

00346

7



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios de Posgrado

"CARACTERISTICAS DE LA INTERACCION
TIPO LECTINA DE LEVADURAS DEL
HONGO *Histoplasma capsulatum*
CON CELULAS FAGOCITICAS"

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

P r e s e n t a

BIOLOGA ESPERANZA DUARTE ESCALANTE

289340

Directora de Tesis:

Dra. María Lucía Taylor Da Cunha e Mello

2001



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“CARACTERÍSTICAS DE LA INTERACCIÓN TIPO LECTINA DE LEVADURAS
DEL HONGO *Histoplasma capsulatum* CON CÉLULAS FAGOCÍTICAS”**

Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Biología Celular)

presenta

Bióloga Esperanza Duarte Escalante

FEBRERO 2001

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO

Jefa del Laboratorio de Inmunología de Hongos

Tesis realizada en el

Laboratorio de Inmunología de Hongos

Departamento de Microbiología y Parasitología

Facultad de Medicina, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Maria Lucía Taylor

Por la dirección y apoyo para la realización de este trabajo

Al Dr. Edgar Zenteno Galindo y M. en C. Armando Pérez Torres

Por su valiosa participación en el desarrollo del trabajo y por su asesoría como parte del
Comité Tutorial

Al Comité Evaluador:

Dra. Patricia Rivas Manzano

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dra. Ingeborg Becker Fauser

Dra. Concepción Toriello Nájera

Por la revisión de este trabajo

A mis Compañeros de Laboratorio

Por su solidaridad en el trabajo y su incondicional amistad

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS PARTICULARES	14
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Microorganismos	16
Células hospederas	16
Proteínas de membranas de macrófagos	16
Conjugación de proteínas de membranas de macrófagos a ácidos grasos y su incorporación a liposomas marcados con colesterol tritiado	17
Tratamiento de levaduras con carbohidratos	19
Adherencia de levaduras de <i>H. capsulatum</i> a liposomas-PMM	19
Inhibición de la adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos a liposomas-[1,2- ³ H(N)]-colesterol PMM	20
Inhibición de la adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos a la superficie de macrófagos	20
Adherencia de levaduras de <i>H. capsulatum</i> a eritrocitos de mamíferos	22
Adherencia de levaduras de diferentes cepas de <i>H. capsulatum</i> a eritrocitos humanos de distintos grupos sanguíneos	22
Actividad hemaglutinante de levaduras de <i>H. capsulatum</i>	22
Inhibición de la adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos, a la superficie de eritrocitos	22
RESULTADOS	24
Adherencia de levaduras de <i>H. capsulatum</i> a liposomas-PMM no	

radioactivos	24
Inhibición de la adherencia de levaduras de <i>H. capsulatum</i> tratadas con monosacáridos o disacáridos a liposomas-[1,2-³H(N)]-colesterol-PMM	24
Inhibición de la adherencia de levaduras de <i>H. capsulatum</i> tratadas con carbohidratos, a la superficie de macrófagos	24
Adherencia de levaduras de <i>H. capsulatum</i> a eritrocitos de diferentes especies de mamíferos	26
Adherencia de levaduras de diferentes cepas de <i>H. capsulatum</i> a eritrocitos humanos de distintos grupos sanguíneos	26
Aglutinación de eritrocitos por levaduras de <i>H. capsulatum</i>	27
Inhibición de la adherencia de levaduras de <i>H. capsulatum</i> tratadas con monosacáridos, disacáridos o aminoazúcares, a eritrocitos del grupo sanguíneo O	27
Inhibición de la adherencia de levaduras de <i>H. capsulatum</i> tratadas con glicosaminoglicanos, a eritrocitos del grupo sanguíneo O	28
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS	39

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.	Adherencia de levaduras de <i>H. capsulatum</i> a liposomas-PMM no radioactivos	44
Figura 2.	Inhibición de la adherencia de levaduras de <i>H. capsulatum</i> tratadas con monosacáridos o disacáridos a liposomas-[1,2- ³ H(N)]-colesterol-PMM	45
Figura 3.	Adherencia de levaduras de <i>H. capsulatum</i> a eritrocitos de mamíferos	46
Figura 4.	Adherencia de levaduras de diferentes cepas de <i>H. capsulatum</i> a eritrocitos humanos de distintos grupos sanguíneos	47
Figura 5.	Actividad hemaglutinante de levaduras de <i>H. capsulatum</i>	48
Figura 6.	Inhibición de la adherencia de levaduras de <i>H. capsulatum</i> tratadas con monosacáridos, disacáridos o aminoazúcares, a eritrocitos del grupo sanguíneo O	49
Tabla 1.	Efecto del tratamiento de levaduras de <i>H. capsulatum</i> con monosacáridos, disacáridos o aminoazúcares en la adherencia a macrófagos peritoneales de ratón	50
Tabla 2.	Efecto del tratamiento de levaduras de <i>C. albicans</i> con monosacáridos, disacáridos o aminoazúcares en la adherencia a macrófagos peritoneales de ratón	51
Tabla 3.	Efecto del tratamiento de levaduras de <i>H. capsulatum</i> con diferentes formas de la galactosa en la adherencia a macrófagos peritoneales de ratón, detectado por ELISA	52
Tabla 4.	Efecto del tratamiento de levaduras de <i>H. capsulatum</i> con diferentes formas de la galactosa en la adherencia a macrófagos alveolares de ratón, detectado por ELISA	53
Tabla 5.	Efecto del tratamiento de levaduras de <i>H. capsulatum</i> con glicosaminoglicanos en la adherencia a eritrocitos humanos del grupo sanguíneo O	54

RESUMEN

La existencia de componentes de *Histoplasma capsulatum* (*H. c.*) capaces de reconocer moléculas glicosiladas, en la superficie de macrófagos de ratón, ha sido sugerida con base en la observación de que proteínas de membrana de macrófagos peritoneales (PMM) con residuos terminales D-galactosil, purificadas por afinidad a la lectina de *Abrus precatorius*, están involucradas en la interacción con este hongo. En el presente trabajo, la interacción de levaduras de *H. c.* con moléculas glicosiladas de la superficie de macrófagos de murino fue monitoreada a través de ensayos de inhibición de adherencia de levaduras tratadas con diferentes carbohidratos, y la participación de la galactosa en este reconocimiento fue sistemáticamente demostrada. Se construyeron liposomas a los cuales se incorporaron PMM (liposomas-PMM) y la habilidad de levaduras de *H. c.* de adherirse a liposomas-PMM fue probada, previo tratamiento de las levaduras con diferentes azúcares. Esta adherencia fue inicialmente demostrada a través de una adaptación del método de ELISA. La inhibición de la adherencia se detectó por incubación previa de levaduras con galactosa y lactosa, al monitorear la interacción por cuentas radioactivas del colesterol tritiado asociado a liposomas-PMM. Ensayos posteriores de inhibición de adherencia de levaduras tratadas con diferentes azúcares a macrófagos peritoneales y alveolares completos, al utilizar microscopía de luz y un método de ELISA modificado, demostraron que la β -galactosa es mejor reconocida que su α -anómero. En contraste, el tratamiento de macrófagos con azúcares previa adición de levaduras no tratadas, no inhibió la adherencia de éstas; mientras que la adherencia de levaduras de *Candida albicans* (*C. a.*), utilizadas como testigo, no fue inhibida por la galactosa y moléculas derivadas, lográndose la inhibición sólo con manosa. La adherencia de *H. c.* a eritrocitos de varias especies de mamíferos reveló, que existen diferencias en la especificidad de reconocimiento a moléculas de superficie de los eritrocitos, que la habilidad para adherirse y aglutinar eritrocitos humanos no se pierde con el tratamiento de éstos con neuraminidasa y además, que diferentes cepas de *H. c.* son capaces de adherirse a eritrocitos humanos de distintos grupos sanguíneos, lo que sugiere que el reconocimiento para estructuras galactosiladas de los eritrocitos está bien preservado en este patógeno. Estos hallazgos sugieren la presencia de un componente tipo lectina en las levaduras del hongo, y los ensayos de inhibición de adherencia de levaduras a eritrocitos humanos sugieren además que el OH axial del carbono 4 y el del carbono anomérico de la galactosa, son determinantes en la interacción de la lectina. La inhibición con glicosaminoglicanos que comparten residuos galactosil (condroitín sulfato A y C) y glucosil (heparán sulfato), así como la inhibición con ácido siálico, sugieren que la interacción de *H. c.* con las estructuras glicosiladas y/o sialiladas de los eritrocitos, podría estar también mediada por fuerzas iónicas. La importancia de la interacción de levaduras de *H. c.* (fase parasitaria y virulenta del hongo) con diferentes células del hospedero puede estar asociada a mecanismos de patogenicidad aún no descritos para este parásito y las implicaciones de la interacción mediada por una molécula tipo lectina de *H. c.*, tanto con macrófagos peritoneales y alveolares (primera línea de defensa del hospedero para parásitos de vías respiratorias) como con eritrocitos, abre nuevas interrogantes sobre el destino final de estos tipos de interacciones hospedero-parásito.

