

29/108



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA PARTICIPACION DE
RECEPTORES MANOSA/FUCOSA EN
LA FAGOCITOSIS DE
Histoplasma capsulatum

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A
MARIA ELENA JEREZ COTA



FALLA DE ORIGEN

1989



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.

ÍNDICE

	Págs.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Participación de los receptores del macrófago en la fagocitosis.....	6
Antecedentes de interacción célula huésped-célula fúngica.....	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVOS.....	12
ESTRATEGIAS.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Animales.....	16
Microorganismos.....	16
Reactivos, medios y soluciones	16
Cultivo de macrófagos.....	16
Preparación del inóculo.....	17
Experimentos de fagocitosis.....	18
A) Fagocitosis con competencia de ligandos.....	18
B) Fagocitosis por atrapamiento de receptores.....	19
Tinción.....	20
Determinación del porcentaje de fagocitosis y del índice fagocítico.....	20
Análisis estadístico.....	20

	Págs.
RESULTADOS.....	21
Fagocitosis con competencia de ligandos.....	21
Fagocitosis por atrapamiento de receptores.....	23
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	30
SUMMARY.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
APÉNDICE.....	49

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Págs.
Cuadro 1. Receptores de macrófagos.....	8
Esquema 1. Inhibición de receptores manosa/fucosa por competencia de ligandos.....	14
Esquema 2. Inhibición por atrapamiento de receptores manosa/fucosa.....	15
Figura 1. Porcentaje de fagocitosis de levaduras de <i>H. capsulatum</i> o <i>C. albicans</i> con competencia de ligandos.....	41
Figura 2. Porcentaje del índice fagocítico de levaduras de <i>H. capsulatum</i> con competencia de ligandos.....	42
Figura 3. Porcentaje del índice fagocítico de levaduras de <i>C. albicans</i> con competencia de ligandos.....	43
Figura 4. Índice fagocítico de levaduras de <i>H. capsulatum</i> o <i>C. albicans</i> con competencia de ligandos....	44
Figura 5. Porcentaje de fagocitosis de levaduras de <i>H. capsulatum</i> o <i>C. albicans</i> por atrapamiento de receptores.....	45
Figura 6. Porcentaje del índice fagocítico de levaduras de <i>H. capsulatum</i> por atrapamiento de receptores.....	46
Figura 7. Porcentaje del índice fagocítico de levaduras de <i>C. albicans</i> por atrapamiento de receptores.	47
Figura 8. Índice fagocítico de levaduras de <i>H. capsulatum</i> o <i>C. albicans</i> por atrapamiento de receptores.	48

RESUMEN

Existe poca información sobre la participación de receptores en la fagocitosis del hongo Histoplasma capsulatum. El presente trabajo está orientado a valorar el papel de los receptores de manosa/fucosa de macrófagos murinos en la fagocitosis de levaduras de H. capsulatum, utilizando para esto dos tipos de ensayos: uno por bloqueo de receptores con ligandos competidores D(+) manosa o metil- α -D-manopiranososa, y el otro por atrapamiento de receptores en un gel de ácido β 1 \rightarrow 4-D-polimanurónico. La fagocitosis de H. capsulatum en presencia de los competidores mostró menor porcentaje que el testigo sin competidor (20,5%), siendo los resultados de 11,5 y 7,5% con D(+) manosa y el metil- α -D-manopiranososa, respectivamente. Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.005$) entre el testigo y los valores para cada ligando. Los datos para el hongo Candida albicans, utilizado como microorganismo de referencia, mostraron un 23% de fagocitosis con D(+) manosa y 31% con el metil- α -D-manopiranososa, así como el 38% para el testigo de fagocitosis. Los ensayos de atrapamiento de receptores mostraron una diferencia ($p < 0.02$) entre el testigo de la fagocitosis de H. capsulatum (40,5%) y la fagocitosis obtenida en presencia del ácido β 1 \rightarrow 4-D-polimanurónico (29,5%), mientras que no se obtuvo diferencia en la fagocitosis de C. albicans. De modo general, C. albicans presentó un porcentaje de fagocitosis más elevado que H. capsulatum. Los índices fagocíticos para ambos microorganismos en los dos tipos de experimentos fueron similares, observándose que la mayoría de los macrófagos fagocitaron de 1 a 2 levaduras, en menor proporción de 3 a 6 y escasamente más de 6.

INTRODUCCIÓN

De gran interés ha sido, en los últimos años, el estudio de enfermedades infecciosas tales como las micosis profundas, producidas por hongos microscópicos que atacan los tejidos y que en algunos casos conducen a la muerte del individuo. Dentro de estas micosis, la histoplasmosis americana se considera en México un padecimiento de alto riesgo, sobre todo en individuos susceptibles que, por razones de trabajo en recintos cerrados, se ven expuestos al hábitat natural del agente causal de la enfermedad, el cual se encuentra en nuestro país preferentemente en cuevas o minas abandonadas donde se conforma su nicho ecológico (1,2).

El agente etiológico de esta enfermedad, Histoplasma capsulatum Darling 1906, es un hongo dimórfico que se encuentra en la naturaleza en forma micelial, presentando micro y macroconidios y pequeños fragmentos de hifas que, al ser dispersadas e inhaladas, se instalan en el tejido pulmonar del huésped, donde encuentran las condiciones adecuadas para convertirse a la forma parasitaria de levadura, la cual es facultativamente intracelular con una marcada preferencia por el sistema fagocítico mononuclear (2,3). En condiciones de laboratorio, H. capsulatum puede cultivarse en medios artificiales a temperatura ambiente en forma micelial y en medio suplementado con cisteína a 37°C en forma de levadura (3,4).

La histoplasmosis es una enfermedad que en muchos casos tiene un curso benigno; sin embargo, cuando la infección prospera,

la interrogante «Cuales son los mecanismos de que se vale el hongo para instalarse en el huésped ? nos lleva a cuestionar la eficacia de los mecanismos de resistencia del huésped y en particular del fagocito para impedir su proliferación. Se ha propuesto que, bajo ciertas circunstancias, el hongo cuenta con mecanismos propios para soslayar el sistema de defensa, e incluso puede escapar al efecto citocida de los fagocitos, inhibiendo la producción de metabolitos oxidativos, como se ha descrito en macrofagos infectados con H.capsulatum (5,6,7).

El destino del hongo una vez fagocitado es el evento mas importante para definir el curso de la infección, razón por la cual el conocimiento profundo de la interacción célula huésped/parásito es de primordial interés.

El proceso fagocítico comprende una cascada de eventos que se disparan a partir de un contacto primario entre el fagocito y la partícula fagocitable, en el caso, el parásito (hongo).

Para el proceso por medio del cual las células eucariontes introducen materiales sólidos y líquidos del medio extracelular, mediante la formación de vacuolas fagocíticas, se utilizan dos términos convencionales para diferenciar el tipo de material ingerido; así, se llama pinocitosis cuando la célula introduce moléculas solubles ($<0.5\mu$) y fagocitosis cuando se trata de partículas ($>0.5\mu$) (8,9). Sin embargo, este criterio para definir la ingestión celular es hasta cierto punto arbitrario, ya que no existe un tamaño exacto de la partícula que separe a ambos procesos y tampoco son procesos excluyente el uno del otro (9). Por otro lado, el termino endocitosis se reserva para la ingestión de molé-

culas solubles a través de receptores y se llama "endocitosis mediada por receptores" o lo que corresponde, en algunos casos, a "pinocitosis mediada por receptores". La fagocitosis se realiza también a través de receptores cuando promueve la introducción de la partícula a la célula fagocítica. Aunque se sigue empleando el término fagocitosis para denominar al fenómeno mediante el cual una partícula es ingerida y posteriormente digerida, actualmente existe el consenso, entre los investigadores que estudian fagocitosis de microorganismos, para denominar fagocitosis exclusivamente a la etapa de ingestión, llamándose a los eventos posteriores por separado: fusión fagosoma-lisosoma, digestión y exocitosis.

La etapa de ingestión de la partícula se divide en dos fases: la primera se denomina adherencia y es básicamente el contacto inicial que se establece entre la partícula y la superficie externa del fagocito, en donde se llevan a cabo interacciones específicas o no, que no requieren de gasto energético (10), y la segunda fase comprende la internalización de la partícula, requiere de alto gasto energético, es dependiente de temperatura (11,12) y conlleva a la formación de la vacuola fagocítica o fagosoma.

Se ha sugerido que la fase inicial de esta interacción huésped/parásito se realiza mediante un mecanismo de reconocimiento, en el que están involucrados componentes propios de la superficie del parásito, que funcionan como ligandos, y un receptor localizado en la superficie de la membrana plasmática de la célula fagocítica (13,14). La unión ligando-receptor no sólo es crítica para la adherencia de la partícula al fagocito, sino también en algunos casos es esencial para el disparo del estallido

do oxidativo, que constituye uno de los mecanismos de destrucción del parásito (15).

Una vez hecho el contacto -la adherencia de la partícula- se desencadena un mecanismo semejante a una cremallera mediante el cual el estímulo establecido por la unión ligando-receptor se transmite al segmento de la membrana plasmática, inmediatamente adyacente a la partícula que está siendo ingerida, y los receptores del fagocito se van uniendo a las moléculas complementarias de la partícula hasta englobarla totalmente, culminando con la fusión de la membrana y, consecuentemente, la formación de una vacuola, completándose de esta manera la ingestión (11,13,16,17).

