



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"IDENTIFICACION DE PROTEINAS DE MEMBRANA DE  
MACROFAGOS MURINOS QUE INTERACCIONAN CON  
COMPONENTES DEL HONGO PATOGENO

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  
DUARTE ESCALANTE ESPERANZA



MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>2</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>12</b>
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVO PARTICULAR.....</b>	<b>14</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>15</b>
<b>Microorganismos.....</b>	<b>15</b>
<b>Antígenos.....</b>	<b>15</b>
<b>Animales.....</b>	<b>15</b>
<b>Células.....</b>	<b>16</b>

Obtención de proteínas de membrana de macrófagos.....	16
Cuantificación de proteínas.....	17
Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de moléculas solubles de membrana de macrófagos.....	17
Electroinmunotransferencia.....	20
RESULTADOS.....	23
Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de moléculas solubles de membrana de macrófagos.....	23
Electroinmunotransferencia y reacción con histoplasmina.....	24
DISCUSION.....	26
CONCLUSIONES.....	30
BIBLIOGRAFIA.....	31

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1. Esquema de obtención de proteínas de macrófagos...37

FIGURA 2. Esquema de determinación de receptores de macrófagos que reconocen componentes de *H. capsulatum*..... 38

FIGURA 3. SDS-PAGE de moléculas solubles de membrana de macrófagos en geles con gradiente de 10-15 % de poliacrilamida..... 39

FIGURA 4. SDS-PAGE de moléculas solubles de membrana de macrófagos en geles con gradiente de 8-25 % de poliacrilamida..... 40

FIGURA 5. Interacción de moléculas solubles de membrana de macrófagos peritoneales de ratón con componentes del hongo *H. capsulatum* presentes en el filtrado histoplasmina a partir de la transferencia de geles con un gradiente de 10-15 % de poliacrilamida..... 41

**FIGURA 6.** Interacción de moléculas solubles de membrana de macrófagos peritoneales de ratón con componentes del hongo *H. capsulatum* presentes en el filtrado histoplasmina a partir de la transferencia de geles con un gradiente de 8-25 % de poliacrilamida.....42

**FIGURA 7.** Testigo de transferencia sin incubación con histoplasmina.....43

**TABLA 1.** Pesos moleculares de los polipéptidos solubles de membrana de macrófagos determinados en geles con gradiente de 8-25 % de poliacrilamida.....44

## RESUMEN

El contacto inicial entre el parásito y los receptores de la membrana plasmática del fagocito, juega un papel importante en el destino final de los parásitos fagocitados. Con el propósito de identificar las moléculas solubles de membrana de macrófagos que actúan como posibles receptores para componentes de Histoplasma capsulatum, en el modelo murino, se planteó el presente trabajo.

Se utilizaron ratones machos singénicos de la cepa BALB/c, divididos en dos grupos, ratones no inmunes e inmunizados intraperitonealmente con levaduras muertas de H.capsulatum, de los cuales, se procedió a la obtención de moléculas solubles de membranas de macrófagos peritoneales. Para la determinación de las moléculas que reconocen espontáneamente componentes de H.capsulatum se realizó una electroforesis de éstas en SDS-PAGE seguido de transferencia a papel de nitrocelulosa. La identificación de los componentes solubles que reconocen fracciones antigénicas de Histoplasma se realizó en presencia del antígeno crudo histoplasmina, seguido de lavado y reacción con anticuerpos anti-H.capsulatum presentes en suero humano de pacientes con histoplasmosis. Para el revelado se utilizó el método de ELISA, con el sistema estreptoavidina-peroxidasa/anti-gammaglobulina humana biotinilada. Se procesaron muestras en ausencia de histoplasmina como testigo.

Los resultados obtenidos utilizando geles con gradientes de poliacrilamida de 10-15 y 8-25 % al proceder la electroforesis de las moléculas solubles de membrana de macrófagos, muestran un patrón de varias bandas para las moléculas de macrófagos inmunes y no inmunes, siendo que la mayoría se observan en el rango de 26 a 84 kDa, además se distinguen bandas de peso molecular alto de 119 y 180 kDa. Las transferencias a papel de nitrocelulosa permiten plantear que hay un reconocimiento, entre algunas proteínas de membrana y componentes de la histoplasmina, que se expresa por la presencia de dos bandas que corresponden a 68 y 180 kDa, observadas en las proteínas transferidas tanto de macrófagos procedentes de ratones inmunes como de normales.

## INTRODUCCION

Los macrófagos, en concierto con los mecanismos inmunes humorales y celulares son los efectores finales en la destrucción de muchos parásitos, una vez que los han ingerido. El estudio de la interacción de los macrófagos con los parásitos involucra reconocimiento molecular, y el entendimiento de cómo estas interacciones contribuyen a la eliminación de invasores o a su capacidad de sobrevivir en el hospedero, es fundamental para el avance del conocimiento de las enfermedades infecciosas.

La histoplasmosis es una infección producida por un parásito intracelular facultativo, el hongo dimórfico *H. capsulatum* var. *capsulatum* Darling 1906, que en un hospedero susceptible se presenta bajo la forma de levadura ovalada de 2 a 4  $\mu\text{m}$  con gran afinidad por el sistema fagocítico mononuclear. Este hongo en la naturaleza se encuentra en forma micelial y posee dos tipos de esporas; macroconidia (8-19  $\mu\text{m}$  de diámetro) y microconidia (2-4  $\mu\text{m}$  de diámetro). Estas últimas, junto con pequeños fragmentos de hifas son las formas infectantes del hongo, y al ser dispersadas e inhaladas se instalan en el tejido pulmonar, donde se



transforman en levaduras, posiblemente en macrófagos alveolares, al encontrar las condiciones adecuadas para su sobrevivencia (1, 2).

El estudio de la biología de los macrófagos, ha determinado que éstos poseen "capacidades", definiendo éstas como un atributo cuantificado bioquímica e inmunológicamente, o bien, como un rasgo característico de la composición o metabolismo de estas células. Las capacidades de los macrófagos pueden dividirse en tres categorías. La primera, es que contienen constituyentes intracelulares importantes para su metabolismo fundamental y la degradación de materiales ingeridos. La segunda, la capacidad para "reconocer" a través de moléculas solubles de naturaleza glicoprotéica en su mayoría y que funcionan como receptores celulares dispuestos en su superficie y que interaccionan con moléculas extremadamente variadas del medio ambiente. La tercera, es la capacidad para sintetizar y secretar una amplia variedad de productos, muchos de los cuales, con implicación homeostásica que pueden actuar intra y/o extracelularmente (3, 4).