ABSTRACT

The presence of molecules expressed over the surface of murine peritoneal macrophages that recognize *Histoplasma capsulatum* (*H. c.*) components have been suggested. Macrophage membrane proteins (MMP) with terminal D-galactosyl residues, purified by affinity chromatography with *Abrus precatorius* lectin, are probably involved in the interaction with the fungus. Yeast-cell binding to glycosylated surface molecules of murine macrophages was studied using attachment inhibition assays with different carbohydrate-treated *H. c.* yeast-cells and the participation of galactose was always demonstrated. Liposomes incorporated with MMP were constructed to monitor *H. c.* yeast-cells attachment using yeasts previously treated with carbohydrates. Attachment to MMP-liposomes was first evaluated by ELISA. Afterwards, inhibition of yeast-cells attachment to [1,2-³H(N)]-cholesterol-MMP-liposomes was monitored by radioactivity counting of the yeast-liposome pellet, when yeasts were previously incubated with different sugars, and an important decrease of radioactive counts was detected when yeasts were incubated with galactose and lactose molecules. Further results confirmed the inhibition mediated by galactose and its derivatives in other inhibition attachment assays, either in peritoneal or alveolar macrophages, using microscopic observations and modified ELISA. In repetitive assays, β -galactose was better recognized than its α -anomer. In contrast, carbohydrate-treatment of macrophages, previous yeast addition, did not inhibit non-treated-yeast adherence. Meanwhile, galactose-derivative molecules did not inhibit *Candida albicans* (*C. a.*), used as control, even though mannose was able to inhibit *C. a.* yeast-cells attachment to macrophages. Yeast-cells were able to bind erythrocytes from several mammalian species and revealed differences in sugar specificity of tested mammalian erythrocytes. Yeast binding to human erythrocytes was irrespective of blood groups and comparative assays with three different *H. c.* strains indicated that yeast-cell ability to interact with galactosylated structures of erythrocytes seems to be well preserved in this pathogen. Additionally, yeast-cells were also able to adhere or agglutinate native or neuraminidase treated human erythrocytes. The results suggest the presence of a lectin-like component in the yeast-cells. The lectin sugar specificity was determined by human-erythrocyte-yeast-adherence inhibition assays, indicating that galactose derived molecules, mainly β -anomer, were specific inhibitors of the yeast-lectin activity, suggesting the relevance of axial OH on C4 and C1 from galactose as determinant in the interaction with the lectin of *H. c.* yeast-cells. Glycosaminoglycans, which share galactosyl (chondroitin sulfate A and C) and glucosyl residues (heparan sulfate), as well as sialic acid, also inhibit the interaction between erythrocytes and *H. c.*, suggesting that this interaction seems to be ionic-strength driven, where glycosylated and/or sialylated structures of erythrocyte are probably involved. The importance of interaction between *H. c.* yeasts (fungal parasitic and virulent phase) with different host-cells could be associated to pathogenic mechanisms not yet described for this parasite. The implications of an interaction mediated by *H. c.* lectin, either with peritoneal or alveolar macrophages (first step in the respiratory host defense mechanism) or with erythrocytes, create a new puzzle about the fate of the host-parasite relationship.

INTRODUCCIÓN

En eucariontes superiores, el proceso fagocítico es fundamental como mecanismo de defensa contra microorganismos invasores. En un gran número de casos, este proceso se inicia por la habilidad de células fagocíticas, particularmente neutrófilos y macrófagos, de reconocer moléculas de superficie presentes en el microorganismo a ser fagocitado, lo que puede decidir el destino final de éste.

Antes se creía que el reconocimiento de células fagocíticas hacia los parásitos estaba mediado exclusivamente por opsoninas (fagocitosis opsónica); sin embargo, en los últimos años se han estudiado mecanismos independientes de opsoninas (fagocitosis no opsónica) (Ofek *et al.*, 1995).

La fagocitosis opsónica requiere de componentes del suero conocidos como opsoninas, que funcionan como un puente entre el microorganismo y el fagocito al unirse a la superficie del microorganismo y a su vez a receptores específicos en la superficie del fagocito. Las opsoninas mejor conocidas son las inmunoglobulinas del isotipo G (IgG) y el fragmento iC3b del complemento (Ofek *et al.*, 1995). Las IgG se unen, vía el dominio Fc, a los receptores Fc γ (Fc γ R). El Fc γ RI (CD64) une tanto IgG1 como IgG3 monoméricas con alta afinidad, las cuales son las principales opsoninas del proceso fagocítico. El CD64 se expresa en monocitos, macrófagos y neutrófilos. Los Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16) se unen a agregados de IgG1/IgG3 o a complejos inmunes con gran avidez. Los CD32 se expresan en plaquetas, monocitos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos T y B, mientras que CD16 se encuentra en células "Natural Killer", linfocitos T activados, neutrófilos y macrófagos. Otra opsonina conocida, el fragmento iC3b del complemento, se une al receptor del complemento CR3 (CD11b/CD18) en la superficie del fagocito. Las colectinas son otros componentes del suero que funcionan como opsoninas, entre ellas se encuentran las proteínas pulmonares surfactantes (SpA y SpD), la proteína C reactiva y la proteína que se une a manosa (MBP), todas pertenecientes a la familia de las lectinas tipo C (Ni y Tizard, 1996).

Entre las formas de reconocimiento de la fagocitosis no opsónica, una de ellas es el resultado de una interacción proteína-proteína, vía la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) de un microorganismo e integrinas de los fagocitos. Sin embargo, hay que mencionar que las moléculas CD11/CD18 de la superfamilia de las integrinas (subfamilia de receptores β_2),

además de mediar la fagocitosis no opsónica, al interactuar con diferentes adhesinas microbianas (Ofek *et al.*, 1995; Gorocica *et al.*, 1998), también actúan en la fagocitosis opsónica como receptores para opsoninas séricas, como C3b o iC3b. Otra forma de reconocimiento no opsónico es la llamada lectinofagocitosis, donde existe un mecanismo de interacción entre lectinas de superficie de una célula y carbohidratos de superficie en la célula opuesta, que combinan de modo similar a la llave en la cerradura (Ofek y Sharon, 1988; Ofek *et al.*, 1995; Gorocica *et al.*, 1998). Finalmente, una forma menos estudiada del reconocimiento no opsónico dado por interacciones hidrofóbicas, como por ejemplo las mediadas por polisacáridos cargados negativamente, fue descrita entre bacterias y células fagocíticas (Ofek *et al.*, 1995).

En la histoplasmosis, infección respiratoria inicialmente benigna con curso sistémico de moderado a grave, producida por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* Darling 1906, el estudio de receptores que participan en el proceso de fagocitosis del patógeno es de gran importancia ya que se desconocen los eventos que intervienen en la formación del binomio hongo-fagocito.

No obstante que Holland (1971) informó que los neutrófilos y monocitos humanos requerían de factores séricos para ingerir y matar levaduras del hongo y que Sánchez y Carbonell (1975) describieron que los anticuerpos anti-pared celular incrementaban la ingestión de levaduras, en la actualidad, se considera que en la fagocitosis opsónica de *H. capsulatum* los anticuerpos específicos no tienen efecto en el destino intracelular del parásito. Hallazgos posteriores apoyan esta aseveración (Bullock y Wright, 1987; Rico-Galindo *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1995). En un estudio con macrófagos derivados de monocitos humanos cultivados no se encontraron evidencias de la participación de Fc γ R en la fagocitosis de levaduras opsonizadas con IgG séricas (Bullock y Wright, 1987). Resultado similar fue observado en investigaciones orientadas a la participación de los Fc γ R, especialmente Fc γ RII, en la internalización de las levaduras de *H. capsulatum* por macrófagos peritoneales de murino. Así, los Fc γ R no parecen ser los receptores de preferencia, que utiliza el hongo, para entrar a estas células del hospedero (Rico-Galindo *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1995).

La unión *in vitro* de levaduras no opsonizadas de *H. capsulatum* a receptores β_2 de las integrinas, expresados en macrófagos derivados de monocitos humanos cultivados, fue

descrita inicialmente por Bullock y Wright (1987). Posteriormente, Schnur y Newman (1990) demostraron la participación del complejo CD18 (cadena β), de neutrófilos humanos, en la unión de estas levaduras. A la fecha, se plantea que las células fúngicas se unen a la membrana de neutrófilos, de macrófagos cultivados derivados de monocitos y de macrófagos alveolares humanos, a través de la cadena β de las integrinas CD11a/CD18, CD11b/CD18 y CD11c/CD18 (Bullock, 1993; Bullock y Wright, 1987; Newman *et al.*, 1990).

Otro de los mecanismos no opsónicos que fueron investigados en fagocitos humanos, involucra los receptores tipo lectina manosa/fucosa y β -glucanas, no encontrándose sin embargo, una actividad importante de estos receptores en la internalización de *H. capsulatum* (Bullock y Wright, 1987). Hallazgos similares fueron descritos en el modelo murino BALB/c, por Jeréz y Taylor (1989).

El mecanismo de reconocimiento no opsónico entre hongos y fagocitos que involucra interacción con carbohidratos ha sido poco abordado en la mayoría de los modelos fúngicos. Recientemente, Hamilton *et al.* (1998; 1999) publicaron resultados que sugieren la existencia de una lectina en la superficie de los conidios de *Penicillium marneffe*, la cual se une a la laminina (matriz extracelular) vía residuos terminales de ácido siálico de la cadena de carbohidratos de esta glicoproteína. La unión de conidios de *Aspergillus fumigatus* a la laminina ha sido descrita (Tronchin *et al.*, 1993; Bouchara *et al.*, 1994; Bromley y Donaldson, 1996; Gil *et al.*, 1996; Bouchara *et al.*, 1997), con una probable mediación de fuerzas iónicas que involucra la participación de moléculas de ácido siálico de la laminina, ya que la unión de los conidios de *A. fumigatus* fue inhibida por azúcares negativamente cargados como el ácido N-acetilneuramínico y la sialil-lactosa (Bouchara *et al.*, 1997). Por otro lado, una proteína de *H. capsulatum* de 50 kDa que se une a laminina fue descrita por McMahon *et al.* (1995).