Por otro lado, se ha visto en estudios al microscopio electrónico que cuando la partícula se une o adhiere al receptor, inmediatamente empieza a aparecer una red de filamentos en las inmediaciones del contacto, por debajo de la membrana. Esta red de filamentos está formada principalmente por una proteína llamada clatrina, la cual se asocia a proteínas de bajo peso molecular y rodean a las vacuolas fagocíticas, pero una vez que éstas emprenden su desplazamiento intracelular, la clatrina desaparece (18,19). Poco se sabe del papel de la clatrina en el proceso fagocítico; sin embargo, se plantea que participa en la internalización mediada por receptores y que tiene una función mediadora en el reciclaje de los receptores a la superficie celular (18,19,20).

Recientemente se ha sugerido que la clatrina está involucrada en el transporte de proteínas endógenas a la membrana plasmática y que es, además, requerida para el crecimiento normal de leva-

duras y probablemente para el de todas las células eucarióticas (20,21).

Aun cuando el proceso fagocítico en general se asocia con la actividad de comer de la célula, cuando se trata de fagocitos mononucleares o polimorfonucleares, la actividad fagocítica implica algo más que un evento de nutrición celular: comprende la vía por la cual se establece un mecanismo de defensa contra microorganismos invasores, así como la eliminación de material propio dañado o envejecido (8,9,10).

Una vez introducida la vacuola fagocítica (fagosoma), esta migra hacia la región perinuclear donde se fusiona con los lisosomas, denominándose fagolisosoma o lisosoma secundario y lleva a cabo la degradación del material ingerido, resultando de esta degradación productos que pueden atravesar la membrana fagolisosómica y ser incorporados al citoplasma de la célula. No siempre todo el material introducido es aprovechable por la célula; algunos productos permanecen dentro del fagolisosoma, los cuales pueden ser eliminados por exocitosis o permanecer dentro de la célula ocasionando, por acumulación de estos materiales, trastornos metabólicos (9,10).

PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DEL MACRÓFAGO EN LA FAGOCITOSIS

En la actualidad, el estudio sobre receptores de membrana para la captación de material extracelular se ha extendido notablemente; sin embargo, existen aún muchas interrogantes por determinar.

Los receptores que median la endocitosis son proteínas anfi-

páticas con una región hidrofóbica que atraviesa el grosor de la bicapa lipídica y dos regiones hidrofílicas, una intracelular y la otra extracelular (19).

La membrana plasmática de los macrófagos posee una gran variedad de proteínas, glicoproteínas y glicolípidos para su regulación y funciones efectoras (22). Se ha puntualizado que los macrófagos tienen más de 30 tipos diferentes de receptores asociados con la fagocitosis, los cuales pueden clasificarse dentro de 3 categorías: receptores inmunológicos, receptores no inmunológicos y receptores no específicos para partículas extrañas (23) (cuadro 1) (24-39).

Bajo un estado de actividad fagocítica, la célula está continuamente introduciendo porciones de su membrana plasmática; sin embargo, ésta mantiene más o menos constantes sus dimensiones. Se ha observado que, en cuestión de minutos, la porción de membrana introducida por mecanismo de endocitosis mediada por receptores, reaparece en la superficie celular, y de esta manera los receptores de membrana son reciclados y vuelven a ser funcionales, uniendo otros ligandos (40), aunque también se ha observado que algunos receptores son digeridos en el fagolisosoma (41).

Existen dos modos por los cuales se lleva a cabo la endocitosis de partículas mediadas por receptores: uno dependiente de opsoninas en el que se involucra la porción Fc de las inmunoglobulinas G (42) y el componente C3 del complemento (43); el otro independiente de opsoninas (14) en el que actúan receptores no inmunológicos como son, entre otros, los receptores para glico-

CUADRO 1

RECEPTORES DE MACRÓFAGOS

RECEPTORES INMUNOLÓGICOS

Receptores Fc para la fracción Fc de las moléculas de inmunoglobulina G. (24-26)

FcRI para la subclase IgG 2a (alta afinidad)

FcRII para la subclase IgG 1 e IgG 2b (baja afinidad)

FcRIII para la subclase IgG 3

Receptor para complemento (27,28)

CR1 para los fragmentos C3b y C4b

CR2 para C3bINA y C3d

CR3 para C3bi

RECEPTORES NO INMUNOLÓGICOS

Receptor para Manosa/Fucosa (RMF) que se une a glicoconjugados con residuos terminales de manosa y/o fucosa (12,29-33)

Receptores para Fibronectina, Lactoferrina, Transferrina y α -2-Macroglobulina (19,34-38)

RECEPTORES PARA PARTÍCULAS EXTRAÑAS (39)

Estos receptores median la ingestión de partículas inertes como son: asbestos, talco, aluminio, látex..

conjugados con residuos terminales de manosa y/o fucosa, los de fibronectina, los de lactoferrina y los receptores para partículas extrañas (12,31,32,35,37,39).

Independientemente de la modalidad que los macrófagos utilicen para fagocitar partículas, los efectos son diversos, dependiendo de muchos factores, entre ellos: el tipo de receptor involucrado, el estado de desarrollo y activación de la célula fagocítica y las condiciones experimentales o naturales a las que el proceso fagocítico sea sometido. Por ejemplo, existen controversias en cuanto a que si el receptor para C3b dispara o no la señal para la liberación de metabolitos reactivos de oxígeno. Wright y Silverstein (44) encontraron que aun en condiciones de estimulación el receptor para C3b de fagocitos humanos no estimula la liberación de estos metabolitos. Sin embargo, Hart *et al.* (45) mostraron, mediante pruebas de quimioluminiscencia, que neutrófilos peritoneales de murinos no solo ingieren a Proteus mirabilis, mediante la participación de receptores para C3b, sino que también estos receptores estimulan el mecanismo citocida del neutrófilo, que involucra la liberación de los metabolitos reactivos de oxígeno.

Respecto de los receptores Fc, se ha observado que no solo adhieren e ingieren partículas cubiertas con IgG, sino que también, al establecerse el contacto ligando/receptor, se dispara el mecanismo citolítico del macrófago mediante la generación del estallido respiratorio (6).

En la endocitosis mediada por receptores no inmunológicos se ha observado, en experimentos *in vitro*, que la presencia de fi-

bronectina en el medio extracelular facilita la adherencia de Leishmania a la superficie del fagocito (39). Asimismo, Trypanosoma cruzi también puede utilizar esta vía de entrada a la célula hospedera (46).

El receptor para manosa y/o fucosa ha sido, en la última década, objeto de extenso estudio (12,29-33,40), y es uno de los receptores bien caracterizados en macrófagos de distintas ubicaciones y especies, aunque existen diferencias cuantitativas en su caracterización debido a los distintos métodos utilizados para su estudio (33,36,47,48). Algunos trabajos muestran que la unión de ciertos parásitos con este receptor es capaz de estimular la producción de metabolitos reactivos de oxígeno (49), y que existe en algunos casos una interacción entre el receptor de manosa/-fucosa y el receptor del complemento (50,51). Blackwell *et al.* (50) proponen para el modelo Leishmania una función combinada de estos receptores.

ANTECEDENTES DE INTERACCIÓN CÉLULA HUÉSPED-CÉLULA FUNGIDA.

Hasta hoy es muy poca la información existente respecto a la interacción del hongo con receptores de macrófagos. Bullock y Wright (52) observaron que el contacto inicial de reconocimiento y adherencia de levaduras de H. Capsulatum a macrófagos derivados de monocitos humanos, era mediado por una familia de receptores CR3, LFA-1 y p150.95. Cada uno de estos receptores fue capaz de actuar aisladamente y participar en la unión de la levadura con el macrófago. Esta unión fue además dependiente de la temperatura y de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺.

Wolf *et al.* (52), al investigar la interacción de levaduras intracelulares de H. capsulatum y el estallido oxidativo de macrófagos peritoneales murinos, plantearon que la sobrevivencia de levaduras dentro del fagocito se debía a que el hongo inhibía la producción de metabolitos reactivos del oxígeno. Sin embargo, la opsonización de levaduras con suero inmune fue capaz de disparar el estallido oxidativo. Lo que sugiere que el receptor Fc del macrófago está involucrado no sólo en la internalización de las levaduras de H. capsulatum, sino también en el disparo del mecanismo oxidativo del macrófago.

Taylor *et al.* (53) estudiaron la participación de los receptores Fc en la internalización de levaduras de H. capsulatum, a través del manejo de levaduras opsonizadas con IgG específica, previa fagocitosis en macrófagos de la línea celular J774.2. Sus resultados mostraron que, aunque los receptores Fc participan en la fagocitosis de levaduras de H. capsulatum, no aceleran su internalización.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando: que es un hecho la existencia de receptores sobre la membrana plasmática de los fagocitos que median la adherencia e internalización de partículas y microorganismos: que los macrófagos expresan sobre su superficie receptores para glicoconjugados con residuos terminales de manosa y/o fucosa (54); que en la pared celular de *H. capsulatum* se encuentran varios componentes como quitina (55,56), glucanas (56,57), glicoesfingolípidos, compuestos que contienen manosa (58,59), así como glicoconjugados de manosa como las galactomananas (60), en el presente trabajo se plantea el estudio de la utilización de receptores de manosa/fucosa en la interacción entre el fagocito y el hongo *H. capsulatum*.