Es conveniente mencionar que siendo el macrófago la célula del hospedero que determina el destino final del hongo, es de gran importancia el conocimiento de como se lleva a cabo

la interacción hospedero/parásito a nivel de célula/célula, por lo que mencionaremos algunos conceptos del proceso fagocítico.

La endocitosis es una función celular que se puede denominar como, la capacidad de ingerir sustancias solubles y particuladas, las cuales son encerradas en una porción de la membrana plasmática del fagocito, seguida de invaginación y posterior formación de una vesícula intracelular que contiene el material ingerido. La actividad endocítica ha sido dividida en dos categorías: fagocitosis, o comer, y pinocitosis, o beber. Muchos investigadores utilizan el término fagocitosis para describir la entrada de partículas grandes, por ejemplo las que son visibles a la microscopía de luz. El término pinocitosis es usado para describir la entrada de partículas muy pequeñas o sustancias variadas, desde moléculas pequeñas a macromoléculas solubles (enzimas, hormonas, anticuerpos, toxinas) y solutos fluidos de bajo peso molecular (5).

El término endocitosis también se ha empleado para denominar la ingestión de moléculas solubles a través de receptores y se ha llamado "fagocitosis mediada por receptores", que es equivalente a lo que llaman "pinocitosis mediada por receptores" (6).

Actualmente se denomina fagocitosis exclusivamente a la etapa de ingestión (también llamada internalización), separando los eventos posteriores del proceso fagocítico en, fusión fagosoma-lisosoma, digestión y exocitosis. La etapa de ingestión ha sido dividida en dos fases; la primera se denomina adherencia y está dada por el contacto inicial entre la partícula a ser ingerida y moléculas de la superficie del fagocito, y la segunda es propiamente la ingestión de la partícula. La adherencia de la partícula a la superficie de la célula fagocítica, generalmente ocurre independientemente de la temperatura y no necesita de gasto energético, mientras que la ingestión es dependiente de temperatura y requiere de un alto gasto de energía (5).

Cabe mencionar que la fagocitosis es un proceso muy selectivo, requiriendo interacciones de reconocimiento fino entre la superficie de la partícula a ser ingerida y la membrana plasmática del fagocito. El fagocito puede discriminar entre partículas "ingeribles" y "no ingeribles", que se localizan en la proximidad de su membrana plasmática (7).

Cuando la partícula ha sido englobada por una porción de la membrana plasmática y se ha formado el fagosoma, ocurre una serie de eventos encaminados a digerirla. Inicialmente, se

presenta la acidificación del fagosoma, posteriormente éste es dirigido al centro de la célula donde se fusiona con lisosomas primarios, iniciándose así el proceso de la digestión (8).

A pesar de que se desconocen a la fecha muchos de los eventos moleculares que intervienen en la formación del binomio hongo/fagocito, se cree que el contacto inicial, dado por la unión del hongo a los receptores de la membrana plasmática del fagocito, juega un papel importante en el destino final de las células fúngicas.

La membrana plasmática de macrófagos contiene un gran número y variedad de proteínas, glicoproteínas y glicolípidos para su regulación y función efectora. Existen varios tipos de receptores orientados externamente en la membrana plasmática y que han sido claramente implicados en la capacidad para ingerir partículas a través de estructuras de reconocimiento apropiadas, entre ellos se pueden citar: (a) receptores para la región Fc de varias inmunoglobulinas, entre los que se encuentran el Fc $\gamma$ RI (CD64), el Fc $\gamma$ RII (CDw32) y el Fc $\gamma$ RIII (CD16); (b) receptores para algunas proteínas del complemento como CRI (CD35) para C3b/C4b y CR3 (C11b/CD18) para C3bi; (c) receptores que participan en la adhesión entre células y que pertenecen a la superfamilia de las

integrinas, como LFA-1 (CD11a/CD18) y p150.95 (CD11c/CD18); (d) receptores tipo lectinas como el manosa-fucosa (MFR) para glicoconjugados de manosa o fucosa-GlcNAc y el  $\beta$ -glucana para zimosano; (e) receptores para matrices extracelulares como fibronectina, laminina, etc.; (f) receptores para varias lipoproteínas de baja densidad (BVLDL, apo E); (g) receptores para diferentes moléculas como transferrina, lactoferrina,  $\alpha$ -2-macroglobulinas y otros (4, 9, 10).

La propiedad distintiva del receptor Fc $\gamma$ RI está relacionada con la alta afinidad para su ligando, este receptor está presente en monocitos y macrófagos, mientras que en neutrófilos humanos es inducible por interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). En monocitos y varias líneas celulares obtenidas a partir de éstos, su expresión puede ser aumentada más de veinte veces por interferón gamma. Las moléculas Fc $\gamma$ RII están ampliamente distribuidas, se encuentran en casi todas las células, con excepción de las células NK. La distribución de Fc $\gamma$ RIII está restringida solamente a macrófagos y líneas celulares de éste, células NK, células precursoras mieloides y líneas celulares de neutrófilos (11).

Estudios realizados con macrófagos de ratón también han reconocido tres distintos receptores para la porción Fc de las IgG, designados como FcγRI de alta afinidad, sensitivos a la tripsina, que se unen a IgG2a, FcγRII que se unen a IgG1 e IgG2b y FcγRIII que se unen a IgG3, ambos de baja afinidad (11-14).

Los receptores FcγRI y FcγRII, cuando se unen a sus ligandos, pueden estar acoplados a diferentes mecanismos de señales de transducción. Se ha reportado que el receptor FcγRI aumenta la actividad de la fosfolipasa A2 y está relacionado con la cascada del ácido araquidónico, mientras que el receptor FcγRII se ocupa de mediar la elevación del AMP cíclico intracelular (4).