La participación de carbohidratos y moléculas de reconocimiento para éstos, en diferentes sistemas de interacción entre *H. capsulatum* y células del hospedero ha sido motivo de recientes investigaciones. Eissenberg y Goldman (1994), sugirieron un reconocimiento tipo lectina que pudiera mediar la fagocitosis del hongo a través de la unión de CD11/CD18 a un fosfoazúcar de un glicoesfingolípido presente en levaduras de *H. capsulatum*, previamente descrito por Barr y Lester (1984) y por Barr *et al.* (1984). Por otro

lado, Jiménez-Lucho *et al.* (1990) separaron, de eritrocitos bovinos, un glicoesfingolípido que se unía a moléculas tipo lectina, presentes en levaduras de *H. capsulatum*. La especificidad de esta unión fue demostrada para un glicoesfingolípido particular, la lactosilceramida (Gal β 1-4Glc β 1-1Cer), ya que las levaduras no se unieron a glicoesfingolípidos análogos, con sustituciones o modificaciones del residuo lactosil.

La existencia de componentes de *H. capsulatum* (posible lectinas) que se unen a residuos de azúcares de moléculas de la superficie de macrófagos peritoneales de ratón ha sido sugerida por Duarte-Escalante (1993) y Taylor *et al.* (1998). Glicoproteínas de membrana de macrófagos de ratón están, probablemente, involucradas en la interacción con el hongo, ya que dos bandas de 68 y 180 kDa fueron identificadas, por ensayos de electroinmunotransferencia, en muestras de proteínas de membrana transferidas a nitrocelulosa. Estas bandas fueron reveladas por incubación con componentes de la histoplasmina (antígeno crudo del hongo), seguida de la adición de suero inmune anti-*H. capsulatum* y del sistema anti-gammaglobulina biotinilada/estreptavidina-peroxidasa. La ausencia de bandas, en las muestras reveladas después de la transferencia de proteínas de membrana adsorbidas con levaduras, evidenció una interacción previa entre estas proteínas y componentes presentes en la superficie de las levaduras de *H. capsulatum* (Duarte-Escalante, 1993; Taylor *et al.*, 1998). Las fracciones de proteínas de membrana de macrófagos seleccionadas después de la unión a una columna de afinidad de Sefarosa-*Abrus precatorius* reaccionaron mejor con componentes del hongo, sugiriendo que la interacción entre el macrófago y el hongo podría estar mediada por residuos terminales D-galactosil de glicoproteínas de membrana del macrófago, seleccionadas por la cromatografía de afinidad, y por moléculas de reconocimiento a azúcares (tipo-lectina) presentes en los componentes del hongo (Taylor *et al.*, 1998).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando que *H. capsulatum* produce una infección intracelular de algunos tipos particulares de células (fagocitos profesionales o no profesionales), que tiene la habilidad de unirse a matrices extracelulares (laminina) y que además puede utilizar un posible reconocimiento mediado por lectinas al interactuar con moléculas glicosiladas de la superficie de la célula hospedera, la necesidad de entender mejor este mecanismo que involucra interacciones con carbohidratos para unirse a diferentes estirpes celulares es un aspecto relevante que debe ser abordado en este modelo de relación hospedero-parásito. Dada la importancia que puede significar el mecanismo de reconocimiento del hongo *H. capsulatum* por diferentes células del hospedero para definir el curso de la infección, se planteó el presente trabajo de investigación que permite sugerir, con base en los antecedentes, un nuevo mecanismo de interacción entre levaduras del hongo y células del hospedero mediado por una molécula tipo lectina.

HIPÓTESIS

En la interacción entre levaduras de *Histoplasma capsulatum* y células del hospedero participa un mecanismo de reconocimiento que involucra un componente del hongo con actividad tipo lectina y moléculas glicosiladas de superficie de las células del hospedero.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar la participación e identificar la especificidad del componente tipo lectina de levaduras de *H. capsulatum*, en la interacción con moléculas glicosiladas de superficie de las células del hospedero.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar mecanismos de interacción entre levaduras de *H. capsulatum* y células del hospedero.
2. Estimar la habilidad de levaduras de *H. capsulatum* para adherirse a células de distintos hospederos (macrófagos peritoneales y alveolares de ratón, además de eritrocitos de algunos mamíferos, como: ratón, rata, caballo, conejo y humano).
3. Determinar la especificidad del componente tipo lectina de levaduras de *H. capsulatum*

hacia residuos glicosilados de moléculas de superficie de las células del hospedero (macrófagos peritoneales y alveolares de ratón, además de eritrocitos humanos).

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos. Se emplearon tres cepas del hongo *Histoplasma capsulatum*, la cepa EH-53 de la colección de hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina UNAM, y las cepas G-217B y Downs donadas por el Dr. G. S. Kobayashi, de la Universidad de Washington, St. Louis, MO. La fase levaduriforme de cada cepa fue mantenida a 37°C en medio de infusión-cerebro-corazón (BHI) (Bioxón, México, DF) suplementado con 0.1% de L-cisteína y 1% de glucosa.

Células hospederas. Los macrófagos peritoneales y alveolares fueron obtenidos de ratones machos BALB/c (6-8 semanas de edad). Los procedimientos se realizaron bajo estrictas condiciones de esterilidad, por lavados de cavidad peritoneal y del tejido pulmonar con amortiguador salino de fosfatos (PBS) 150 mM, pH 7.2. Los macrófagos fueron adheridos, de 1-3 h a 37°C con atmósfera húmeda y 5% de CO₂, en botellas de plástico para cultivo (Nunc, Roskilde, Denmark) conteniendo medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) suplementado con 50 µg/ml de gentamicina (Schering-Plough, México, DF), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 20% de suero fetal bovino (Gibco). Las células adheridas fueron lavadas con DMEM y su número fue ajustado según la viabilidad determinada, antes de cada ensayo. Los eritrocitos de diferentes especies de mamíferos como rata, ratón, conejo, caballo, así como de humano fueron probados en ensayos de adherencia. Los eritrocitos de rata, ratón y conejo fueron obtenidos de animales mantenidos en el bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Los eritrocitos de caballo fueron proporcionados por la Facultad de Veterinaria, UNAM, y los eritrocitos humanos de diferentes grupos sanguíneos (A, B y O) fueron obtenidos de donadores sanos voluntarios. Todos los eritrocitos fueron mantenidos en PBS.

Proteínas de membranas de macrófagos. Macrófagos peritoneales de ratón fueron procesados para la obtención de membranas plasmáticas, de acuerdo con una modificación del método de Davis y Kuhn (1990) utilizando partículas policatiónicas (Cohen *et al.*, 1977; Jacobson, 1980) para separar fracciones enriquecidas de membranas de macrófagos. Partículas de Affi-Gel 701 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) fueron utilizadas como soporte sólido policatiónico para la adherencia de los macrófagos. Después de la lisis de los macrófagos con amortiguador, los fantasmas de membrana permanecieron adheridos a las partículas de Affi-Gel y los procedimientos de obtención y purificación de proteínas de

membranas se siguieron de acuerdo con lo descrito por Cohen *et al.* (1977), Jacobson (1980) y Taylor *et al.* (1998). Se preparó una suspensión al 50% de Affi-Gel en amortiguador de unión (sorbitol 140 mM y acetato de sodio 20 mM, pH 5.0). Macrófagos peritoneales adheridos en placas de plástico, durante 1-3 h a 37°C en medio DMEM (Gibco), fueron despegados por agitación mecánica y colocados en PBS 150 mM con EDTA 0.6 mM, pH 7.2. Los macrófagos fueron centrifugados a 700 g durante 10 min. Después de varios lavados con DMEM y dos lavados en amortiguador de sorbitol 100 mM y acetato de sodio 40 mM, pH 5.0, las células fueron suspendidas al 25% en el amortiguador de unión. La suspensión al 50% de Affi-Gel fue adicionada a la de células al 25%. Las células adheridas a las partículas de Affi-Gel se dejaron sedimentar, y se tomaron alícuotas de esta mezcla para monitorear microscópicamente la adherencia de macrófagos a las partículas. Las células no adheridas fueron eliminadas. El botón conteniendo partículas con células adheridas fue resuspendido en amortiguador de unión (v/v) conteniendo 1 mg de sulfato de dextrán (M_w , 5,000) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) por ml. Las partículas conteniendo células adheridas, fueron lavadas con amortiguador de unión, dejándolas sedimentar. El sobrenadante fue eliminado y el botón fue agitado vigorosamente, adicionando de inmediato Tris-HCl 10 mM pH 7.2, preparado en frío. Este último tratamiento fue repetido cuatro veces, seguido de centrifugación a 40 g para completar la lisis y remover los restos celulares. El lavado final se realizó con amortiguador de unión suplementado con inhibidores de proteasas, aprotinin (100 U/ml), pepstatin A (2 mM) (Sigma) y fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) (2 mM) (Gibco). Las partículas con fantasmas de membranas fueron mantenidas a -80°C hasta su utilización.

Las proteínas de membranas fueron eluidas de las membranas celulares unidas a las partículas de Affi-Gel por la adición v/v del amortiguador [Tris-HCl 0.08 M, pH 6.8, ditiotreitól 0.1 M, dodecil sulfato de sodio (SDS) (Bio-Rad) al 2%, glicerol al 10%] seguido de la incubación a 75°C durante 10 min, con agitación intermitente. Finalmente, todo este material fue sonicado a 20 kHz con pulsos de 20 s, y centrifugado a 800 g durante 10 min, el sobrenadante conteniendo las proteínas de membranas solubilizadas fue concentrado con membranas Millipore Ultrafree-MC (Millipore Corporation, MA) y almacenado a -80°C.