Para tal fin se propone la siguiente hipótesis.

HIPÓTESIS

Los receptores manosa/fucosa de macrófagos peritoneales de ratón son utilizados para la internalización de levaduras de *H. capsulatum*.

OBJETIVOS

- 1.- Confirmar la participación del receptor manosa/fucosa en la fagocitosis de *H. capsulatum*.
- 2.- Determinar si los macrófagos son capaces de reconocer ligandos α y β manosa.

ESTRATEGIAS

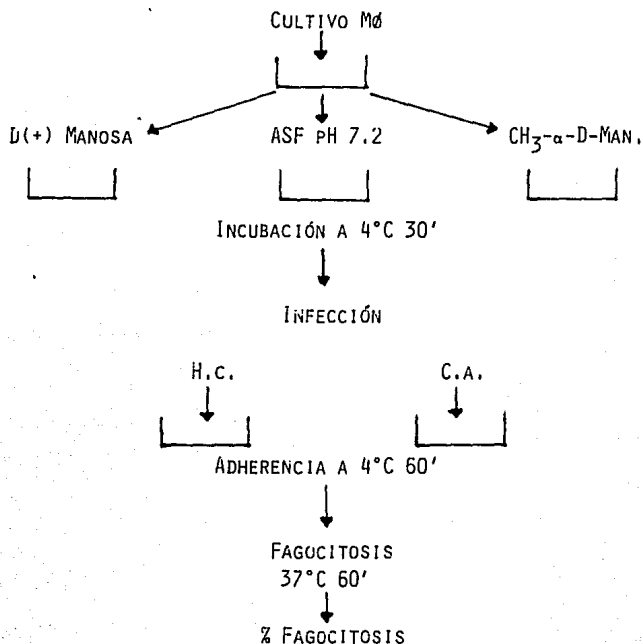
Para aceptar o rechazar la hipótesis planteada se llevaron a cabo dos tipos de diseños experimentales:

1.- Por la determinación de la fagocitosis del hongo, en presencia de ligandos competidores para los receptores manosa/fucosa (ver esquema 1).

2.- Por la determinación de la fagocitosis del hongo, previo atrapamiento de receptores de manosa/fucosa (ver esquema 2).

ESQUEMA 1

INHIBICIÓN DE RECEPTORES MANOSA/FUCOSA POR COMPETENCIA DE LIGANDOS



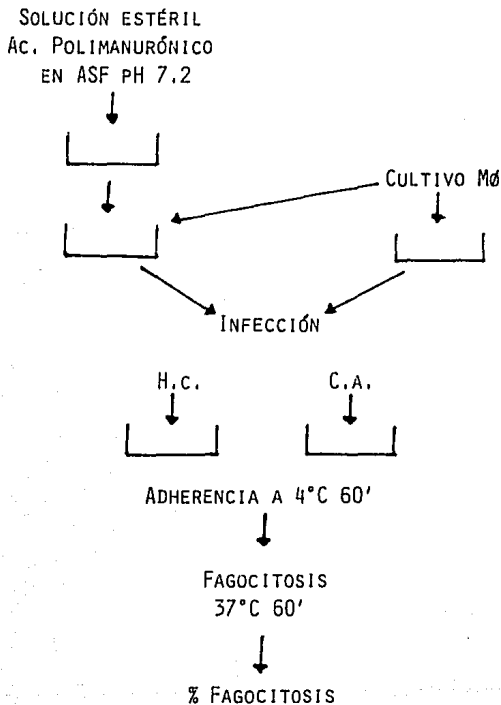
Mφ - MACRÓFAGO

ASF - AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATO

CH₃-α-D-MAN - METIL-α-D-MANOPIRANOSA

ESQUEMA 2

INHIBICIÓN POR ATRAPAMIENTO DE RECEPTORES MANOSA/FUCOSA



MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Se utilizaron ratones normales, machos, de la cepa sincénica NIH, de aproximadamente 2 meses de edad, proporcionados por la Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología, Laboratorio Nacional de Salud Pública, México, D.F.

Microorganismos. Se trabajó con los hongos *H. capsulatum* EH46 y *Candida albicans* 47 U, pertenecientes al cepario del Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, UNAM. Ambas cepas se mantuvieron en fase levaduriforme a 37°C en medio de infusión de cerebro-corazón debidamente suplementado con hidrocloreuro de L-cisteína, glucosa y gentamicina.

Reactivos, medios y soluciones. Todos los reactivos utilizados, salvo los que se especifican, procedieron de los laboratorios Merck de México, S.A. (Ver apéndice).

Cultivo de macrófagos. Para obtener un mayor número de macrófagos, se inyectó intraperitonealmente a cada ratón 2 ml de aceite mineral estéril. Los ratones fueron sacrificados 4 días después por descerebración y fijados en un soporte en posición dorsal, de manera que la parte podálica quedara frente al operador. Previo a la asepsia de la región abdominal, se expuso la cavidad peritoneal y con una jeringa hipodérmica de 5 ml se hicieron varios lavados con el medio RPMI-1640 pH 7.0,

adicionado con gentamicina. Las células obtenidas se centrifugaron a 250 g por 10 min y se incubaron 10 min con $\text{Tris-NH}_4\text{Cl}$ a 37°C , y posteriormente se lavaron 2 veces con RPMI-1640.

El paquete celular final, obtenido de todos los ratones, fue resuspendido en un volumen conocido de medio RPMI-1640, conteniendo L-glutamina y suplementado con HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-acido etanosulfónico), gentamicina y 15% de suero fetal de ternera descomplementarizado a 56°C por 30 min. Se distribuyeron las células en botellas de cultivo (Nunc) y se incubaron éstas por 2 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 . Se descartaron los sobrenadantes de los cultivos y se les agregó medio fresco, dejándolos incubar durante 24 h para permitir la adherencia de las células y de esta manera obtener una población más homogénea de macrófagos. Antes de su utilización en los experimentos de fagocitosis, se ajustó el número de células a ser utilizadas, determinando la viabilidad de los macrófagos por la técnica de exclusión de azul de tripano. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

Preparación del inóculo. Las levaduras de *H. capsulatum* y de *C. albicans*, cosechadas en fase logarítmica de crecimiento, se lavaron 3 veces a 300 g durante 20 min con un amortiguador salino de fosfatos (ASF) 0.03 M, pH 7.2. Las levaduras sedimentadas se resuspendieron en medio RPMI-1640 y fueron cuantificadas en la región W de la cámara de Neubauer. Se ajustó el inóculo a 5 levaduras por macrófago.

Experimentos de fagocitosis. A) Fagocitosis con competencia de ligandos (ver esquema 1). Se depositaron 50 μ l de una población conocida de macrófagos en cada pozo de las cajas de cultivo (Nunc) de 24 pozos, los cuales contenían una lenteja de vidrio de 13 mm de diámetro en el fondo plano. Se añadió medio de cultivo RPMI-1640 para completar un volumen de 300 μ l, el cual fue debidamente suplementado con suero fetal de ternera descomplementarizado. Se incubaron las cajas a 37°C en cámara húmeda y atmósfera de 5% de CO₂ durante 4 h para adherir la monocapa de macrófagos. Transcurrido este tiempo, se lavaron las cajas con el fin de eliminar la población de macrófagos no adherida y se adicionaron los ligandos competidores, D(+) manosa (1mg/ml) y metil- α -D-mano-piranosas (1 mg/ml) en 300 μ l de volumen final a cada pozo correspondiente. Se incubó a 4°C por 30 min con el objeto de inducir la unión de los competidores con los receptores de manosa/fucosa. Al mismo tiempo se procesó un testigo utilizando sólo el amortiguador de fosfatos. Se descartaron los sobrenadantes y se agregaron los inóculos de *H. capsulatum* y/o *C. albicans*. Se permitió la adherencia durante 1 h a 4°C con el propósito de uniformar los inóculos. Se lavaron los pozos para eliminar las levaduras no adheridas y se agregaron, a cada uno, 300 μ l de medio de cultivo fresco con suero descomplementarizado. Se incubó a 37°C durante 1 h para llevar a cabo la fagocitosis y luego ésta se detuvo cambiando la temperatura a 4°C. Posteriormente se añadieron, a cada pozo, 3 gotas de acetona y se procedió a la tinción de Wright. Se determinó el porcentaje de fagocitosis y del índice fagocítico. Todo el procedimiento experimental se hizo en condi-

ciones de estricta esterilidad. Se efectuaron 4 experimentos, cada uno por cuadruplicado.

B) Fagocitosis por atrapamiento de receptores (ver esquema 2).