Por otra parte, estudios dirigidos hacia los receptores para complemento han planteado que estos receptores en macrófagos son responsables en muchos casos de la unión e ingestión de blancos opsonizados (4, 15, 16).

En el proceso de reconocimiento inicial y adherencia de levaduras de *H. capsulatum* por células fagocíticas, se ha estudiado la interacción ligando-receptor entre levaduras no opsonizadas y macrófagos cultivados humanos derivados de

monocitos de sangre periférica y los resultados indican que la adherencia es dependiente de temperatura y de la presencia de cationes divalentes  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ , y además, que la adherencia está mediada por la familia de receptores CR3/LFA-1/p150.95, siendo que cada uno de estos receptores puede mediar la unión de levaduras del hongo independientemente (17). Este reconocimiento implica que el hongo tenga en su superficie ligandos para las integrinas CR3/LFA-1/p150.95, y la trascendencia de estos hallazgos para la relación hospedero/parásito no es todavía clara. La unión de levaduras no opsonizadas de *H. capsulatum* a éstas integrinas fue descrita inicialmente por Bullock y Wright (17). Schnur y Newman (18), demostraron la participación del complejo CD18 en la unión a las levaduras. Las células fúngicas reconocen en macrófagos cultivados y en neutrófilos humanos, componentes de membrana, especialmente la cadena  $\beta$  de las integrinas CR3, LFA-1, y p150.95 (17-19).

La posible participación de IgG y C3bi como opsoninas séricas, promoviendo un aumento de la fagocitosis de levaduras por polimorfonucleares humanos ha sido planteada por Bullock y Wright (17) y por Schnur y Newman (18); también fueron investigados en fagocitos humanos, los receptores manosa/fucosa no encontrándose, sin embargo, una actividad importante de éstos en la internalización de Histoplasma (17).

El estudio de receptores para la internalización de levaduras de *H. capsulatum* en el modelo de fagocitos murinos fue inicialmente abordado por Jeréz y Taylor (20) utilizando macrófagos peritoneales de ratón que están enriquecidos en receptores manosa/fucosa, y siguiendo dos tipos de ensayos: uno por bloqueo de receptores con ligandos competidores D (+) manosa o metil- $\alpha$ -D-manopiranosas, y el otro por atrapamiento de receptores en un gel de ácido  $\beta$  1-4-D-polimanurónico. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran una participación pobre de estos receptores en la fagocitosis de levaduras y confirman las observaciones de Bullock y Wright (17) realizadas en fagocitos humanos.

Rico-Galindo (21) al estudiar receptores murinos Fc $\gamma$ , por una metodología de iodización de proteínas de membrana de macrófagos y por la técnica de formación de rosetas con eritrocitos cubiertos con anticuerpos, en una línea celular de macrófagos (J774.2), infectando éstos con levaduras opsonizadas del hongo, mostró que los receptores Fc $\gamma$  participan en la internalización del hongo por los macrófagos, sin embargo, no aceleran esta etapa del proceso fagocítico. Parece ser que estos receptores son parcialmente reciclados a la membrana de la célula fagocítica después de cumplirse 30-60 min de fagocitosis de las levaduras opsonizadas con IgG anti-Histoplasma.



Aún cuando existen trabajos dirigidos hacia el estudio de receptores de macrófagos que intervienen en el proceso fagocítico, quedan muchas interrogantes acerca de como se lleva a cabo la interacción hospedero/parásito y que determina el destino final del parásito, por lo que este campo de investigación permanece abierto.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al poseer el macrófago en su membrana plasmática un gran número y variedad de moléculas solubles de superficie como proteínas, glicoproteínas, entre otros, que participan en diferentes funciones celulares, es vital conocer algunos de estos componentes que juegan un papel importante en la relación hospedero/parásito, ya que se ha demostrado que el contacto inicial entre el parásito y los receptores de la membrana plasmática del fagocito, es crítico para el destino final de los parásitos fagocitados.

Con el propósito de identificar moléculas solubles de membrana de macrófagos que actúan "naturalmente" como posibles receptores para componentes de *H. capsulatum*, en el modelo murino, se planteó el presente trabajo.

## **HIPOTESIS**

Existe una interacción entre moléculas solubles de membrana de macrófagos peritoneales de ratón y componentes de H. capsulatum.

## **OBJETIVO GENERAL**

Aportar nuevos conocimientos a la relación hospedero-parásito (macrófago/hongo), caracterizando las moléculas que intervienen en la interacción entre fagocitos e *H. capsulatum*.

## **OBJETIVO PARTICULAR**

Identificar las moléculas solubles de membrana de macrófagos que actúan como posibles receptores para componentes de levaduras de *H. capsulatum*, en el modelo murino.

## MATERIALES Y METODOS

**Microorganismos.** Se emplearon dos cepas de Histoplasma capsulatum: la cepa EH46 de menor virulencia y la EH53 de mayor virulencia, pertenecientes al cepario del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM. Las cepas fueron mantenidas en fase micelial a temperatura ambiente en medio de agar-Mycobiotic (Bioxón, México) y en fase levaduriforme a 37°C en medio de infusión-cerebro-corazón (BHI) (Bioxón, Becton Dickinson, México), debidamente suplementado con 0.1% de L-cisteína y 1% de glucosa.

**Antígenos.** El antígeno histoplasmina de fase micelial se obtuvo a partir del filtrado del cultivo de H. capsulatum después de 3-6 meses de incubación a 28°C en medio sintético de Smith (22) enriquecido con asparagina.

**Animales.** Se utilizaron ratones machos singénicos BALB/c, mayores de ocho semanas, divididos en dos grupos de 20 ratones cada uno: a) ratones inmunizados con levaduras de H. capsulatum muertas por calor con la dosis de  $2.7 \times 10^6$

levaduras/ml de amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.2; b) ratones no inmunes.

Los animales fueron mantenidos en condiciones óptimas de singenicidad en el bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

**Células.** Los macrófagos peritoneales obtenidos de los ratones BALB/c, se cultivaron a 37°C con atmósfera húmeda y CO<sub>2</sub> al 5%, en botellas de cultivo (Nunc, Roskilde, Denmark) conteniendo Medio Eagle Modificado por Dulbecco (MEMD) (Gibco, Grand Island Biological Co., N. Y.), debidamente suplementado con 50 µg/ml de gentamicina (Scheramex, México), 2.0 mM L-glutamina, 1.0 mM piruvato de sodio y 20% de suero fetal bovino (Gibco).