Conjugación de proteínas de membranas de macrófagos a ácidos grasos y su incorporación a liposomas marcados con colesterol tritiado. Se utilizó el método

descrito por New (1990). Una solución al 4% de deoxicolato de sodio (solución de sales biliares) fue preparada en 0.5 ml de PBS 10 mM, ajustando el pH a 7.2. Un volumen de 20 μ g de éster de ácido palmítico (Sigma) fue colocado en un vial de vidrio y secado con nitrógeno líquido. El 0.5 ml de la solución de deoxicolato de sodio fue transferido al vial, agitando constantemente para disolver el éster, y se adicionaron 0.5 ml de una solución de 1.25 mg de proteínas de membranas de macrófagos. El vial conteniendo la mezcla de sales biliares/ácido palmítico/proteínas de membranas de macrófagos fue cerrado e incubado toda la noche a 37°C en agitación. Simultáneamente, 18 mg de fosfatidilcolina de huevo (Sigma), 2 mg de ácido fosfatídico (Sigma), 5 mg de colesterol no radioactivo (Sigma), y 1 μ Ci de [1,2-³H(N)]-colesterol (actividad específica 50 Ci/mmol, Dupont, NEN Research Products, Boston MA) fueron disueltos en cloroformo/metanol (2:1, v/v) dejando secar en un frasco de 50 ml en un evaporador rotatorio. Después de secar, se adicionaron 2 ml de PBS 150 mM agitando suavemente, hasta que los lípidos pegados en las paredes del frasco quedaran resuspendidos.

Finalmente, 1 ml de la solución de sales biliares/ácido palmítico/proteínas de membranas de macrófagos, fue adicionado al frasco de 50 ml conteniendo la última preparación. Se agitó hasta que la solución se aclarara y se dializó en 50 ml de PBS 150 mM a temperatura ambiente, durante 24 h. Se llevó a cabo una segunda diálisis en PBS en presencia de la resina intercambiadora de iones Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad), para eliminar el detergente en la solución.

Los liposomas tritiados con proteínas de membranas de macrófagos incorporadas (liposomas-[1,2-³H(N)]-colesterol-PMM) y liposomas no radioactivos (liposomas-PMM) preparados sin colesterol tritiado fueron purificados como sigue: se utilizó el método de flotación con Ficoll (New, 1990) para homogeneizar los liposomas. Una suspensión conteniendo 0.5 ml de liposomas en 1.5 ml de Ficoll al 20% en PBS 150 mM, fue transferida a un tubo de ultracentrífuga. Enseguida, 3 ml de Ficoll al 10% (p/v) fueron colocados cuidadosamente sobre la suspensión de los liposomas y la capa superior de Ficoll fue cubierta con PBS. Después de centrifugar a 100,000 g durante 30 min a 4°C, los liposomas fueron colectados de la interfase entre el PBS y la capa de Ficoll al 10%. Las proteínas de membrana de macrófagos no incorporadas permanecieron en la capa más inferior de Ficoll (New, 1990).

Tratamiento de levaduras con carbohidratos. Levaduras vivas de *H. capsulatum* fueron incubadas a 4°C por 1 h con diferentes sacáridos solubilizados en PBS 150 mM, pH 7.2. Se utilizaron D-glucosa, metil α o β -D-galactopiranososa, D-manosa, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina, D-maltosa (4-O- α -D-glucopiranososa-D-glucosa), D-lactosa (O- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranososa), D-lactulosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-fructofuranosa), D-melibiosa (6-O- α -D-galactopiranosil-D-glucosa), ácido N-acetilneuramínico, y los glicosaminoglicanos condroitin sulfato A (β -ácido glucurónico-[1 \rightarrow 3]-N-acetil- β -galactosamina-4-sulfato-[1 \rightarrow 4]), condroitin sulfato C (β -ácido glucurónico-[1 \rightarrow 3]-N-acetil- β -galactosamina-6-sulfato-[1 \rightarrow 4]), o heparán sulfato (β -ácido glucurónico-[1 \rightarrow 4]-N-acetil- α -glucosamina-6-sulfato-[1 \rightarrow 4]). Las levaduras tratadas fueron centrifugadas a 800 g durante 20 min en PBS y cada botón fue cuantificado antes de su utilización en ensayos subsecuentes.

Adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a liposomas-PMM. Se utilizó el método de ELISA de acuerdo a Voller *et al.* (1979), adaptándolo a las condiciones del ensayo. Los liposomas-PMM (100 μ l) fueron mezclados con amortiguador de carbonatos (v/v), pH 9.6, y se diluyeron de manera seriada en placas Nunc de 96 pozos (Nunc), y se incubaron durante toda la noche. Después de fijarlos, se lavó la placa con PBS/Tween-20 0.05% (PBST), se adicionó PBST/albúmina 0.5% a cada pozo para bloquear cualquier sitio reactivo, y la placa fue incubada durante 24 h. Enseguida, ésta fue lavada con PBST y se adicionaron 10⁶ levaduras en PBST a cada pozo y se incubó por 1 h. Después, la placa fue lavada tres veces y se adicionaron 100 μ l de suero hiperinmune de conejo anti-*Histoplasma* diluido en PBST a cada pozo. Se utilizó suero normal de conejo como testigo negativo. Después de lavar con PBST, se adicionaron 100 μ l del conjugado biotinilado anti-IgG de conejo obtenido en cabra (Gibco) diluido 1/1000, se incubó por 1 h y se lavó posteriormente con PBST. Se adicionó estreptavidina-peroxidasa diluida 1/1000 y se incubó por 1 h. Después de lavar la placa con PBST, se adicionaron 100 μ l de la solución del sustrato, o-fenilendiamina (Sigma), preparada a una concentración de 40 mg en 100 ml del amortiguador de citrato-fosfato, 0.05 M, pH 5.0, adicionado de 40 μ l de peróxido de hidrógeno al 30%. Se incubó la placa en condiciones de oscuridad, a temperatura ambiente, por 20 min. La reacción fue detenida, adicionando 50 μ l de ácido sulfúrico 2.5 M, a cada pozo, y los valores de densidad óptica (DO) fueron leídos a 492 nm en un aparato

Multiskan MS Labsystems (Helsinki, Finlandia). Los ensayos se realizaron por duplicado, con los testigos pertinentes, tanto de suero negativo como de liposomas-PMM con o sin levaduras adheridas. Los resultados fueron analizados después de ajustar los valores no específicos de DO con las lecturas obtenidas de los testigos.

Inhibición de la adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos a liposomas-[1,2-³H(N)]-colesterol PMM. Los ensayos se realizaron con levaduras tratadas con glucosa, galactosa, manosa, maltosa o lactosa a 50 o 150 mM. Aproximadamente 10⁶ levaduras por 1 ml de PBS 150 mM fueron incubadas a 4°C, por 1 h, con 100 µl de liposomas-[1,2-³H(N)]-colesterol-PMM. Después de centrifugar a 800 g durante 15 min, el botón conteniendo levaduras unidas a liposomas-[1,2-³H(N)]-colesterol-PMM fue homogeneizado en 0.1 ml de líquido de centelleo y transferido a vial de conteo radioactivo, adicionando líquido de centelleo hasta completar 10 ml. La radioactividad fue medida en un contador de centelleo-LS6000TA para muestras líquidas (Beckmann, USA). Las muestras se procesaron por triplicado. El sobrenadante conteniendo sólo liposomas-[1,2-³H(N)]-colesterol-PMM (testigo de cuentas radioactivas), y muestras de líquido de centelleo (blanco), fueron procesados individualmente. El botón de levaduras no tratadas con carbohidratos unidas a liposomas-[1,2-³H(N)]-colesterol-PMM funcionó como testigo de adherencia a liposomas. Los resultados de adherencia de levaduras tratadas con cada uno de los carbohidratos fueron expresados como porcentaje de inhibición del índice de adherencia (IA), y se calculó como sigue:

1 - [(cpm del botón conteniendo levaduras tratadas con carbohidratos unidas a liposomas-[1,2-³H(N)]-colesterol-PMM)/(cpm del botón conteniendo levaduras no tratadas con carbohidratos unidas a liposomas-[1,2-³H(N)]-colesterol-PMM) x 100].