A las cajas de cultivo de 24 pozos con las lentes previamente depositadas, se les agregaron, a cada pozo, 300 μ l de una dilución óptima del ácido β 1 \rightarrow 4-D-polimanurónico (ácido alginico). Se incubó a 4°C hasta la formación de una capa fina de gel. Se descartaron los sobrenadantes y se adicionaron 50 μ l de una población conocida de macrófagos sobre la capa del ácido β 1 \rightarrow 4-D-polimanurónico, a fin de atrapar, en la interfase ácido-macrófagos, los receptores de manosa/fucosa que reconocen los residuos de manosa del ácido β 1 \rightarrow 4-D polimanurónico. Se añadió RPMI-1640 suplementado con suero descomplementarizado para completar 300 μ l de volumen final. Se incubó por 4 h y se lavó para eliminar la población de macrófagos no adherida. Se procesaron simultáneamente macrófagos adheridos a vidrio como testigo. Se adicionaron los inóculos de *H. capsulatum* y/o *C. albicans* y se permitió la adherencia durante 1 h a 4°C con el propósito de uniformar los inóculos. Se lavó para eliminar las levaduras no adheridas y se agregaron, a cada pozo, 300 μ l de medio de cultivo fresco con suero descomplementarizado. Se incubó a 37°C en cámara húmeda y en atmósfera de 5% de CO₂ durante 1 h para que se llevara a cabo la fagocitosis, y luego ésta se detuvo cambiando la temperatura a 4°C. Posteriormente se añadieron, a cada pozo, 3 gotas de acetona y se procedió a la tinción de Wright. Se determinó el porcentaje de fagocitosis y del índice fagocítico. Todo el procedimiento experimental se hizo en condiciones de estricta

esterilidad. Se efectuaron 4 experimentos, cada uno por cuadruplicado.

Tinción. A cada preparación se le agregaron 2 gotas de colorante de Wright. Se incubo 1 min y se añadió un volumen igual de amortiguador específico de fosfatos de sodio pH 7.2. Después de 7 min se lavó con ASF pH 7.2. Por último se secaron todas las preparaciones a temperatura ambiente y se montaron las lentes con resina sintética en portaobjetos. Finalmente, éstas fueron observadas con el microscopio óptico para la determinación del porcentaje de fagocitosis y del índice fagocítico.

Determinación del porcentaje de fagocitosis y del índice fagocítico. El porcentaje de fagocitosis se determinó en una población total de 200 macrófagos por preparación, cuantificando el número de macrófagos capaces de fagocitar de 1 o más levaduras. El índice fagocítico se determinó por el número total de levaduras fagocitadas en una población de 200 macrófagos infectados y el porcentaje del índice fagocítico se determinó por la cuantificación del número de levaduras fagocitadas por cada macrófago en una población total de 200 macrófagos por preparación.

El resultado final de cada lote se expresó por el promedio de los datos obtenidos de las preparaciones sometidas a las mismas condiciones experimentales.

Análisis estadístico. Se realizó por la prueba de "t" de Student (6).

RESULTADOS

Para llevar a cabo los experimentos de competencia de ligandos, previamente se determinó la concentración óptima de los ligandos competidores, D(+) manosa y metil- α -D-manopiranos, la cual fue de 1 mg/ml para ambos y que corresponde, además, a la concentración frecuentemente referida para ellos en la literatura. Para los experimentos de atrapamiento de receptores se hicieron pruebas preliminares con el ácido β 1 \rightarrow 4-D-polimanurónico, con el objeto de establecer la concentración adecuada de este compuesto, necesaria para la formación de una capa fina de gel, que no se rompiera sobre la lenteja de vidrio y que permitiera la adherencia de una monocapa de macrófagos, sin alterar la observación de éstos al microscopio. Se probaron diferentes diluciones del ácido, que variaron de 1:10 a 1:100 en ASF, seleccionando la última como la concentración óptima.

Fagocitosis con competencia de ligandos. Se estudió el comportamiento de levaduras de H. capsulatum frente a los ligandos capaces de competir por la unión a receptores de manosa/fucosa, presentes en los macrófagos peritoneales de ratón. La figura 1 muestra que el porcentaje de fagocitosis de H. capsulatum, al realizarse previa administración de los ligandos D(+) manosa y metil- α -D-manopiranos, fue de 11.5 y 7.5% respectivamente, mientras que en el testigo sin competidores se observó una fagocitosis de 20.5%. Se encontró una diferencia significativa entre la fagocitosis de

H. capsulatum en presencia del ligando D(+) manosa ($p < 0.005$) o con el metil- α -D-manopiranososa ($p < 0.005$) y la fagocitosis del mismo hongo sin el uso de competidores.

Para obtener datos comparativos sobre la utilización del receptor manosa/rucosa del macrófago, se utilizó *C. albicans* como microorganismo de referencia. En la acción de los competidores frente a *C. albicans* (Fig.1) se observó que los porcentajes de fagocitosis de levaduras de *C. albicans* fueron de 23% cuando se utilizó D(+) manosa y 31% con el metil- α -D-manopiranososa, siendo estos valores más bajos que el porcentaje de fagocitosis alcanzado por el testigo sin competidores que fue de 38%. Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.025$) entre el porcentaje de fagocitosis de *C. albicans*, con el uso previo de D(+) manosa y su testigo sin el uso de competidores, no así cuando el competidor fue el metil- α -D-manopiranososa.

La determinación del índice fagocítico en los experimentos de competencia de ligandos (Figs.2-4) confirma de alguna manera los resultados del porcentaje de fagocitosis, en los que se observó que las levaduras de *C. albicans* son más fagocitadas que las de *H. capsulatum* en la población de macrófagos estudiada y bajo condiciones de no facilitación (opsonización) del proceso fagocítico. Por lo general, la distribución del número de levaduras de *H. capsulatum* (Fig.2) y *C. albicans* (Fig.3) por célula fagocítica varió de 1 a 6, y en pocos casos hasta 7 y 8, siendo que la mayoría de los macrófagos fagocitó de 1 a 2 levaduras (Fig. 4).

Fagocitosis por atrapamiento de receptores. La utilización de un polímero de manosa en el cual los receptores manosa/fucosa del macrófago pudieran quedarse atrapados, fue la estrategia de estos experimentos. La figura 5 muestra los resultados del atrapamiento de receptores en la fagocitosis de H. capsulatum y C. albicans. Para las levaduras de H. capsulatum se obtuvo un promedio de 29.5% de fagocitosis al usar ácido β 1 \rightarrow 4-D-polimanurónico, mientras que en el testigo sin atrapamiento de receptores se observó un 40.5% de fagocitosis. Se encontró una diferencia ($p < 0.02$) entre la fagocitosis de H. capsulatum determinada en macrófagos adheridos al ácido β 1 \rightarrow 4-D-polimanurónico y el testigo de fagocitosis del hongo en macrófagos adheridos a vidrio. En los resultados con C. albicans en los experimentos de atrapamiento de receptores, la fagocitosis fue de 58%, mientras que en el testigo sin atrapamiento de receptores la fagocitosis fue de 60%. La diferencia entre ambos porcentajes no fue significativa.

Finalmente, las figuras 6 y 7 muestran los porcentajes del índice fagocítico para H. capsulatum (Fig. 6) y C. albicans (Fig. 7) para los experimentos de atrapamiento de receptores con ácido β 1 \rightarrow 4-D-polimanurónico. Los resultados para ambos microorganismos fueron similares a los experimentos en los cuales se empleó ligandos competidores, confirmando los mayores niveles del porcentaje de fagocitosis para C. albicans y la misma distribución del número de levaduras de ambos microorganismos para macrófagos infectados (Figs. 6 y 7). Por lo general, en este tipo de experimentos los macrófagos fagocitaron 2 levaduras (Fig. 8).

D I S C U S I Ó N

Entre los pocos trabajos dirigidos a la participación de receptores en la fagocitosis de *H. capsulatum* esta el de Bullock y Wright (52), quienes encontraron que una familia de integrinas o adhesinas, formada por receptores del tipo LFA-1, CR3 y p150,95, juegan un papel importante en la adherencia de las levaduras a macrófagos derivados de monocitos humanos. Además, al estudiar otros receptores encontraron que los de manosa/fucosa no participan en la adherencia del hongo y fundamentan estos hallazgos con base en la baja concentración de manosa en la fase levaduriforme del hongo, la cual es aproximadamente del 1% según Damer *et al.* (55), aunque se cuestiona la concentración real de manosa debido a su característica de alta solubilidad en los solventes de los diferentes métodos de extracción. Otros investigadores han demostrado la presencia de manosa aislada o formando conjugados con compuestos como los glicolípidos (ceramida-P-inositol- (manosa 2) y ceramida-P-inositol- (manosa 2, galactosa) / presentes en la fase levaduriforme de *H. capsulatum* (58,59). Azuma *et al.* (60) han dado gran importancia a la presencia de manosa asociada a otros compuestos, como responsables de moléculas compartidas entre hongos productores de nosologías afines. Aunque si bien es cierto que la manosa está más elevada en la fase micelial que en la fase levaduriforme de *H. capsulatum* (55), la asociación de manosa con galactosa (galactomananas), y determinada concen-

tracción crítica de éstas en la fase parasitaria del hongo, es posiblemente un factor relacionado a la producción de anticuerpos de reactividad cruzada (60,62). Dadas las discrepancias respecto a la composición real de manosa en *H. capsulatum*, y considerando que microorganismos levaduriformes como *C. albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* tienen concentraciones importantes de manosa en su pared celular, se ha planteado, en el presente trabajo, la necesidad de buscar otras estrategias que permitan discriminar la participación de los receptores manosa/fucosa en la fagocitosis del hongo. También hay que considerar que los receptores manosa/fucosa no se expresan uniformemente en los fagocitos: por ejemplo, no lo hacen en monocitos humanos, sino en macrófagos derivados de los que se obtienen a través de su cultivo (32), lo que sugiere que el receptor manosa/fucosa se expresa en macrófagos más diferenciados o maduros. Por tal motivo, en este estudio se utilizaron macrófagos peritoneales de ratón, por ser éstas células finalistas, bien establecidas, en las que se sabe que se expresan receptores manosa/fucosa (63,64).