**Obtención de proteínas de membrana de macrófagos.** Se empleó un método de extracción con detergentes para separar fracciones enriquecidas de moléculas solubles extraídas de membranas de macrófagos (21). El método consiste en un planteamiento general para solubilizar proteínas de membrana (Fig.1). Una vez que se obtuvieron las fracciones enriquecidas de moléculas solubles, éstas fueron concentradas por centrifugación 10X por un sistema de ultrafiltración en membrana utilizando unidades de

ultrafiltración de Millipore (Millipore Corporation, Bedford, MA.).

**Cuantificación de proteínas.** La determinación de proteínas se llevó a cabo por el método de Lowry y cols. (23).

**Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)** de moléculas solubles de membrana de macrófagos. De manera general se siguió el método descrito por Laemmli (24). La electroforesis fue realizada en dos procedimientos diferentes: uno en geles de 8-25 % de gradiente lineal de poliacrilamida en un aparato Phast-System (Pharmacia LKB, Biotechnology S-751 82 Uppsala, Sweden) con tiras de amortiguador SDS y reactivos complementarios de Pharmacia; el otro, en geles con gradiente de 10-15% de poliacrilamida en un aparato Protean II Slab Cell (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA.) a un voltaje constante de 100 v durante 3 h en amortiguador de corrimiento pH 8.3, constituido por 0.025 M Tris-base (Tris-hidroximetil aminometano), 0.192 M glicina y 0.1 % de SDS. Las muestras fueron preparadas en una dilución 1:2 en amortiguador conteniendo: 1 ml de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 0.8 ml de glicerol; 1.6 ml de SDS al 10 %, 0.4 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.2 ml de azul de bromofenol al 0.1 % y 4.0 ml de agua desionizada. Para las muestras procesadas por el

Phast-System, éstas fueron preparadas a una dilución 1:2 en amortiguador conteniendo 0.01% de azul de bromofenol, 2.5 % de SDS y 5 % de  $\beta$ -mercaptoetanol. Los viales conteniendo las muestras de moléculas solubles de membrana de macrófagos/amortiguador fueron sometidos a ebullición en baño María por 10 min, este procedimiento se siguió en ambos casos. Se utilizaron estándares de peso molecular, en el rango de 14.2-66 kDa y de 26-180 kDa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.).

Para el procedimiento realizado en el aparato Phast-System se siguió el siguiente esquema:

Tratamiento del gel.- El gel se extrae del sobre que lo contiene con pinzas y se dobla la punta central con el objeto de tener un punto de apoyo para manejarlo. Se coloca el gel en la base del aparato (cuadro rojo), en el que previamente se aplicaron 65  $\mu$ l de agua desionizada para fijar el gel por capilaridad, teniendo cuidado que no se formen burbujas. Se absorbe el exceso de agua con un papel filtro y se elimina el celofán que protege el gel. Se colocan las barras de amortiguador-SDS (0.20 M Tricina, 0.20 M Tris-base, 0.55 % SDS, 2.8 % agarosa) sobre el gel, en los extremos superior e inferior del soporte, permitiendo el



contacto con la primera ranura del peine que contiene las muestras.

Aplicación de la(s) muestra(s).- Se aplicaron a razón de 3  $\mu$ l ajustadas a una concentración de 2500  $\mu$ g/ml de proteínas solubles de membrana de macrófagos procedentes de ratones inmunizados con H. capsulatum y 2000  $\mu$ g/ml de proteínas solubles de membrana de macrófagos procedentes de ratones normales no inmunes.

Las muestras se colocaron en el siguiente orden: moléculas solubles de membranas de macrófagos procedentes de ratones inmunizados con H.capsulatum (I) y moléculas solubles de membrana de macrófagos procedentes de ratones normales no inmunes (N).

Se programó el aparato con el siguiente esquema;

a) Aplicación de la muestra:

Inicialmente 1 Vh, seguido de 10 Vh

b) Corrimiento:

Etapas 1 250 V 10.0 mA 3.0 W 15 °C 65 Vh

Etapas 2 50 V 0.1 mA 0.5 W 15 °C 0 Vh

Los geles se tñieron con azul de Coomassie 250R al 0.1 % preparado en 500 ml de metanol, 100 ml de ácido acético y cbp 1000 ml de agua desionizada. Posteriormente se destñieron con la solución al 30.0% de metanol absoluto, 10.0% de ácido acético y 60.0% de agua destilada. Se colocaron en solución preservadora de 10.0% de ácido acético y 10.0% de glicerol. Finalmente, los geles se dejaron secar al aire.

**Electroinmunotransferencia.** Las proteínas obtenidas de membranas fueron sometidas a electroforesis seguida de transferencia a papel de nitrocelulosa, donde se procesaron las reacciones de reconocimiento entre estas proteínas de macrófagos y componentes del hongo presentes en el filtrado histoplasmina, seguido de reacción con anticuerpos anti-H.capsulatum y posterior revelado por inmunoensayo enzimático (ELISA) (25) (Fig.2). Para la transferencia de las proteínas se empleó el método descrito por Towbin y cols.(26). Una vez procesada la electroforesis de las proteínas de membrana de macrófagos, el gel conteniendo las proteínas fue colocado entre papeles de nitrocelulosa de poro de 45  $\mu$  (Bio-Rad) y la transferencia se realizó en un aparato Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) a 4°C con un voltaje constante de 100 V durante 1-2 h, usando amortiguador de transferencia pH 8.3 constituido por 0.025 M Tris-base, 0.192 M glicina y 20% metanol. Después de la transferencia,