Inhibición de la adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos a la superficie de macrófagos. Se realizaron dos tipos de ensayos. 1) Se cuantificó la adherencia de levaduras a macrófagos peritoneales por microscopía de luz. Un volumen estándar de 200 µl de medio DMEM, conteniendo 2 x 10⁶ levaduras tratadas con glucosa, α o β-galactosa, manosa, maltosa, lactosa, N-acetilgalactosamina o N-acetilglucosamina a 150, 15 o 1.5 mM, fueron incubadas a 4°C por 1 h con monocapas generadas por el cultivo de 24 h de 2 x 10⁵ macrófagos peritoneales, en placas Nunc de 24 pozos. Después de la incubación, los macrófagos fueron lavados con DMEM para eliminar levaduras no unidas,

teñidos con Wright, y observados por microscopía de luz. Se realizaron ensayos simultáneos en las mismas condiciones con levaduras de la cepa 15 de *Candida albicans* (cortesía del Dr. Rubén López Martínez de la Facultad de Medicina, UNAM) como testigo de microorganismo con habilidad de reconocer manosa en lugar de galactosa, como azúcar de unión a molécula tipo lectina de su superficie (Calderone, 1993). Los resultados fueron expresados como índice de adherencia que corresponde al número de levaduras adheridas por cada 100 macrófagos y como porcentaje de inhibición de adherencia. Se contabilizaron, para cada muestra, 300 macrófagos en cuatro diferentes campos ópticos. Para la inhibición de la adherencia se consideró como cero porcentaje de inhibición el promedio de las lecturas de cada ensayo conteniendo levaduras no tratadas con carbohidratos. Se realizaron ensayos testigos de adherencia a macrófagos peritoneales tratados o no con azúcares (glucosa, galactosa, lactosa o maltosa a 50 o 150 mM), previa adición de levaduras de *H. capsulatum* sin tratamiento, los cuales fueron cuantificados por microscopía de luz como se refiere anteriormente. 2) Se utilizó otro ensayo, un método de ELISA modificado de acuerdo a Aramaky *et al.* (1993). Macrófagos peritoneales y alveolares (5×10^5 células/pozo) adheridos en placas Nunc de 96 pozos, fueron incubados durante toda la noche. Después de dos lavados con PBST, se adicionaron 100 μ l de PBST/albúmina 0.5% a cada pozo y se incubó por 1 h a 4°C. Se lavó la placa con PBST y se adicionó, a pozos individuales, 5×10^6 levaduras tratadas con α o β -galactosa, lactosa o N-acetilgalactosamina (1.5, 15, 50, o 150 mM) y se incubó durante 1 h a 4°C. Las placas fueron cuidadosamente lavadas con PBST y se adicionó suero inmune de conejo anti-*Histoplasma*. Los procedimientos finales se llevaron a cabo como se describió en el método de ELISA anterior, aclarando que las incubaciones fueron invariablemente a 4°C. Los valores de DO, de cada pozo conteniendo levaduras tratadas con carbohidratos, fueron utilizados para calcular los datos de inhibición, estimando como cero porcentaje de inhibición el promedio de los datos de DO, de cada ensayo conteniendo levaduras no tratadas con carbohidratos, utilizado como testigo. Para ajustar los resultados específicos con suero inmune anti-*H. capsulatum* los valores de DO de cada pozo fueron corregidos con los obtenidos de los pozos revelados con suero normal.

Los resultados de los dos tipos de ensayos fueron estadísticamente analizados por la prueba t de Student (n= 9).

Adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a eritrocitos de mamíferos. Eritrocitos de ratón, rata, caballo, conejo o de humano (1×10^6), fueron incubados con 1×10^7 levaduras de *H. capsulatum* de la cepa EH-53 en PBS 150 mM, pH 7.2, a temperatura ambiente durante 30 min. Después de la incubación, la adherencia de las levaduras a los eritrocitos, fue observada por microscopía de luz. Los resultados fueron expresados como porcentaje de adherencia, contabilizando 300 eritrocitos en cuatro campos ópticos, para cada ensayo.

Adherencia de levaduras de diferentes cepas de *H. capsulatum* a eritrocitos humanos de distintos grupos sanguíneos. Se incubaron 1×10^6 eritrocitos de grupos sanguíneos A, B u O con 1×10^7 levaduras de *H. capsulatum* (cepas EH-53, G-217B, o Downs) en PBS a temperatura ambiente durante 30 min. Después de la incubación, la unión de las levaduras a los eritrocitos fue observada por microscopía de luz. Los resultados fueron expresados como porcentaje de adherencia, contabilizando 300 eritrocitos en cuatro campos ópticos, para cada ensayo. Los resultados de los ensayos fueron estadísticamente analizados por la prueba t de Student ($n=9$).

Actividad hemaglutinante de levaduras de *H. capsulatum*. Se realizaron ensayos con diferentes relaciones levaduras/eritrocitos. Se incubaron 5×10^5 , 1×10^7 o 5×10^7 levaduras con 1×10^6 eritrocitos del grupo sanguíneo O, en PBS a temperatura ambiente durante 30 min. Adicionalmente, se utilizaron eritrocitos del grupo O y de ratón (testigo), tratados con neuraminidasa. Estos eritrocitos (500 μ l/botón) fueron incubados con 50 μ l (0.1 U) de neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (Sigma), la cual fue preparada en PBS 150 mM, pH 7.0. La mezcla fue incubada a 37°C, 30 min, en agitación. Después de lavar dos veces con PBS 150 mM, pH 7.2, los eritrocitos fueron cuantificados antes de cada ensayo. La adherencia de las levaduras a los eritrocitos fue observada y fotografiada, utilizando un fotomicroscopio Olympus BX50 (Olympus Optical, Japón).

Inhibición de la adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos, a la superficie de eritrocitos. Se realizaron ensayos con tratamientos de levaduras con diferentes sacáridos: 1) con monosacáridos, disacáridos, o aminoazúcares- D-glucosa, α o β -D- galactosa, D-manosa, D-maltosa, D-lactosa, D-lactulosa, D-melibiosa, N-acetil-D-glucosamina o N-acetil-D-galactosamina a 50 mM; 2) con glicosaminoglicanos- condroitin sulfato A, condroitin sulfato C o heparán sulfato a 10, 100 o 1000 μ g/ml. Se utilizó además,

levaduras tratadas con α o β -galactosa, N-acetilgalactosamina o ácido siálico a 1.5, 15 o 150 mM. Se incubaron 1×10^7 levaduras tratadas con los diferentes carbohidratos y 1×10^6 eritrocitos del grupo sanguíneo O, en PBS a temperatura ambiente durante 30 min. En cada uno de los ensayos, se utilizaron levaduras sin tratamiento como testigos. Después de las incubaciones, la adherencia de las levaduras a los eritrocitos fue observada por microscopía de luz. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de adherencia, contabilizando 300 eritrocitos en cuatro campos ópticos, para cada ensayo.

Los resultados de los dos tipos de ensayos fueron estadísticamente analizados por la prueba t de Student (n= 9).

RESULTADOS

Adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a liposomas-PMM no radioactivos. La habilidad de levaduras de *H. capsulatum* de adherirse a liposomas construidos con proteínas de membrana de macrófagos fue evaluada por el método de ELISA al revelarlas con suero hiperinmune de conejo y el sistema biotinilado anti-IgG de conejo/estreptavidina-peroxidasa. La figura 1 expresa valores de DO considerando correcciones de lecturas asociadas tanto a la actividad inespecífica de los liposomas-PMM como del suero normal negativo y por consiguiente, muestra que las levaduras pueden unirse a liposomas-PMM de una manera dosis-dependiente, al variar las lecturas de densidad óptica de 0.87 a 0.065 (correspondientes a la concentración inicial y a la dilución 1:64 de los liposomas, respectivamente). Esta cinética apoya la eficacia de los liposomas-PMM como sistema artificial para medir interacción con *H. capsulatum*.

Inhibición de la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* tratadas con monosacáridos o disacáridos a liposomas-[1,2-³H(N)]-colesterol-PMM. Este ensayo, de alta sensibilidad, mostró los valores positivos de 30, 22 y 20% como los más elevados porcentajes de inhibición del IA, obtenidos por el tratamiento de levaduras con la galactosa, a 50 mM y 150 mM, y con la lactosa a 50 mM, respectivamente. En contraste, otros carbohidratos, como glucosa, manosa y maltosa, no modificaron la interacción entre proteínas de membrana de macrófagos incorporadas a liposomas y *H. capsulatum* (Fig. 2).

Inhibición de la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* tratadas con carbohidratos, a la superficie de macrófagos. Las tablas 1 y 2 muestran los resultados de los ensayos cuantificados por microscopía de luz, los cuales fueron expresados de dos formas, una considerando el índice de adherencia y la otra el porcentaje de inhibición de adherencia de levaduras. Se obtuvieron valores bajos del índice de adherencia de *H. capsulatum* a macrófagos peritoneales con levaduras tratadas con β -galactosa, α -galactosa, lactosa y N-acetilgalactosamina, en las tres concentraciones probadas, respectivamente. Los índices más bajos, de 47.5 y 30.83, estuvieron asociados a la β -galactosa (Tabla 1), sugiriendo que este azúcar abate drásticamente la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a los macrófagos. Estos hallazgos se confirman al expresar los resultados como porcentajes de inhibición de adherencia, donde los más altos porcentajes fueron también obtenidos con levaduras tratadas con β -galactosa, α -galactosa, lactosa y N-

acetilgalactosamina, en las tres concentraciones probadas, respectivamente. En particular, los porcentajes más elevados, de 94.88 y 92.11, estuvieron asociados a la β -galactosa (Tabla 1); se encontró diferencia significativa ($p < 0.01$) entre los valores de inhibición alcanzados por la β y la α -galactosa en la concentración de 15 mM. Por otro lado, la manosa así como la glucosa y algunos de sus derivados (Mal, GlcNAc) no parecen tener efecto en la interacción de *H. capsulatum* con macrófagos peritoneales, según los resultados tanto del índice de adherencia como de la inhibición de la adherencia; ya que los más altos índices de 618.83, 581 y 543.83 así como los más bajos porcentajes de inhibición de 0, 3.54 y 11.20 estuvieron asociados a la manosa (Tabla 1). Por otro lado, ensayos utilizando levaduras de *C. albicans* como testigo, mostraron que los más bajos índices de adherencia fueron obtenidos cuando las levaduras fueron tratadas con manosa en las tres concentraciones probadas, con valores de 82, 78.16 y 72.66 (Tabla 2), sugiriendo que este azúcar interfiere en la adherencia de *C. albicans* a los macrófagos peritoneales. Estos hallazgos también fueron confirmados al expresar los resultados como porcentajes de inhibición de adherencia, donde los más altos porcentajes fueron obtenidos con levaduras tratadas con la manosa, en las tres concentraciones utilizadas, con valores de 89.86, 90.33 y 91.01% (Tabla 2). Además, los resultados con *C. albicans* al utilizar la glucosa o la α y β -galactosa con algunos de sus derivados como la lactosa y la N-acetilgalactosamina, mostraron para la interacción de esta levadura los más altos índices de adherencia que variaron de 658.83 (asociado a la N-acetilglucosamina) a 249.83 (asociado a la β -galactosa) y los más bajos porcentajes de inhibición de adherencia que variaron de 18.59 (asociado a la N-acetilglucosamina) a 69.11% (asociado a la β -galactosa). Las diferencias de los valores de inhibición alcanzados, entre la manosa y la galactosa con sus derivados, asimismo entre la manosa y la glucosa con sus derivados, para levaduras de *C. albicans* fueron significativas ($p < 0.001$) en todas las concentraciones probadas. Por lo que los resultados de la tabla 2 sugieren que estos azúcares no intervienen en la interacción de *C. albicans* con macrófagos peritoneales de ratón. Ensayos testigos complementarios de adherencia a macrófagos peritoneales tratados o no con azúcares, previa adición de levaduras sin tratamiento de *H. capsulatum*, evidenciaron que la adherencia de levaduras del hongo en este sistema de interacción no fue capaz de ser inhibida por el tratamiento de los macrófagos con los diferentes azúcares, considerando los bajos valores de porcentaje de

inhibición que variaron de 23.4 (lactosa 50 mM) al 10 % (maltosa 150 mM).

La adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a la superficie de macrófagos peritoneales (Tabla 3) o alveolares (Tabla 4) fue, además, cuantificada por un método de mayor sensibilidad, como ELISA. Los resultados mostraron que los más altos porcentajes de inhibición de adherencia a macrófagos peritoneales se obtuvieron con levaduras tratadas con β -galactosa, y en todas las concentraciones utilizadas los porcentajes fueron superiores al 97.44% (Tabla 3). Aunque los resultados de levaduras tratadas con α -galactosa, lactosa o N-acetilgalactosamina mostraron también importantes porcentajes de inhibición, sugiriendo de nuevo la participación de la galactosa y moléculas asociadas en la interacción de levaduras de *H. capsulatum* con macrófagos peritoneales (Tabla 3), las diferencias encontradas en los valores de inhibición alcanzados entre la β y la α -galactosa fueron significativas tanto en las concentraciones de 150 y 50 mM ($p < 0.001$) como en la de 15 mM ($p < 0.01$) y apoyan la participación más eficiente de la β -galactosa. Los ensayos realizados con macrófagos alveolares mostraron los altos porcentajes de inhibición de adherencia con levaduras tratadas con β -galactosa, lactosa y N-acetilgalactosamina en todas las concentraciones probadas (Tabla 4), con valores que variaron del 74.15 al 95.5%, del 78.65 al 100% y del 61.79 al 100%, respectivamente. Los resultados obtenidos con levaduras tratadas con α -galactosa mostraron valores de inhibición mucho más bajos, que variaron del 0 al 85.39% (Tabla 4). Las diferencias en los valores de inhibición entre la β y la α -galactosa fueron significativas para las concentraciones de 150 y 50 mM ($p < 0.01$) y de 15 y 1.5 mM ($p < 0.001$).

Adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a eritrocitos de diferentes especies de mamíferos. Las levaduras de *H. capsulatum* fueron capaces de unirse a eritrocitos de ratón, rata, caballo, conejo y humano. La adherencia varió del 47 (humano), 67 (ratón), y 68% (caballo) al 93.4 (rata) y 94% (conejo) (Fig. 3).

Adherencia de levaduras de diferentes cepas de *H. capsulatum* a eritrocitos humanos de distintos grupos sanguíneos. Se utilizaron tres diferentes cepas de *H. capsulatum* (EH-53, G217-B, y Downs) para medir su capacidad de adherirse a eritrocitos humanos de grupos sanguíneos A, B y O. Los resultados mostraron que la interacción entre las levaduras de cada una de las tres cepas y eritrocitos de los grupos sanguíneos B y O fue muy similar; ya que: los porcentajes de adherencia detectados para la cepa EH-53 fueron de

21.22 (grupo B) y de 19.55 % (grupo O); para la cepa G-217B fueron de 22 (grupo B) y de 13.22% (grupo O); y para la cepa Downs fueron de 20 (grupo B) y 19.55 % (grupo O). Para los eritrocitos de grupo sanguíneo A, las cepas revelaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los porcentajes de adherencia, considerando los valores de 17.44 para la cepa EH-53, 39.22 para la G-217B y 36% para la cepa Downs (Fig. 4).

Aglutinación de eritrocitos por levaduras de *H. capsulatum*. La habilidad de *H. capsulatum* para aglutinar eritrocitos humanos del grupo sanguíneo O fue probada utilizando diferentes relaciones levadura/eritrocito. Los resultados mostraron que la relación $5 \times 10^5/1 \times 10^6$ no es hemaglutinante (Fig. 5a), aunque las levaduras a esta baja concentración se adhieren a los eritrocitos y pueden formar puente entre ellos (Fig. 5b). Una fase preaglutinante fue observada, tanto con eritrocitos tratados o no con neuraminidasa, en la relación $1 \times 10^7/1 \times 10^6$ (Fig. 5d), mientras que la relación $5 \times 10^7/1 \times 10^6$ reveló hemaglutinación en varios campos ópticos, mostrando agrupaciones de levaduras entre ellos (Fig. 5e). Las figuras 5 c y f representan los testigos de eritrocitos solos sin levaduras. El efecto de la neuraminidasa fue valorado en ensayos de adherencia de levaduras a eritrocitos, tratados o no con la enzima. Al utilizar eritrocitos humanos se observaron porcentajes de adherencia de 47 y 43 % en los eritrocitos tratados o no con la enzima, respectivamente. En los ensayos con eritrocitos de ratón, utilizados como testigos, los porcentajes de adherencia variaron del 43% para eritrocitos tratados con neuraminidasa al 67% para los no tratados.

Inhibición de la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* tratadas con monosacáridos, disacáridos o aminoazúcares, a eritrocitos del grupo sanguíneo O. Los resultados observados en la figura 6 muestran que la adherencia de levaduras tratadas con estos diferentes sacáridos utilizados a 50 mM fue inhibida fundamentalmente por moléculas de galactosa y sus derivados (incluyendo a los disacáridos que contienen galactosa, como lactosa, lactulosa y melibiosa), alcanzando la β -galactosa el más alto valor de inhibición (99%), seguido de la melibiosa (86.82%), lactulosa (82.23%), α -galactosa (78.83%) y lactosa (68.73%). La galactosamina a diferencia de las demás moléculas relacionadas a la galactosa presentó una baja inhibición (11.17%). El resto de los mono y disacáridos probados, distintos de la galactosa, no inhibieron la adherencia de levaduras a los eritrocitos y los porcentajes de inhibición alcanzados fueron aún menores al de la galactosamina y

similares al del testigo sin tratamiento con carbohidratos.

Inhibición de la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* tratadas con glicosaminoglicanos, a eritrocitos del grupo sanguíneo O. Los resultados del porcentaje de inhibición de adherencia con los glicosaminoglicanos y otros sacáridos probados, en las tres concentraciones de trabajo, alcanzaron en los tres experimentos valores más altos con condroitin sulfato C que variaron del 55.33 al 62.33%, seguido del heparán sulfato con 35.66 al 55.33%, condroitin sulfato A con 21.66 al 48.66% y ácido siálico con 32.05 al 48.34%. Los valores de inhibición con la β -galactosa, la α -galactosa y la galactosamina fueron menores y variaron del 33.66 al 44.65%, del 26.22 al 35.34% y del 10.36 al 12.36%, respectivamente (Tabla 5). En estos ensayos, los valores de inhibición alcanzados por la β -galactosa y la α -galactosa siempre fueron asociados con mayor eficiencia a la β -galactosa, ya que las diferencias entre ambas, en los tres ensayos con las tres concentraciones probadas, fueron siempre significativas para un valor de $p < 0.01$.

DISCUSIÓN

Las interacciones lectina-carbohidrato han sido demostradas en un gran número de procesos biológicos y la adhesión de agentes infecciosos a células del hospedero es una de las más importantes, como ha sido referido por Sharon (1996). En el caso particular de *H. capsulatum*, aunque la habilidad de las moléculas de galactosa asociadas a superficies de las células del hospedero, para reconocer componentes de levaduras del hongo, fue inicialmente propuesta por Jiménez-Lucho *et al.* (1990), los resultados de la presente investigación son pioneros en demostrar una interacción directa del hongo con fagocitos del hospedero o con sus moléculas de superficie, que contienen residuos galactosilados. A la fecha, son los únicos datos que demuestran una interacción con eritrocitos de mamíferos.

Una interacción entre *H. capsulatum*, dada por componentes solubles (constituyentes del complejo antigénico histoplasmina) o por levaduras completas del hongo, con moléculas de la superficie de macrófagos peritoneales de ratón ha sido descrita anteriormente por Taylor *et al.* (1998). Sin embargo, los datos de este estudio confirman estos hallazgos y sugieren además que la interacción, entre proteínas de membranas de macrófagos de murino y levaduras del hongo, está mediada por una probable lectina de *H. capsulatum* que reconoce, de preferencia, residuos galactosilados expuestos en las moléculas de superficie de macrófagos de murino. Un mecanismo similar parece actuar en la interacción con eritrocitos humanos, y en este caso también podría estar involucrado otro mecanismo mediado por fuerzas iónicas, donde las moléculas negativamente cargadas de la superficie de los eritrocitos jugarían un papel clave.