Con el propósito de examinar la fagocitosis de *H. capsulatum* a través del receptor manosa/fucosa, se llevaron a cabo dos tipos de experimentos diferentes: uno por bloqueo y el otro por atrapamiento de receptores. Asimismo, para establecer una comparación de la actividad del receptor manosa/fucosa en la población de macrófagos estudiada, se utilizó *C. albicans* como microorganismo de referencia, ya que es sabido que esta levadura contiene manosa con uniones α 1 \rightarrow 2 y α 1 \rightarrow 6 en su pared (65).

Para promover un contacto estrecho entre la partícula fago-

citabile o molecula competidora y el fagocito, la fase de adherencia, sea con la adición de los competidores o con el inóculo del parásito, siempre se llevo a cabo a 4° C. y de esta manera se pretendio sincronizar la iniciación de la siguiente fase, la internalización, la cual es estrictamente dependiente de temperatura a 37°C. Este procedimiento es el usualmente utilizado en los trabajos de fagocitosis (12), aunque se han reportado casos en que la adherencia la hacen a 37°C (52,66), temperatura cuestionable para discriminar entre la adherencia y la internalización. En los resultados obtenidos para la fagocitosis de H. capsulatum por bloqueo de receptores con los ligandos competidores (Fig. 1), se puede distinguir una respuesta fagocitica disminuida del macrófago, particularmente cuando se empleo el metil- α -D-manopiranososa como ligando, lo que permite sostener que el receptor manosa/fucosa participa en la fagocitosis de H. capsulatum, sin que esto implique que sea el único receptor que actúe en la interacción macrófago/hongo en el modelo fagocitico estudiado. Los resultados para C. albicans muestran un mayor porcentaje de fagocitosis que H. capsulatum, debido quizás a las características inherentes de su pared celular. Por lo general, el porcentaje de fagocitosis de los testigos de H. capsulatum y C. albicans no es muy elevado; sin embargo, es posible pensar que los niveles de fagocitosis reportados en este estudio estan dentro de un comportamiento confiable, en particular si se considera que todo sistema biológico se encuentra expuesto a variables y por lo tanto no funciona a toda su capacidad. Además, las poblaciones de macrófagos obtenidas de animales, aun cuando procedan de cepas

genéticamente puras, singénicas, presentan heterogeneidades morfológicas y funcionales.

Es pertinente examinar la acción de los ligandos competidores de manosa. Si estos bloquean receptores que promueven la internalización del hongo, ¿cómo es que el hongo es internalizado? La respuesta más congruente sería la de que no todos los receptores son bloqueados y que el hongo entra a través de receptores aun disponibles, sin descartar la posibilidad de que además utilice receptores desconocidos. Con seguridad se elimina la posibilidad de que el hongo entre al macrófago vía receptor del complemento, ya que el suero adicionado al medio de cultivo invariablemente fue inactivado a 56° C por 30 min.

A través del empleo de marcadores de superficie se ha visto que los macrófagos tienen una amplia distribución de receptores sobre su membrana celular, que estos son susceptibles de ser concentrados y/o atrapados en una región de la membrana mediante la utilización del sustrato específico para un determinado receptor, lo que conlleva a una disminución de la capacidad fagocítica del macrófago cuando se le reta con la partícula apropiada, debido a la no utilización del receptor atrapado (12,63). Tomando en cuenta este comportamiento, para los experimentos de atrapamiento de receptores (Fig. 5) se utilizó una fuente distinta de manosa, el ácido polimanurónico con uniones glicosídicas β 1 \rightarrow 4, el cual fue adherido al soporte de vidrio empleado para el cultivo de macrófagos. En estos experimentos no sólo se trataba de probar una fuente distinta de manosa, sino también una estrategia diferente, la cual presentaba algunas incógnitas: ¿sería el ma-

crófago capaz de reconocer este ligando? O bien, ¿ sería capaz el macrófago de no discriminar entre un ligando α o β ? Considerando estas situaciones, ¿ se daría la migración de los receptores para quedarse atrapados sobre la capa del ácido polimanurónico? Y por último, ¿ sería capaz *H. capsulatum* de diferenciar receptores para glicoconjugados con α o β manosa?

La explicación para el uso de un polímero de β manosa en estos experimentos se apoya en el hecho de que la D(+) manosa es un monosacárido que, en su estado soluble, se encuentra en un constante cambio en sus dos formas estereoisómeras: α -D-manosa y β -D-manosa (67). Por tal motivo, se tomó en cuenta la posibilidad de que el macrófago presentara cierta sutileza para distinguir entre las dos formas isómeras: α o β manosa. Cabe mencionar que en la literatura no se ha reportado que el macrófago pudiera discriminar α de β manosas.

Por los resultados obtenidos en los experimentos de atrapamiento de receptores (Fig. 5), se infiere que la internalización de *H. capsulatum* al macrófago no fue sustancialmente inhibida por la presencia del ácido β 1 \rightarrow 4-D-polimanurónico, ya que la diferencia de los valores alcanzados entre la fagocitosis de *H. capsulatum* en ausencia o presencia del ácido no fue crítica. Aun cuando no se tienen evidencias directas que permitan asegurar si efectivamente los receptores manosa/fucosa fueron atrapados sobre el gel de ácido polimanurónico, si se observaron macrófagos adheridos a la lenteja. Además, es conveniente aclarar que no se ha logrado montar un método que permita determinar cuantitativamente el atrapamiento de receptores por un sustrato.

Considerando que los resultados de la fagocitosis de *H. capsulatum* con el ácido β 1 \rightarrow 4-D-polimannurónico son menos relevantes frente a los observados con la D(+)-manosa y el metil- α -D-manopiranososa, se sugiere que el hongo utiliza preferentemente receptores α -manosa para su internalización. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que en el macrófago existan receptores para unir ligandos β -manosa, aunque estos no sean utilizados preferencialmente para la internalización del hongo.

El análisis de los índices fagocíticos con ambos microorganismos, tanto en los experimentos de competencia de ligandos (Figs. 2-4) como en los de atrapamiento de receptores (Figs. 6-8), no muestran cambios puesto que la capacidad de internalización del macrófago no varía con estos tratamientos y, por lo general, fagocitan de 1 a 6 levaduras, lo que corresponde a la relación 5:1 de levaduras/macrófago utilizada. Finalmente, la expresión del índice fagocítico, como lo muestran las figuras 4 y 8, sugiere que los macrófagos predominantemente fagocitan de 1 a 2 levaduras.

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan el planteamiento de que el receptor manosa/fucosa participa en la fagocitosis de *H. capsulatum* en el sistema de macrófagos murinos utilizados, aunque se cree que no sea el receptor primario comprometido con la internalización de levaduras de este hongo.

CONCLUSIONES

El receptor manosa/fucosa, aun cuando participa en la fagocitosis de *H. capsulatum*, no esta criticamente comprometido con la internalizacion de levaduras del hongo.

Es posible que además del receptor manosa/fucosa participen otros receptores en la fagocitosis de levaduras de *H. capsulatum*.

Se sugiere que las levaduras de *H. capsulatum*, al utilizar receptores manosa/fucosa para su internalización, lo hacen preferentemente para receptores α -manosa.

Los receptores para β -manosa no están aparentemente comprometidos con la internalizacion de las levaduras de *H. capsulatum*.

Por lo general, en el modelo fagocito-microorganismo estudiado, los macrófagos fagocitan un promedio de 1 a 2 levaduras.

S U M M A R Y

Information concerning the receptors participation in the phagocytosis of Histoplasma capsulatum fungus is scarce. The present paper is focussed on the role of mannose/fucose murine macrophages receptors in the H. capsulatum yeast phagocytosis. Two types of assays were used, one blocking mannose/fucose receptors with ligands, such as D(+) mannose or methyl- α -D-mannopyranoside, and another by receptors overtaking a semi solid-phase of β 1 \rightarrow 4-D-polymannuronic acid. The phagocytosis of H. capsulatum, in the presence of blocked ligands, showed a smaller percentage than controls (20.5%) and values of 11.5 and 7.5% were obtained by using D(+) mannose and methyl- α -D-mannopyranoside, respectively. Differences between controls and both ligands values were significant ($p < 0.005$). Results with Candida albicans, used as a reference microorganism, showed a 23% of phagocytosis with D(+)mannose and 31% with methyl- α -D-mannopyranoside, whereas 38% with controls. The receptors overtaking assays showed a difference ($p < 0.02$) between the phagocytosis of H. capsulatum controls (40.5%) and those obtained in the presence of β 1 \rightarrow 4-D-polymannuronic acid (29.5%), whereas no difference was obtained when C. albicans developed a higher percentage of phagocytosis than H. capsulatum. The phagocytosis index for both microorganisms was similar in the two types of assays used, and most macrophages phagocytized 1 to 2 yeast, followed by 3 to 6, and very few macrophages phagocytized more than 6.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Velasco-Castrejon, O., H. Fujigaki, 1984. Importancia de la histoplasmosis pulmonar primaria en trabajadores de minas. Neumol. Cir. Torax. Mex. 44: 7-9.
- 2.- Rippon, J., 1988: Medical Mycology, 3a. ed., W. B. Saunders, Philadelphia.
- 3.- Pine, L., 1954. Studies on the growth of Histoplasma capsulatum I. Growth of the yeast phase in liquid media. J. Bacteriol. 68: 671-679.
- 4.- Boguslawski, G., D.A. Stetler, 1979. Aspects of physiology of Histoplasma capsulatum. Mycopathologia 67: 17-24.
- 5.- Eisenberg, L.G., W.E. Goldman, 1987. Histoplasma capsulatum fails to trigger release of superoxide from macrophages. Infect. Immun. 55: 29-34.
- 6.- 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.
- 7.- Wolf, J.E., A.L. Abegg, S.J. Travis, G.S. Kobayashi, J.R. Little, 1989. Effects of Histoplasma capsulatum on murine macrophage functions: inhibition of macrophage priming, oxidative burst, and antifungal activities. Infect. Immun. 57: 513-519.
- 8.- De Robertis, E.D.P., W.W. Nowinski, F.A. Sáez, 1975, Biología Celular, 8a. ed., "El Ateneo", Buenos Aires.