se cortó verticalmente el papel de nitrocelulosa en tiras de 0.5 cm, lavándolas con amortiguador salino de Tris (TBS) pH 7.5. Se incubaron las tiras durante 90 min a 22 °C con TBS-albúmina sérica bovina al 3 %. En las etapas posteriores, se agregó el antígeno histoplasmina (3205 µg proteína/ml) diluido 1:10 en TBS-albúmina al 3 % y se incubó toda la noche. Después de lavar con TBS-Tween 0.5 % varias veces, enseguida se adicionó el anticuerpo procedente de paciente con histoplasmosis, con alta actividad anti-Histoplasma en pruebas serológicas. La incubación con anticuerpo anti-Histoplasma se realizó por 3 h a temperatura ambiente seguida de lavado con TBS-Tween 0.5 %. La reacción fue revelada por el método de ELISA (25), con el sistema estreptoavidina-peroxidasa/anti-gammaglobulina humana biotinilada obtenida en cabra (Gibco). El conjugado biotinilado fue diluido en TBS-albúmina 1 %-Tween 0.5 % en conformidad con las indicaciones de la casa comercial. Se incubaron las reacciones en agitación constante a temperatura ambiente durante 90 min. Se lavaron las tiras de papel de nitrocelulosa varias veces con agua desionizada y con TBS-Tween 0.5 % por 10 min cada una. Se agregó a cada tira estreptoavidina-peroxidasa diluida según especificaciones de la casa comercial en TBS-albúmina 1 %-Tween 0.5 % y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con agua desionizada y con TBS-Tween 0.5 durante 10 min cada una. Finalmente, las tiras de nitrocelulosa fueron colocadas en la solución reveladora,

obtenida a partir de la solución estándar del sustrato de 20g de 3-amino-9-etilcarbazole (Sigma) en 2.5 ml de dimetilformamida (Sigma). Se adicionó 2.5 ml de la solución estándar en 47.5 ml de amortiguador de acetato 0.05 M, pH 5.0, se filtró a través de papel Whatman y se agregó 25  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 30 % incubando durante 10 min con agitación. La reacción se evidenció por la aparición de bandas. Enseguida se lavaron las tiras con agua y se secaron a temperatura ambiente. Se procesaron muestras en ausencia de histoplasmina como testigos.

## RESULTADOS

Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de moléculas solubles de membrana de macrófagos.

En la electroforesis realizada con geles de gradiente 10-15% de poliacrilamida, se encontró un patrón de varias bandas, entre las que destacan 12 por ser más evidentes (Fig.3), que se ubican en su mayoría entre los pesos moleculares que están en el rango de 14.2 a 66 kDa del estándar utilizado. Este patrón es idéntico para los diferentes lotes de fracciones de membrana de macrófagos, tanto los provenientes de ratones inmunizados con levaduras de *H. capsulatum*, como los provenientes de ratones normales no inmunizados.

Para la electroforesis realizada con geles de gradiente 8-25% de poliacrilamida, se distingue una mejor separación de los polipéptidos y un patrón de 14 bandas (Fig.4). La determinación de los pesos moleculares de las 14 bandas referidas fue calculada por regresión lineal y se observa en la tabla 1, siendo los pesos moleculares de 26, 33, 39, 44,

45, 46, 54, 55, 56, 68, 84, 105, 119 y 180 kDa que corresponden a pesos moleculares que están en un rango de 26.6 a 180 kDa del estándar utilizado. Nuevamente el patrón electroforético es similar para las dos muestras de los lotes utilizados, tanto para proteínas de macrófagos procedentes de ratones inmunes como las obtenidas de macrófagos de ratones normales no inmunes .

**Electroinmunotransferencia y reacción con histoplasmina.** El estudio de la interacción entre proteínas de membrana de macrófagos y componentes presentes en el filtrado antigénico histoplasmina fue realizado por la transferencia a papel de nitrocelulosa de las proteínas de membrana de macrófagos separadas en la electroforesis en geles con gradiente de 10-15 % o de 8-25 % de poliacrilamida e incubadas en presencia o ausencia de histoplasmina, seguido de tratamiento con suero humano anti-Histoplasma y revelado con el sistema estreptoavidina-peroxidasa con anti-gammaglobulina humana biotinilada mencionado en Materiales y Métodos. Los resultados muestran que existe interacción entre algunas proteínas de membrana y componentes de la histoplasmina. Esta interacción se expresa por la presencia de una banda cuando se utilizaron geles con gradiente de poliacrilamida de 10-15 %. Esta banda corresponde a un peso molecular superior a 66 kDa y se observa en los dos lotes de proteínas

extraídas, tanto de macrófagos de ratones inmunes (I), como de macrófagos de ratones normales no inmunes (N) (Fig. 5).

Por otro lado, la transferencia a papel de nitrocelulosa de las proteínas procesadas en la electroforesis de geles con gradiente de 8-25 % de poliacrilamida e incubadas en presencia de histoplasmina, muestra que la interacción entre proteínas de membrana y componentes de la histoplasmina, está dada por la presencia de dos bandas reveladas, que corresponden posiblemente a los pesos moleculares de 68 y 180 kDa (Fig.6). Estas bandas fueron observadas en la electroforesis de los distintos lotes de proteínas de macrófagos utilizados para la transferencia y sus pesos moleculares corresponden a los señalados anteriormente y fueron calculados por regresión lineal como en la tabla 1.

El testigo de transferencia sin incubación con histoplasmina no muestra ninguna banda revelada (Fig. 7).

## DISCUSION

La fagocitosis de levaduras y microconidia no opsonizadas, de H. capsulatum, por macrófagos derivados de monocitos y por macrófagos alveolares es inhibida por anticuerpos monoclonales específicos para la cadena- $\beta$  (CD18) de las integrinas CR3, LFA-1 y p150.95, lo que indica que los complejos con CD18 median el reconocimiento de ambas fases dimórficas del hongo (18). Sin embargo, la participación más precisa de este componente no aclara todavía el papel real que juegan estos receptores en la fagocitosis de Histoplasma capsulatum, y cuales son los resultados de esta interacción para el destino final del hongo a nivel intrafagocítico.

La información existente sobre la participación de IgG y C3bi como posibles opsoninas séricas en el proceso de fagocitosis de levaduras de H. capsulatum, así como, la de receptores manosa-fucosa y  $\beta$ -glucanas parece indicar que ninguno de estos receptores son los preferenciales para la fagocitosis de H. capsulatum (20).



Por tal motivo, la mayoría de los investigadores que trabajan fagocitosis de *H. capsulatum* siguen buscando el o los receptores más comprometidos con la internalización y procesamiento final del hongo a nivel intracelular.