Una de las estrategias utilizadas en este estudio, para detectar la interacción entre el componente tipo lectina de *H. capsulatum* con la superficie de macrófagos, fue la conjugación de proteínas de membranas de macrófagos a liposomas marcados con [1,2-³H(N)]-colesterol. Este método de alta sensibilidad, permite determinar valores más reales de la interacción levadura/proteínas de superficie de la célula hospedera, sin los errores de interpretación asociados a las fallas humanas de los conteos directos. Inicialmente, fue necesario garantizar si la construcción de liposomas con proteínas de macrófagos incorporadas y expuestas en su superficie, preservaba la habilidad de reconocer los componentes de las levaduras, previa su utilización para medir esta interacción. Los resultados de la figura 1 apoyan la eficacia y utilidad de los ensayos liposomas-PMM para

demostrar la interacción entre moléculas del hospedero y componentes de la célula fúngica. En consecuencia, se realizaron ensayos para inducir la inhibición de adherencia de levaduras de *H. capsulatum*, tratadas con carbohidratos, a liposomas marcados con [1,2-³H(N)]-colesterol conteniendo proteínas de membranas de macrófagos. Los datos de la figura 2, con base en la inhibición alcanzada con la galactosa y la lactosa, sugieren que los residuos galactosilados de las proteínas de membranas de macrófagos son el principal blanco en el mecanismo de reconocimiento promovido por componentes de *H. capsulatum*. En contraste, otras moléculas de carbohidratos no relacionadas a la galactosa no modifican la interacción entre proteínas de membranas de macrófagos y *H. capsulatum* (Fig. 2). Además, los resultados de la tabla 1 apoyan que residuos β -galactosil de moléculas glicoprotéicas de superficie de macrófagos peritoneales de murino son, en particular, los determinantes para la interacción con levaduras de *H. capsulatum*. Esto se observa en la tabla 1, tanto en los valores más bajos del índice de adherencia como en los más altos porcentajes de la inhibición de adherencia alcanzados en los ensayos con levaduras tratadas con galactosa. Ensayos simultáneos, utilizando levaduras de *C. albicans* como testigo de célula fúngica con un componente tipo lectina con especificidad para manosa (Calderone, 1993; Diamond, 1993), reforzaron indirectamente los hallazgos que definen la especificidad de *H. capsulatum* hacia moléculas de galactosa, ya que las levaduras de *C. albicans* tratadas con galactosa o moléculas asociadas no modificaron la habilidad de éstas de unirse a los macrófagos, mientras que el tratamiento con manosa inhibió la interacción con los macrófagos (Tabla 2).

Ensayos con macrófagos tratados con azúcares previa adición de levaduras, fueron realizados con el objeto de identificar una posible mediación de un receptor tipo lectina del macrófago que reconociera como ligando azúcares presentes en la superficie de levaduras de *H. capsulatum*, sin embargo, nunca se detectó la inhibición de adherencia de levaduras no tratadas del hongo. La necesidad de ensayos con este sistema de interacción se justifica por el antecedente en *C. albicans* que utiliza diferentes mecanismos de reconocimiento dependiendo de la célula hospedera con la que interacciona, por ejemplo, utiliza una adhesina tipo lectina (manoproteína) para interaccionar con residuos de Fuc-Gal y GlcNAc-Gal de células epiteliales o bien, utiliza residuos de manosa (presentes en las mananas de su pared celular) para interaccionar con un receptor tipo lectina (manosa/fucosa) de monocitos

y macrófagos de humano y de murino (Kennedy *et al.*, 1992; Calderone, 1993; Diamond, 1993).

La determinación de la inhibición de la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* tratadas con carbohidratos, a la superficie de macrófagos peritoneales o alveolares, con un método de mayor sensibilidad como el de ELISA, permitió obtener resultados cuantitativos y fehacientes de esta interacción (Tablas 3 y 4). Éstos destacaron nuevamente, la participación de la galactosa y moléculas asociadas en la interacción tanto con macrófagos peritoneales como los alveolares. Los resultados resaltan el efecto de las galactosas y destaca a la β -galactosa como el principal azúcar con habilidad de inhibir la unión de levaduras a ambos tipos de macrófagos, lo que demuestra que este reconocimiento es manifiesto en estas dos poblaciones de macrófagos. Aunque pueden existir diferencias inherentes a la eficiencia de una u otra población de macrófagos para adherir levaduras de *H. capsulatum*, los resultados no discriminaron, categóricamente, niveles de reconocimiento para inferir el efecto asociado al origen de la célula hospedera. Sin embargo, la importancia de la unión de las levaduras a macrófagos alveolares radica en la posibilidad para definir el destino de la infección inicial en el hospedero, al considerar que estos macrófagos constituyen una de las primeras líneas de defensa contra patógenos que utilizan como vía de entrada el aparato respiratorio. Tal es el caso de *H. capsulatum*, que además, en macrófagos de los espacios bronquioalveolares realiza posiblemente su cambio dimórfico de fase infectante (microconidios y pequeños fragmentos de hifas) a fase parasitaria y virulenta (levaduras) (Eissenberg y Goldman, 1994; Deepe, 2000).

Con base en el antecedente de una proteína fúngica de 50 kDa descrita en *H. capsulatum* (McMahon *et al.*, 1995) que se une a laminina, considerando además que la laminina está altamente glicosilada y posee residuos terminales de ácido siálico, la interacción levaduras de *H. capsulatum*-eritrocitos ha sido investigada. Se han tomado en cuenta, además, algunos aspectos biológicos interesantes: 1) algunas lectinas fueron descubiertas por su capacidad para aglutinar eritrocitos *in vitro*, lo cual se pierde con el tratamiento con neuraminidasa de éstas células; 2) la laminina tiene un probable sitio de unión a *H. capsulatum*; y 3) ambos, eritrocitos y laminina, comparten altas concentraciones de residuos D-galactosil y ácido siálico (Ni y Tizard, 1996).

En consecuencia, el componente tipo lectina de levaduras de *H. capsulatum* fue

estudiado por su habilidad de adherirse a eritrocitos. Inicialmente, se probó la habilidad de las levaduras del hongo para adherirse a eritrocitos de diferentes especies de mamíferos (Fig. 3). Los resultados mostraron una mayor eficiencia de las levaduras para adherirse a eritrocitos de rata y conejo, mientras que los eritrocitos de ratón y caballo presentaron un porcentaje de adherencia de levaduras similar y aproximado al alcanzado con los eritrocitos humanos (Fig. 3). La utilización de eritrocitos de algunas especies de mamíferos reveló diferencias en la habilidad de las levaduras para reconocer moléculas de superficie en los distintos eritrocitos probados, una explicación para este comportamiento puede estar asociada a la heterogeneidad en la estructura y composición química de las membranas de los eritrocitos, la cual ha sido ampliamente documentada (Klimas *et al.*, 1982; Krotkieski, 1988). Nuestros resultados son pioneros, ya que en la literatura no se había descrito este tipo de interacción para *H. capsulatum*. Además, permiten hacer conjeturas sobre la implicación de este hallazgo en el mecanismo de patogenicidad de *H. capsulatum*, considerando que la habilidad de las levaduras de unirse a eritrocitos podría estar no sólo asociada a una vía de diseminación del hongo en el hospedero, sino también a manifestaciones patológicas poco frecuentes de la enfermedad, interviniendo como probable cofactor en la coagulopatía asociada a formas graves de la histoplasmosis diseminada (Wheat *et al.*, 1990).

Los ensayos de adherencia de eritrocitos humanos de los grupos sanguíneos A, B y O con levaduras de distintas cepas de *H. capsulatum* se realizaron con el fin de identificar diferencias de reconocimiento asociadas, tanto a las moléculas tipo lectinas de las distintas levaduras como a los determinantes específicos (residuos terminales de azúcares) de cada uno de los grupos sanguíneos. La figura 4 destaca que la interacción entre levaduras de *H. capsulatum* de las tres cepas utilizadas se manifiesta de manera más homogénea con eritrocitos de los grupos sanguíneos B y O, particularmente para la cepa EH-53, mientras que los eritrocitos del grupo A fueron más eficientes para unirse a levaduras de las cepas G-217B y Downs, quizá debido a que la molécula tipo lectina de estas levaduras presenten mayor afinidad a la N-acetilgalactosamina en posición terminal no reductora, que caracteriza este grupo sanguíneo. El hecho de que las diferentes cepas de *H. capsulatum* sean capaces de adherirse a eritrocitos humanos de distintos grupos sanguíneos, sugiere que el reconocimiento para estructuras galactosiladas de los eritrocitos está bien preservado en

este patógeno. Por otro lado, aunque se encontraron diferencias entre la unión de levaduras con eritrocitos del grupo sanguíneo A y los demás grupos ($p < 0.05$), no se puede definir categóricamente que exista mayor afinidad de las levaduras del hongo para unirse a eritrocitos de un grupo sanguíneo particular. Antecedentes de la literatura resaltan un hallazgo único asociado a una mayor susceptibilidad a la infección y curso grave de la enfermedad en individuos del grupo sanguíneo B que contrajeron coccidioidomicosis (Deresinski *et al.*, 1979), micosis con nosología parecida a la histoplasmosis. Sin embargo en esta última, no se ha descrito un evento similar y la relación entre esta característica genética del hospedero y los hallazgos encontrados en el presente estudio abren nuevas perspectivas de investigación.