- 9.- Steinman, R.M., Z.A. Cohn, 1974. The metabolism and physiology of the mononuclear phagocytes. In: The Inflammatory Process. Zweifach B.W., L. Grant, R.T. Mc Cluskey (Eds), 2a. ed., Academic Press, New York.
- 10.- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, 1983. Molecular Biology of the Cell, 3rd. ed., Garland Publishing, New York.
- 11.- Shaw, D.R., F.M. Griffin Jr., 1981. Phagocytosis requires repeated triggering of macrophage phagocytic receptors during particle ingestion. Nature 289: 409-411.
- 12.- Sung, S.J., R.S. Nelson, S.C. Silverstein. 1983. Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages. J. Cell Biol. 96: 160-166.
- 13.- Griffin, Jr., F.M., J.A. Griffin, J.E. Leider, S.C. Silverstein, 1975. Studies on the mechanism of phagocytosis I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. J. Exp. Med. 142: 1263-1282.
- 14.- Parod, R.J., J.D. Brain, 1986. Immune opsonin-independent phagocytosis by pulmonary macrophages. J. Immunol. 136: 2041-2047.
- 15.- Babior, B.M., 1984. The respiratory burst of phagocytes. J. Clin. Invest. 73: 599-601.
- 16.- Griffin, Jr., F.M., S.C. Silverstein, 1974. Segmental response of the macrophage plasma membrane to a specific stimulus. J. Exp. Med. 139: 323-336.

- 17.- Griffin, Jr., F.M., J.A. Griffin, S.C. Silverstein, 1976. Studies on the mechanism of phagocytosis II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes. *J. Exp. Med.* 144: 788-809.
- 18.- Aggeler, J., Z. Werb, 1984. Ultrastructural aspects of phagocytosis by macrophages. *Adv. Infl. Res.* 3: 35-54.
- 19.- Dautry-Varsat, A., H.F. Lodish, 1984. How receptors bring proteins and particles into cells. *Sci. Amer.* 250: 52-58.
- 20.- Brodsky, F. M., 1988. Living with clathrin: Its role in intracellular membrane traffic. *Science* 242: 1396-1402.
- 21.- Lemmon, S.K., E.W. Jones, 1987. Clathrin requirement for normal growth of yeast. *Science* 238: 504-509.
- 22.- Adams, D.O., T.A. Hamilton, 1984. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 283-316.
- 23.- Silverstein, S.C., R.M. Steinman, Z.A. Cohn, 1977. Endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 669-722.
- 24.- Unkeless, J.C., 1977. The presence of two Fc receptors on mouse macrophages: evidence from a variant cell line and differential trypsin sensitivity. *J. Exp. Med.* 145: 931-947.
- 25.- Diamond, B., D.E. Yelton, 1981. A new Fc receptor on mouse macrophages binding IgG3. *J. Exp. Med.* 153: 514-519.
- 26.- Leslie, R.G.O., 1982. The characterization of cell receptors for IgG. *Immunol. Today* 3: 265-267.
- 27.- Ross, G. D., E.M. Rabellino, 1979. Identification of a neutrophil and monocyte complement receptor (CR3) that is distinct from lymphocyte CR1 and CR2 and specific for a site

- contained within C3bi. Fed. Proc. 38: 1467.
- 28.- Fearon, D.T., 1980. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte, and monocyte. J. Exp. Med. 152: 20-30.
- 29.- Townsend, R., P. Stahl, 1981. Isolation and characterization of a mannose/N-acetylglucosamine/fucose-binding protein from rat liver. J. Biochem. 124: 209-214.
- 30.- Lang, T., C. de Chastellier, 1985. Fluid phase and mannose receptor-mediated uptake of horseradish peroxidase in mouse bone marrow-derived macrophages. Biochemical and ultrastructural study. Biol. Cell 53: 149-154.
- 31.- Imber, M.J., S.V. Pizzo, W.J. Johnson, D.O. Adams, 1982. Selective diminution of the binding of mannose by murine macrophages in the late stages of activation. J. Biol. Chem. 257: 5129-5135.
- 32.- Shepherd, V.L., E.J. Campbell, R.M. Senior, P.D. Stahl, 1982. Characterization of the mannose/fucose receptor on human mononuclear phagocytes. J. Reticuloendothel. Soc. 32: 423-431.
- 33.- Mokoena, F., S. Gordon, 1985. Human macrophage activation. Modulation of mannosyl, fucosyl receptor activity in vitro by lymphokines, gamma and alpha interferons, and dexamethasone. J. Clin. Invest. 75: 624-631.
- 34.- Villiger, B., D.G. Kelley, W. Engleman, C. Kuhn III, J.H. McDonald, 1981. Human alveolar macrophage fibronectin: synthesis, secretion, and ultrastructural localization during

- receptors during receptor-mediated phagocytosis. *J. Cell Biol.* **26**: 887-895.
- 42.- Vincendeau, P., M. Daeron, S. Daulouede. 1986. Identification of antibody classes and Fc receptors responsible for phagocytosis of *Trypanosoma musciv* by mouse macrophages. *Infect. Immun.* **53**: 600-605.
- 43.- Erlenberger, A.G., V. Nussenzeig, 1977. The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. *J. Exp. Med.* **145**: 357-371.
- 44.- Wright, S.D., S.C. Silverstein, 1983. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J. Exp. Med.* **158**: 2016-2025.
- 45.- Hart, P.H., L.K. Spencer, A. Nikoloutsopoulos, H.F. Lopez, M.A. Vadas, P.J. McDonald, J.J. Finlay-Jones. 1986. Role of cell surface receptors in the regulation of intracellular killing of bacteria by murine peritoneal exudate neutrophils. *Infect. Immun.* **52**: 245-251.
- 46.- Ouaisi, M.H., D. Afchain, A. Capron, J.A. Grimaud. 1984. Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature* **308**: 380-382.
- 47.- Kawasaki, T., R. Etoh, I. Yamashina, 1978. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**: 1018-1024.
- 48.- Wileman, T.E., M.R. Lennartz, P.D. Stahl, 1986. Identification of the macrophage mannose receptor as a 175-kDa membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 2501-2505.
- 49.- Channon, J.Y., M.B. Roberts, J.M. Blackwell, 1984. A study

- of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of Leishmania donovani in murine resident peritoneal macrophages. Immunology **53**: 345-355.
- 50.- Blackwell, J.M., R.A.B. Ezekowitz, M.B. Roberts, J.Y. Channon, R.B. Sim, S. Gordon, 1985. Macrophage complement and lectin-like receptors bind Leishmania in the absence of serum. J. Exp. Med. **162**: 324-331.
- 51.- Wilson, M.E., R.D. Pearson. 1988. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes. Infect. Immun. **56**: 363-369.
- 52.- Bullock, W.E., S.D. Wright. 1987. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95, in binding of Histoplasma capsulatum by human macrophages. J. Exp. Med. **165**: 195-210.
- 53.- Taylor, M.L., B. Rico, F. Goodsaid, G. Acosta, 1988. Fcγ receptors in phagocytosis of Histoplasma capsulatum. In: Abstracts of the X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Barcelona.
- 54.- Stahl, P.D., J.S. Rodman, M.J. Miller, P.H. Schlesinger, 1978. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 1399-1403.
- 55.- Damer, J.E., J.G. Hamilton, J.C. Harkin, 1967. Comparative study of the cell walls of the yeastlike and mycelial phases of Histoplasma capsulatum. J. Bacteriol. **94**: 466-474.

- 56.- Damer, J.E., 1971. Monosaccharide and chitin content of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *J. Bacteriol.* 107: 870-877.
- 57.- Taylor, M.L., L.F. Bojaili, 1977. Inmunologia de la histoplasmosis: aislamiento de un complejo polisacarido-proteina con actividad inmunoespecifica a partir de *Histoplasma capsulatum*. *Arch. Invest. Med.* 8: 91-102.
- 58.- Barr, K., R.L. Lester, 1984. Occurrence of novel antigenic phosphoinositol-containing sphingolipids in the pathogenic yeast *Histoplasma capsulatum*. *Biochemistry* 23: 5581-5588.
- 59.- Barr, K., R.A. Laine, R.L. Lester, 1984. Carbohydrate structures of three novel phosphoinositol-containing sphingolipids from the yeast *Histoplasma capsulatum*. *Biochemistry* 23: 5189-5596.
- 60.- Azuma, I., F. Kanetsuna, Y. Tanaka, Y. Yamamura, L.M. Connell, 1974. Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. *Mycopath. Mycol. Appl.* 54: 111-125.
- 61.- Fisher, R.A., 1934. Statistical methods for research workers. 5a. ed., Oliver & Boyd, Edinburgh.
- 62.- Toriello, C., J.L. Rosas, A. Martinez, M.R. Reyes-Montes, P.J. Latgé, M.L. Taylor, 1983. Biochemical studies of polysaccharide-protein antigens from fungi causing systemic mycosis. In: Baxter M. (ed). Proceedings of the VIII Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Massey University, Palmerston North, New Zealand.