En un trabajo realizado por Davis y Kuhn (27), se utilizó una adaptación de la técnica de inmunotransferencia para investigar la interacción de unión entre *Trypanosoma cruzi* y células hospederas de mamíferos a nivel molecular. Esta adaptación consiste en hacer reaccionar proteínas de la célula hospedera transferidas a papel de nitrocelulosa con filtrado antigénico de *T. cruzi*, revelando la reacción por ELISA utilizando anticuerpos anti-*T. cruzi*. La interacción de unión específica fue observada entre *T. cruzi* y dos polipéptidos de membrana de células hospederas, con un peso molecular de aproximadamente 32 y 34 kDa.

Este antecedente nos llevó a desarrollar la presente investigación para identificar moléculas de reconocimiento entre célula fagocítica y el hongo *H. capsulatum*, y los resultados sugieren la existencia de moléculas constitutivas de macrófagos peritoneales de ratones, capaces de reconocer componentes de *H. capsulatum* presentes en el filtrado histoplasmina, que son posiblemente polipéptidos de 68 y 180 kDa. Estos resultados constituyen las primeras evidencias de

que existe una interacción natural entre componentes del hongo y proteínas de macrófagos y que esta interacción puede ser dada por receptores en vía de ser mejor caracterizados.

La presencia de las bandas de valor superior a 66 kDa observadas en la figura 5 y las de 68 y 180 kDa de la figura 6, son en realidad producto de la interacción entre proteínas solubles de membrana de macrófagos y componentes de la histoplasmina, puesto que, el testigo sin histoplasmina no muestra bandas reveladas, lo que sugiere que no existe reacción inespecífica.

La caracterización de las bandas encontradas tanto en la transferencia de geles de 10-15 % como en el de 8-25 % de gradiente de poliacrilamida muestra que en el primer gel se observó la banda de menor peso molecular, posiblemente, la de 68 kDa, mientras que los geles con un gradiente más amplio de 8-25 % de poliacrilamida, permitió mejor separación de las moléculas presentes en las muestras de proteínas solubles de membrana de macrófagos y su posterior transferencia y revelado por electroinmunotransferencia, como lo comprueba la presencia de las dos bandas de 68 y 180 kDa.

Además es importante mencionar que este reconocimiento entre los componentes del hongo y proteínas solubles de membrana de macrófagos se da tanto entre las proteínas procedentes de macrófagos inmunizados con *H. capsulatum* como las que se obtuvieron de macrófagos de ratones normales no inmunes, sugiriendo de esta manera que la inmunización de los ratones no indujo la aparición ni tampoco mayor expresión de receptores para este reconocimiento, ya que no se observó ninguna diferencia entre los lotes utilizados. Estos resultados apoyan que posiblemente estos receptores no son inducibles por componentes del parásito y existen en condiciones "naturales" en las células del hospedero.

Por último, este trabajo sigue en su segunda etapa de desarrollo y se están seleccionando proteínas de membrana de macrófagos por su afinidad a diferentes lectinas, para poder caracterizar con más precisión las moléculas o posibles receptores que se unen a los componentes del hongo.

## CONCLUSIONES

Se identificaron, en gradiente de poliacrilamida de 10-15 %, aproximadamente 12 bandas (1 mayor de 66 kDa y las demás entre 66 y 29 kDa), mientras que en gradiente de 8-25 % se distinguen 14 bandas entre 26 y 180 kDa de pesos moleculares.

El patrón electroforético de las moléculas de membrana de macrófagos de ratones inmunes y no inmunes, fue similar para ambos tipos de muestras en las condiciones utilizadas.

La electrotransferencia y la interacción de la histoplasmina con las moléculas transferidas, reveló que ésta reconoce dos bandas de aproximadamente 68 y 180 kDa de peso molecular, mientras que el testigo procesado sin incubación con histoplasmina no presentó reacción.

Los resultados sugieren la existencia de moléculas constitutivas de macrófagos peritoneales de ratones, capaces de reconocer componentes de H. capsulatum.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Rippon, J., 1988. Medical Mycology, 3a. ed., W. B. Saunders, Philadelphia.
  
- 2) Maresca, B., G.S. Kobayashi, 1989. Dimorphism in Histoplasma capsulatum : a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. Microbiol. Rev. 53: 186-209.
  
- 3) Gordon, S., 1986. Biology of the macrophage. J. Cell Sci. Suppl. 4: 267-286.
  
- 4) Adams, D.O., T.A. Hamilton, 1984. The cell biology of macrophage activation. Ann. Rev. Immunol. 2: 283-318.
  
- 5) Silverstein, S.M., R.M. Steinman, Z.A. Cohn, 1977. Endocytosis. Ann. Rev. Biochem. 46: 669-722.

6) 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.

7) Shaw, D.R., F.M. Griffin, 1981. Phagocytosis requires repeated triggering of macrophage phagocytic receptors during particle ingestion. Nature 289 : 409-411.

8) Duarte-Escalante, E., M.E. León-Islas, M.L. Taylor, 1990. Metabolismo oxidativo y aspectos fisiológicos importantes del proceso fagocítico. Rev. Fac. Med. UNAM 23: 377-382.

9) Gordon, S., V.H. Perry, S. Rabinowitz, Chung., Lap-Ping, H. Rosen, 1988. Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. J. Cell. Sci. Suppl. 9: 67-97.

10) Knapp, W., P. Rieber, B. Dorken, R. E. Schmidt, H. Stein., A.E.G.Kr. v.d.Borne, 1989. Towards a better definition of human leucocyte surface molecules. Immunol. Today 10: 253-258.

11) Diamond, B., D.E. Yelton, 1981. A new Fc receptor on mouse macrophages binding IgG<sub>3</sub>. J. Exp. Med. 153: 514-519.

12) Weinshank, R.L., A.D. Luster, J.V. Ravetch, 1988. Function and regulation of a murine macrophage-specific IgG Fc receptor, FcR- $\alpha$ . J. Exp. Med. 167: 1909-1925.

13) Unkeless, J.C., E. Scigliano, V.H. Freedman, 1988. Structure and function of human and murine receptors for IgG. Ann. Rev. Immunol. 6: 251-281.

