio.....	1.76g
Hidróxido de sodio al 0.1N.....	8 ml
Agua bidestilada hervida y fría.....	30 ml

Agregar los dos primeros reactivos y el agua bidestilada hervida y fría a un matraz aforado de 50 ml. Posteriormente añadir el NaOH y aforar a 50 ml con agua bidestilada. Proteger de la luz con papel aluminio y conservar en refrigeración.

Glutaraldehído al 2%

Glutaraldehído al 25%.....	8 ml
Amortiguador de cacodilatos 0.1M, pH 7.4.....	92 ml

Mezclar y conservar en refrigeración en un frasco ámbar.

Amortiguador de fosfatos 20mM, pH7.3.

Fosfato dibásico de sodio, anhidro.....	2.3004g
Fosfato monobásico de potasio anhidro.....	0.5206g
Agua destilada.....	1000 ml

Se ajusta el pH y se mantiene en refrigeración.

Solución de Luminol (Eastman Kodak Co. USA)

Luminol (2,3 dehidro-1,4 ftalacinediona..... 0.771 g
Amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.3..... 1000 ml

Los reactivos se sonifican a 80 ciclos por segundo, colocando se posteriormente en un baño de hielo para evitar su calentamiento. La solución resultante se filtra con membrana Millipore, 0.22 μ m. Se mantiene en refrigerador protegido de la luz.