- 63.- Stahl, P., S. Gordon, 1982. Expression of a mannosyl-fucosyl receptor for endocytosis on cultured primary macrophages and their hybrids. *J. Cell Biol.* **93**: 49-56.
- 64.- Berton, G., S. Gordon, 1983. Modulation of macrophage mannosyl-specific receptors by cultivation on immobilized zymosan. Effects on superoxide-anion release and phagocytosis. *Immunology* **49**: 705-715.
- 65.- Gorin, P.A.J., J.F.T. Spencer, 1968. Structural chemistry of fungal polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Res.* **23**: 367-417.
- 66.- Warr, G.A., 1980. A macrophage receptor for (mannose/glucosamine)-glycoproteins of potential importance in phagocytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**: 737-745.
- 67.- Lehninger, H.L., 1979. *Biochemistry*, 2a. ed., Worth Publishers, New York.

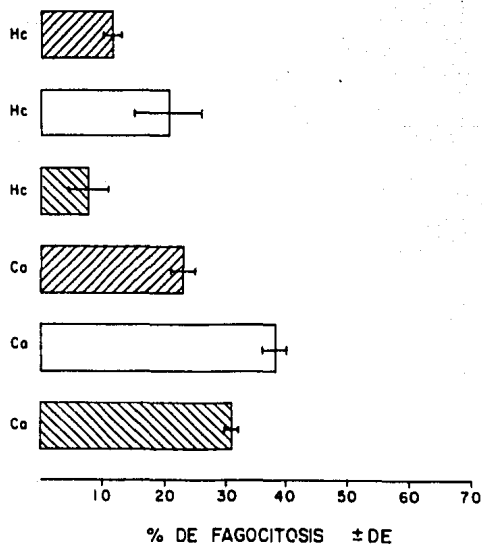


Fig. 1. Porcentaje de fagocitosis de levaduras de *H. capsulatum* o *C. albicans* con competencia de ligandos. Se aplicaron 300 μ l de una solución de β (+)manosa o metil- α -D-manopiranososa (1mg/ml) sobre una monocapa de macrófagos, durante 30 min a 4°C previa infección con levaduras de *H. capsulatum* (H.c) o de *C. albicans* (C.a) en una relación levaduras/macrófago de 5:1. Se sincronizó la adherencia del inoculo a 4°C 1 h y se disparó la fagocitosis a 37°C 1 h (ver detalles en Materiales y Métodos). La determinación de la fagocitosis se realizó en una población de 200 macrófagos por preparación. Se efectuaron 4 experimentos por cuadruplicado. Los resultados expresan la media \pm desviación estándar (DE).

▨ Macrófagos con β (+)manosa; ▩ Macrófagos con metil- α -D-manopiranososa; □ Macrófagos sin ligando competidor.

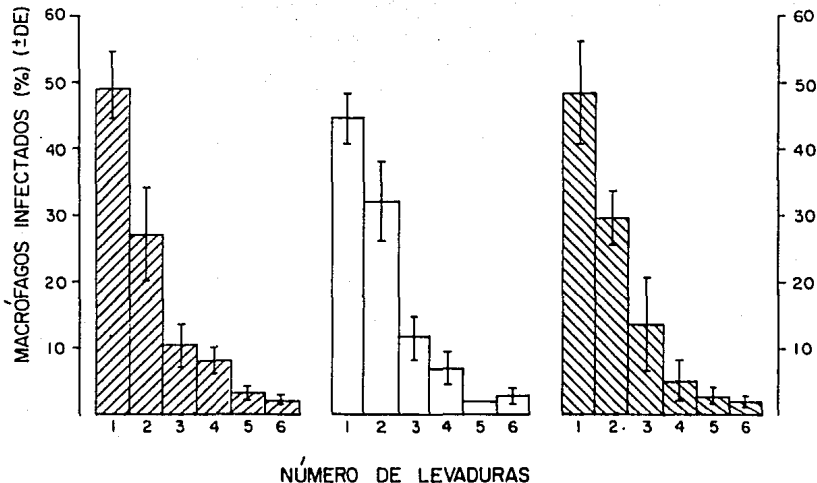





Fig. 2. Porcentaje del índice fagocítico de levaduras de *H. capsulatum* con competencia de ligandos. Los detalles de los experimentos son los mismos descritos en la figura 1. Para la determinación del porcentaje del índice fagocítico se consideró el número de levaduras por macrófago en una población de 200 macrófagos infectados por preparación. Se efectuaron 4 experimentos por cuadruplicado. Los resultados expresan la media \pm desviación estándar (DE).  Macrófagos con D(+)-manosa;  Macrófagos con metil- α -D-manopiranososa;  Macrófagos sin ligando competidor

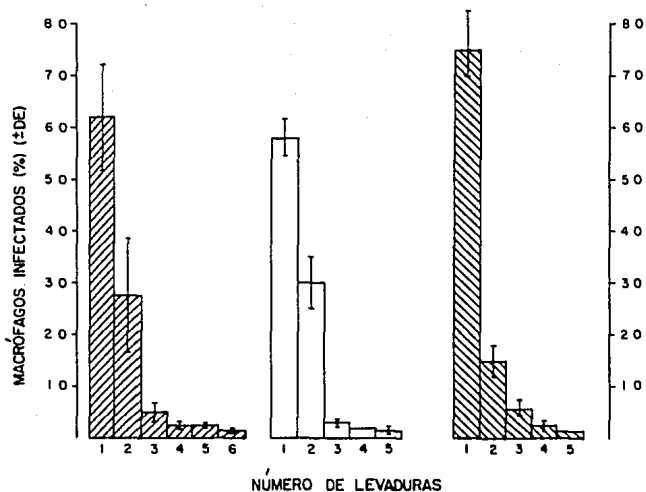





Fig. 3. Porcentaje del índice fagocítico de levaduras de *C. albicans* con competencia de ligandos. Los detalles de los experimentos son los mismos descritos en la figura 1. Para la determinación del porcentaje del índice fagocítico se consideró el número de levaduras por macrófago en una población de 200 macrófagos infectados por preparación. Se efectuaron 4 experimentos por cuadruplicado. Los resultados expresan la media \pm desviación estándar (DE).  Macrófagos con D(+)-manosa;  Macrófagos con metil- α -D-manopiranososa;  Macrófagos sin ligando competidor.

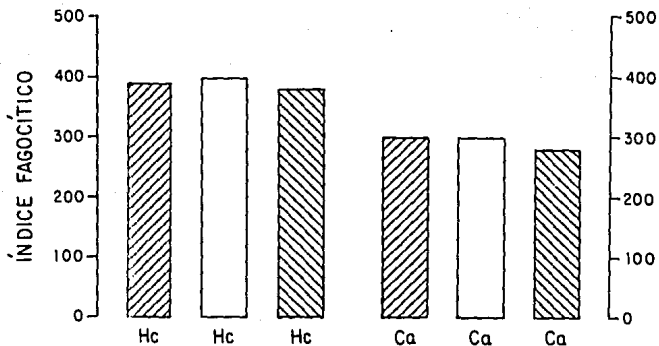





Fig. 4. Índice fagocítico de levaduras de *H. capsulatum* o *C. albicans* con competencia de ligandos. Los detalles de los experimentos son los mismos descritos en la figura 1. Se determinó el índice fagocítico por el número total de levaduras de *H. capsulatum* (H.c) o de *C. albicans* (C.a) fagocitadas en una población de 200 macrófagos infectados.  Macrófagos con D(+);  Macrófagos con metil- α -D-manopiranoasa;  Macrófagos sin ligando competidor.