14) Ravetch, J.V., J. Kinet, 1991. Fc Receptors. Ann. Rev. Immunol. 9: 457-492.

15) Law, A.S.K., 1988. C3 receptors on macrophages. J. Cell Sci. Suppl. 9: 67-97.

16) Ehlenberger, A.G, V. Nussenzweig, 1977. The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. J. Exp. Med. 145: 357-371.

17) 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.

18) Schnur, R.A., S.L. Newman, 1990. The respiratory burst response to Histoplasma capsulatum by human neutrophils. Evidence for intracellular trapping of superoxide anion. J. Immunol. 144: 4765-4772.

19) Newman, S.L., C. Bucher, J. Rhodes, W.E. Bullock, 1990. Phagocytosis of Histoplasma capsulatum yeasts and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages. Cellular cytoskeleton requirement for attachment and ingestion. J. Clin. Invest. 85: 223-230

20) Jerez, M.E., M.L. Taylor, 1989. Estudio del receptor manosa/fucosa en la fagocitosis de levaduras de Histoplasma capsulatum. Rev. Mex. Mic. 5: 241-259.

21) Rico-Galindo, B., 1987. Fagocitosis de Histoplasma capsulatum: Papel de los receptores membranales de macrófagos en el proceso fagocítico. Tesis de Maestría en



Ciencias Biomédicas, División de Estudios de Posgrado,  
Facultad de Medicina, UNAM, México, D. F.

22) Smith, C.E., E.G. Whiting, E.E. Baker, H.G. Rosenberger,  
R.R. Beard, M.T. Saito, 1984. The use of coccidioidin. Amer.  
Rev. Tuberc. Pul. Dis. 57: 330-360.

23) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough., A.L. Farr., R.S. Randall,  
1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J.  
Biol. Chem. 193: 265-275.

24) Laemmli, U.K, 1970. Cleavage of structural proteins  
during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature  
227: 680-685.

25) Voller, A., D.E. Bidwell, A. Bartlett, 1979. The enzyme  
linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts  
of microplate applications. Dynatech Europe Laboratories  
Inc. London.

26) Towbin, H., T. Staehelin., J. Gordon, 1979.  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide

gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. **76**: 4350-4354.

27) Davis, Ch.D., R.E. Kuhn, 1990. Selective binding of Trypanosoma cruzi to host cell membrane polypeptides. Infect. Immun. **58**: 1-6.

OBTENCION DE PROTEINAS DE MACROFAGOS  
(Rico-Galindo, 1987)

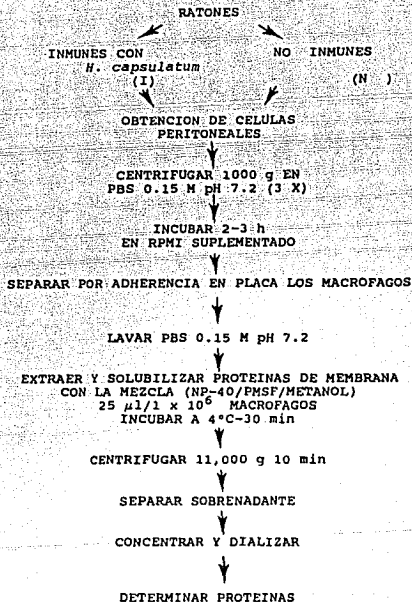


Fig. 1. Esquema de obtención de proteínas de membrana de macrófagos.

Se utilizó el método descrito por Rico-Galindo (21).

DETERMINACION DE RECEPTORES DE MACROFAGOS QUE RECONOCEN  
COMPONENTES DE *H. capsulatum*

PROTEINAS DE MACROFAGOS PERITONEALES DE RATONES SEGUN  
ESQUEMA 1

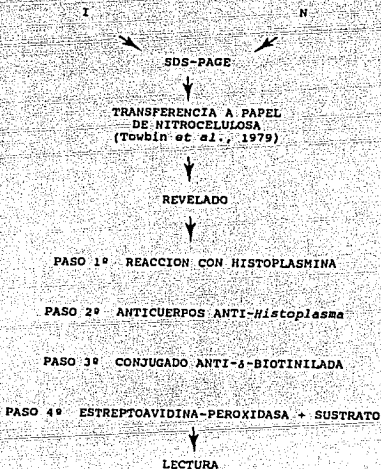


Fig. 2. Esquema de determinación de receptores de macrófagos que reconocen componentes de *H. capsulatum*.

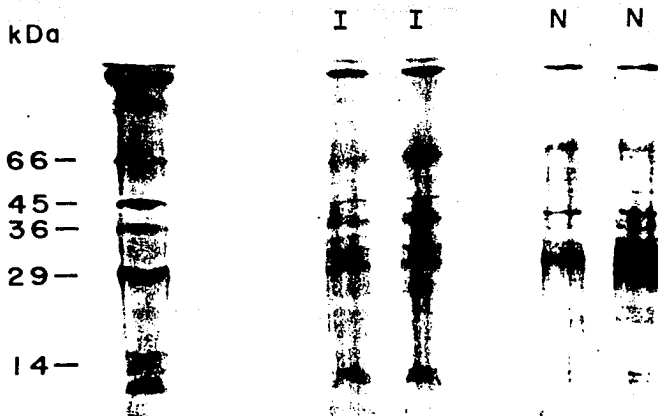


Fig. 3. SDS-PAGE de moléculas solubles de membrana de macrófagos en geles con gradiente de 10-15 % de poliacrilamida.

Se utilizó un estándar de pesos moleculares bajos que se encuentran en un rango de 14.2 a 66 kDa, incluyendo los siguientes marcadores, albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), dehidrogenasa del gliceraldehído 3-fosfato (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.2).

I) Muestra obtenida de ratones inmunizados con H. capsulatum.

N) Muestra obtenida de ratones no inmunes.

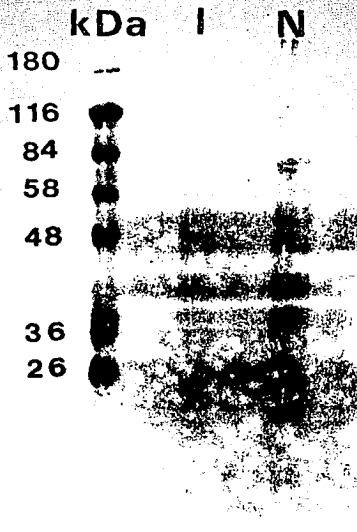


Fig. 4. SDS-PAGE de moléculas solubles de membrana de macrófagos en geles con gradiente de 8-25 % de poliacrilamida.

Se utilizó un estándar de pesos moleculares altos que se encuentran en un rango de 26 a 180 kDa, incluyendo los siguientes marcadores,  $\alpha$ -macroglobulina (180 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (116 kDa), fructosa 6-fosfato (84 kDa), piruvato cinasa (58 kDa), fumarasa (48 kDa), dehidrogenasa láctica (36 kDa) y fosfotriosaisomerasa (26 kDa).

I) Muestra obtenida de ratones inmunizados con *H. capsulatum*.

N) Muestra obtenida de ratones no inmunes.

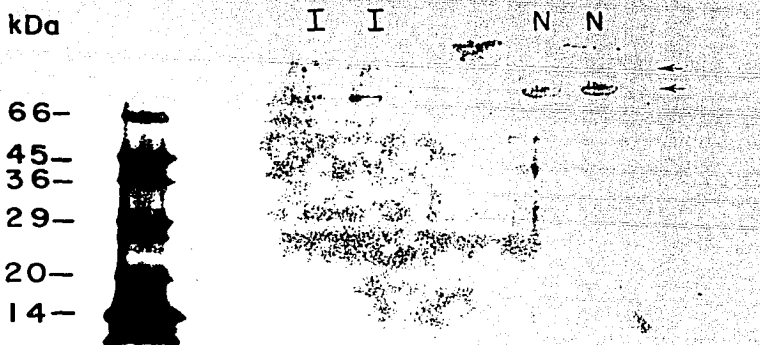


Fig. 5. Interacción de moléculas solubles de membrana de macrófagos peritoneales de ratón con componentes del hongo *H. capsulatum* presentes en el filtrado de histoplasmina a partir de la transferencia de geles con un gradiente de 10-15 % de poliacrilamida.

Se procedió a la electrotransferencia de las muestras sometidas a SDS-PAGE a papel de nitrocelulosa: se incubó el material transferido toda la noche con histoplasmina a 4 °C y posteriormente con suero humano anti-*Histoplasma*. Se reveló la prueba añadiendo anti-gammaglobulina humana biotinilada, seguido de la adición de estreptoavidina/peroxidasa y posterior incorporación del sustrato correspondiente (ver detalles en Materiales y Métodos).

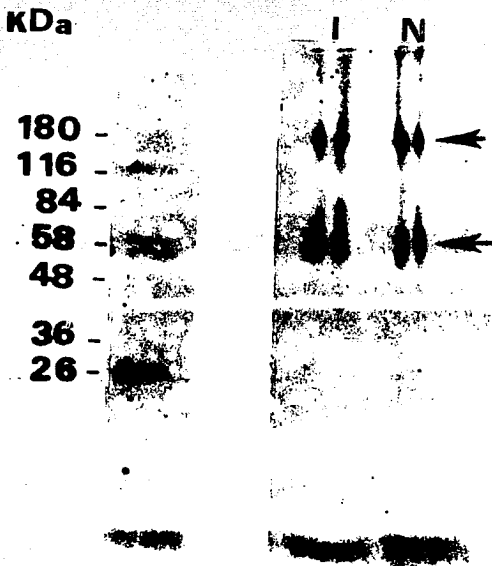


Fig. 6. Interacción de moléculas solubles de membranas de macrófagos peritoneales de ratón con componentes del hongo *H. capsulatum* presentes en el filtrado histoplasmina a partir de la transferencia de geles con un gradiente de 8-25 % de poliácridamida.

Se procedió de manera similar al descrito en la figura anterior.



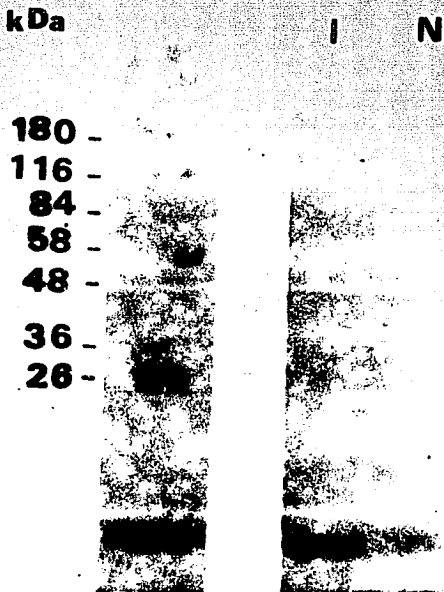


Fig. 7. Testigo de transferencia sin incubación con histoplasmina.

Se procedió a la electrotransferencia de las muestras sometidas a SDS-PAGE a papel de nitrocelulosa: se incubó el material transferido toda la noche con solución salina a 4°C y posteriormente con suero humano anti-Histoplasma. Se reveló la prueba añadiendo anti-gammaglobulina humana biotinilada, seguido de la adición de estreptoavidina/peroxidasa y posterior incorporación del sustrato correspondiente (ver detalles en Materiales y Métodos).

TABLA 1

Pesos moleculares de los polipéptidos solubles de membrana de macrófagos determinados en geles con gradiente de 8-25 % de poliacrilamida.

POLIPEPTIDOS (I)		POLIPEPTIDOS (N)	
Bandas	kDa	Bandas	kDa
1	180	1	180
2	119	2	119
3	105	3	105
4	84	4	84
5	68	5	68
6	56	6	56
7	55	7	55
8	54	8	54
9	46	9	46
10	45	10	45
11	44	11	44
12	39	12	39
13	33	13	33
14	26	14	26

Las muestras de proteínas solubles de membrana fueron obtenidas en macrófagos procedentes de ratones inmunizados con *H. capsulatum* (I) y de ratones normales no infectados (N).

Los valores de kDa fueron obtenidos por regresión lineal.