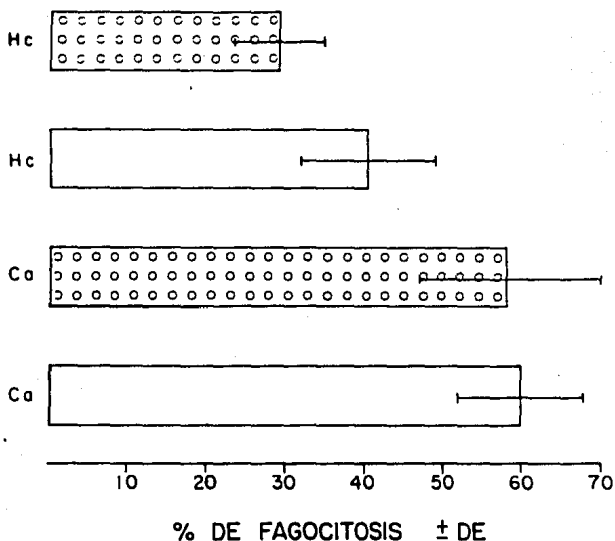




Fig. 5. Porcentaje de fagocitosis de levaduras de *H. capsulatum* o *C. albicans* por atrapamiento de receptores. Se adicionó una población conocida de macrófagos sobre un gel de ácido β 1 \rightarrow 4-D-polimannurónico o directamente sobre lentes de vidrio. Se procedió a la infección de los macrófagos con levaduras de *H. capsulatum* (H.c) o *C. albicans* (C.a) en una relación levaduras/macrófago de 5:1. Se sincronizó la adherencia del inóculo a 4°C 1 h y se dispuso la fagocitosis a 37°C 1 h (ver detalles en Materiales y Métodos). La determinación de la fagocitosis se realizó en una población de 200 macrófagos por preparación. Se efectuaron 4 experimentos por cuadruplicado. Los resultados expresan la media \pm desviación estándar (DE).  Macrófagos sobre el gel de ácido β 1 \rightarrow 4-D-polimannurónico;  Macrófagos adheridos a vidrio.

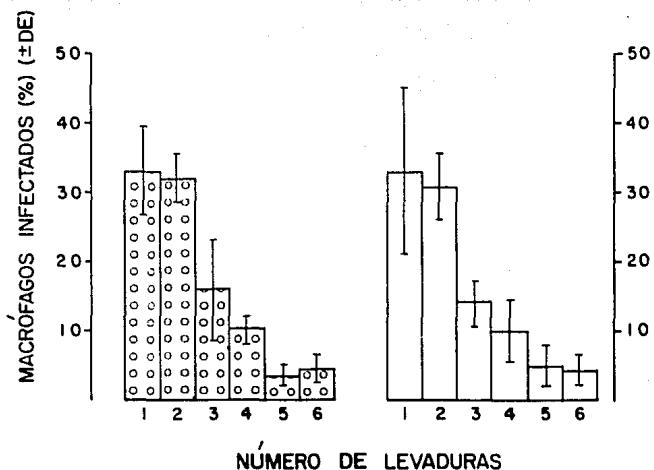




Fig. 6. Porcentaje del índice fagocítico de levaduras de *H. capsulatum* por atrapamiento de receptores. Los detalles de los experimentos son los mismos descritos en la figura 5. Para la determinación del porcentaje del índice fagocítico se considero el número de levaduras por macrófago en una población de 200 macrófagos infectados por preparación. Se efectuaron 4 experimentos por cuadruplicado. Los resultados expresan la media \pm desviación estándar (DE).  Macrófagos sobre el gel de ácido $\beta 1 \rightarrow 4$ D-polimannurónico;  Macrófagos adheridos a vidrio.

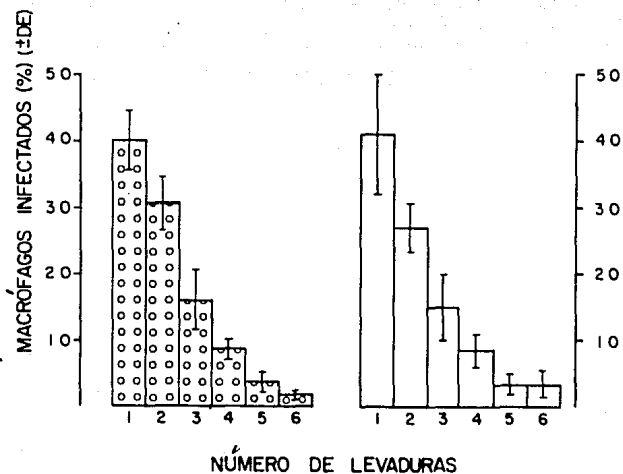




Fig. 7. Porcentaje del índice fagocítico de levaduras de *E. albicans* por atrapamiento de receptores. Los detalles de los experimentos son los mismos descritos en la figura 5. Para la determinación del porcentaje del índice fagocítico se consideró el número de levaduras por macrófago en una población de 200 macrófagos infectados por preparación. Se efectuaron 4 experimentos por cuadruplicado. Los resultados expresan la media \pm desviación estandar (DE).  Macrófagos sobre el gel de ácido β 1 \rightarrow 4-D-glucopiranoico;  Macrófagos adheridos a vidrio.

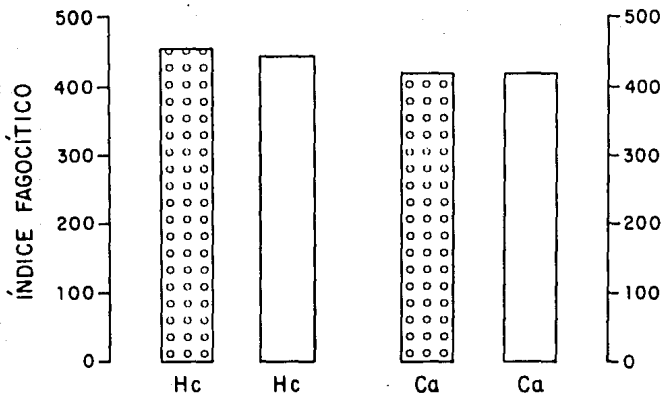




Fig. 3. Índice fagocítico de levaduras de *H. capsulatum* o *C. albicans* por atrapamiento de receptores. Los detalles de los experimentos son los mismos descritos en la figura 5. Se determinó el índice fagocítico por el número total de levaduras de *H. capsulatum* (H.c) o de *C. albicans* (C.a) fagocitadas en una población de 200 macrófagos infectados.  Macrófagos sobre el gel de ácido β 1 \rightarrow 4-D-polimannurónico;  Macrófagos adheridos a vidrio.

APÉNDICE

Medios, reactivos y soluciones.

Medio BHI (Infusión de cerebro-corazón)

BHI (Bioxon de México)-----	37	g
Agua destilada-----	1	l
Suplemento: Hidrocloruro de L-cisteína (J.T. Baker Chem. Co.)-----	1	g
Glucosa-----	10	g
Gentamicina (Sheramex)-----	100	µg/ml

El medio BHI se hidrata, se disuelve a calor, se deja herbir un min y se le agrega la glucosa. Se esteriliza en autoclave a 15 lb de presión durante 25 min y posteriormente se adiciona la cisteína y la gentamicina esterilizadas por filtración con membrana Millipore de 0.22 µm.

RPMI-1640

RPMI-1640 con glutamina (Gibco, Grand Island Biological Co., N.Y.)-----	10.4	g
Agua destilada-----	1	l
Suplemento: Bicarbonato de sodio -----	2	g
HEPES (Ac. N-2-hidroxiethylpiperazina-N'2- etanosulfónico) (Sigma Chemical Co., St.- Louis, Mo.)-----	0.2	g
Gentamicina (Scheramex)-----	100	µg/ml
Suero fetal de ternera (In Vitro, México)-	15	%

Después de la hidratación del medio RPMI se incorporan todos los ingredientes a excepción del suero, el cual se adiciona

en el momento de su uso, previa descomplementarización a 56°C por 30 minutos. Se esteriliza por filtración con membrana Millipore de 0.22 μ m.

Amortiguador salino de fosfatos (HSE) 0.03 M pH 7.2

Cloruro de sodio (NaCl)-----	8 g
Cloruro de potasio (KCl)-----	0.2 g
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)-----	1.15g
Fosfato ácido de potasio (KH ₂ PO ₄)-----	0.2 g
Agua destilada-----	l l

Se esteriliza en autoclave a 15 lb de presión por 30 minutos.

Solución de Dilitamendia

D(+)-manosa -----	1 mg/ml
-------------------	---------

La manosa se disuelve en RPMI-1640 con suero. Se esteriliza por filtración con membrana Millipore 0.22 μ m.

Solución de metil- α -D-manopiranososa

Metil- α -D-manopiranososa (Sigma)-----	1 mg/ml
--	---------

El metil- α -D-manopiranososa se disuelve en RPMI-1640 con suero. Se esteriliza por filtración con membrana Millipore de 0.22 μ m.

Solución de ácido polimanurónico (Ac. 6-1 \rightarrow di- β -polimanurónico/ Ac. β -glucónico) (Sigma)

Se prepara una dilución 1:100 en amortiguador salino de fosfatos. Se esteriliza en autoclave a 15 lb de presión por 30 minutos.

Solución de azul de tripano

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

solución de colorante de Wright

Colorante de Wright en polvo (Sigma)-----	0.3 g
Glicerol-----	3 g
Alcohol metilico absoluto (Baker)-----	97 ml

Se macera el colorante en un mortero y se añade el glicerol. Se adiciona el alcohol y se mezcla vigorosamente. Se guarda por 1 mes en la obscuridad. Se filtra antes de su uso. La solución siempre se mantiene en un frasco ambar.

Amortiguador de fosfato de sodio pH 7.2 (utilizado en la técnica de tinción de Wright).

Fosfato monobásico de sodio (Baker)-----	1.63 g
Fosfato dibásico de sodio -----	3.2 g
Agua destilada-----	1 l

Solución de cloruro de amonio (NH₄Cl)

Solución A:

NH ₄ Cl -----	4.15 g
Agua destilada-----	500 ml

Solución B: ajustada a pH 7.65

Tris (base)-----	2.06 g
Agua destilada-----	100 ml

Se mezclan 450 ml de la solución A y 50 ml de la solución B