La habilidad de las levaduras de *H. capsulatum* para adherirse a eritrocitos, se traduce en la demostración de que las levaduras pueden aglutinar eritrocitos humanos. En una serie de secuencias fotográficas se pueden observar como las levaduras se adhieren individualmente (Fig. 5a) o forman puentes entre eritrocitos (Fig. 5b), cuando se incuban una concentración baja de levaduras con eritrocitos. Además, a una mayor relación levadura/eritrocito se observaron imágenes que representan una fase preaglutinante (Fig. 5d) hasta alcanzar una hemaglutinación muy evidente (Fig. 5e). Es importante mencionar que la habilidad de las levaduras tanto para adherir como para aglutinar eritrocitos humanos del grupo sanguíneo O se mantiene estable, a pesar del tratamiento de éstos con neuraminidasa. Esto sugiere que la lectina de *H. capsulatum* puede interaccionar con los eritrocitos humanos del grupo sanguíneo O independientemente de la integridad de la molécula de ácido siálico.

La especificidad de reconocimiento de la molécula tipo lectina de *H. capsulatum* fue categóricamente demostrada en los ensayos de inhibición de adherencia de *H. capsulatum* a eritrocitos humanos del grupo sanguíneo O, al utilizar levaduras tratadas con diferentes azúcares relacionados a la galactosa. Aunque la galactosa y moléculas relacionadas son los sacáridos inhibitorios, la relevancia del OH axial del carbono 4 y del carbono anomérico de la galactosa son determinantes para la interacción de esta lectina, ya que los más altos valores de inhibición de la adherencia estuvieron asociados al anómero β -galactosa (Fig. 6 y Tabla 5).

Es importante hacer notar que los resultados inhibitorios obtenidos con levaduras de

H. capsulatum tratadas con glicosaminoglicanos que comparten residuos galactosil (condroitin sulfato A y C) y glucosil (heparán sulfato), así como la inhibición con ácido siálico, sugieren que la interacción de *H. capsulatum* con las estructuras glicosiladas y/o sialiladas de los eritrocitos podría estar también mediada por fuerzas iónicas, ya que en la respuesta de inhibición del heparán sulfato y del ácido siálico, podrían estar implicadas las cargas negativas de los grupos sulfato y carboxilo, asociadas a cada una de estas moléculas (Tabla 5). En este último tipo de ensayo, la inhibición alcanzada con la galactosa y moléculas asociadas utilizadas como azúcares de referencia, nuevamente involucra a la β -galactosa (Tabla 5).

La participación del ácido siálico en la interacción de levaduras de *H. capsulatum* y eritrocitos del hospedero debe ser analizada de manera cuidadosa, ya que las propiedades fisicoquímicas de esta molécula pueden modular asociaciones biológicas de células del hospedero y microorganismos, como ha sido demostrado en la relación hospedero-parásito con otros modelos fúngicos (Alviano *et al.*, 1999). No obstante que el tratamiento de los eritrocitos O con neuraminidasa no impidió su hemaglutinación en presencia de levaduras de *H. capsulatum*, sugiriendo que las moléculas de reconocimiento para la posible lectina del hongo eran los residuos galactosilados de estos eritrocitos, hay que considerar alternativas para explicar el efecto de la neuraminidasa en la interacción de eritrocitos de ratón con las levaduras, ya que la neuraminidasa actuó de manera distinta en ambos eritrocitos. Una probable explicación sería dada por diferencias en ambas poblaciones de eritrocitos que podrían estar asociadas a la concentración de las estructuras o motivos estructurales del ácido siálico que funcionan como sitio específico para la enzima (Varki, 1997).

Por otro lado, los resultados de los ensayos de inhibición de adherencia a los eritrocitos del grupo sanguíneo O, previo tratamiento de levaduras con moléculas exógenas de ácido siálico (Tabla 5), sugieren que las cargas negativas del grupo carboxilo del ácido siálico podrían estar mediando una actividad biológica dirigida por fuerzas iónicas, entre las levaduras y los eritrocitos. La participación de fuerzas iónicas en la interacción de otros patógenos fúngicos con células hospederas ha sido descrita tanto por Bouchara *et al.* (1997) como por Wasylnka y Moore (2000). Sin embargo, las interacciones de cargas eléctricas en los ensayos de Bouchara *et al.* (1997) están mediadas por residuos de ácido siálico de la

laminina con moléculas de la superficie de conidios de *A. fumigatus*, mientras que Wasylnka y Moore (2000) sugieren un nuevo mecanismo de adherencia de conidios de varias especies de *Aspergillus* a proteínas de matriz extracelular como la fibronectina bovina (fragmentos de 40, 45 y 120 kDa) y proteínas de la lamina basal de la línea celular A549 de neumocitos. Los autores plantean que esta interacción parece involucrar la participación de carbohidratos cargados negativamente, presentes en la superficie de los conidios de *Aspergillus* sp. (Wasylnka y Moore, 2000).

La complejidad de la estructura de los carbohidratos ha sido demostrada con base en los siguientes factores (Elgavish y Shaanan, 1997; Ni y Tizard, 1996): 1) los residuos de azúcar pueden unirse entre ellos en tres o cuatro diferentes posiciones; 2) dos azúcares pueden unirse en dos formas isoméricas, los enlaces α y β ; 3) las cadenas de carbohidratos pueden tener ramificaciones. Todos estos factores pueden influir en los diferentes mecanismos de reconocimiento entre las células fúngicas y el hospedero. Además algunas veces la interacción puede ser influenciada por múltiples factores. El análisis y discusión de nuestros resultados, en diferentes sistemas de interacción como proteínas purificadas de membranas de macrófagos además de fagocitos y eritrocitos completos, han implicado en repetidas ocasiones a los residuos galactosilados de las moléculas de superficie de las células hospederas, como principal blanco para la interacción mediada por una posible lectina presente en componentes de *H. capsulatum*. Sin embargo, en la interacción de levaduras de *H. capsulatum* con eritrocitos también consideramos un posible mecanismo mediado por fuerzas iónicas.

La importancia de la interacción de levaduras de *H. capsulatum* (fase parasitaria y virulenta del hongo) con diferentes células del hospedero puede estar asociada a mecanismos de patogenicidad aún no descritos para este parásito y la implicación de la interacción, mediada por una molécula tipo lectina de *H. capsulatum*, tanto con macrófagos peritoneales y alveolares (primera línea de defensa del hospedero para parásitos de vías respiratorias) como con eritrocitos, abre la perspectiva de definir las principales células blanco para este parásito en hospederos susceptibles, y además, de crear nuevas interrogantes sobre las señales asociadas a esta interacción, tanto en la célula hospedera como en la célula parásita. Se conoce que los componentes glicosilados de la superficie del macrófago pueden ser reconocidos por diversas lectinas (Keipe *et al.*, 1986), las cuales

pueden modificar la respuesta del fagocito favoreciendo o inhibiendo la ingestión de microorganismos o partículas, al alterar la organización del citoesqueleto (Maldonado *et al.*, 1994; Gorocica *et al.*, 2000). *Histoplasma* puede utilizar diferentes vías para entrar a la célula hospedera, incluyendo la lectinofagocitosis, y ha desarrollado varias estrategias que le permiten sobrevivir y multiplicarse intracelularmente (Dumont y Robert, 1970; Wolf *et al.*, 1987; Taylor *et al.*, 1989; Wolf *et al.*, 1992; Eissenberg *et al.*, 1993; Taylor y Duarte-Escalante, 1995). De ahí que la necesidad de entender los mecanismos que modulan su interacción, con diferentes células hospederas y sus respectivos microambientes celulares, resulta fundamental para incidir en el destino intracelular del parásito. En los últimos años se han descubierto mecanismos por los cuales, los parásitos han desarrollado habilidades para manipular la estructura y las vías de señalización de la célula hospedera en su beneficio, con el fin de crear un entorno más hospitalario. Una de estas habilidades, muy comúnmente utilizada, es la de remodelar los comportamientos de la célula hospedera, cambiando radicalmente su estructura y función, como lo hace por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis* al promover la exclusión de la ATPasa vacuolar. Otra, es la manipulación más sofisticada de las vías de señalización, inhibiendo algunas para impedir la respuesta hostil, o más notablemente, activando otras para explotarlas para su invasión y poder sobrevivir intracelularmente, como lo hacen por ejemplo algunos parásitos al inhibir la actividad de la proteína cinasa C (PKC) (Beverly, 1996). Hasta el momento, los estudios dirigidos a elucidar mecanismos de interferencia en las vías de señalización de células hospederas, asociados a la infección por *H. capsulatum* son escasos, aunque se ha encontrado que la ingestión de levaduras del hongo por macrófagos peritoneales de murino desactiva el estallido respiratorio, posiblemente por un efecto inhibitorio de la función de la PKC (Wolf *et al.*, 1992). Sin embargo, en este estudio no queda claro que tipo de PKC particular fue involucrado y tampoco ubica las señales intracelulares alteradas. Una trascendencia del bloqueo de una de las PKC (PKC θ) es, por ejemplo, la alteración de la función inmunomoduladora de genes del factor nuclear κ B (NF- κ B) en linfocitos humanos, con el subsecuente abatimiento de la producción de citocinas pro y antiinflamatorias, quimiocinas, etc. ya que se conoce que la PKC θ es una molécula integradora de señales coestimuladoras de TCR/CD28, que llevan a la activación de NF- κ B.

Los hallazgos del presente estudio abren la posibilidad de utilizar mejores

estrategias para determinar con mayor precisión el/los mecanismos que utiliza el hongo para establecerse en el hospedero y los cambios celulares asociados al binomio *Histoplasma*-célula blanco del hospedero. Además, aportan un nuevo tipo de interacción de *H. capsulatum* que pudiera estar involucrado en la persistencia intracelular del hongo, en la virulencia y diseminación de éste, así como en la susceptibilidad del hospedero a la infección.

CONCLUSIONES

1. La interacción entre macrófagos peritoneales y alveolares de ratón y levaduras de *H. capsulatum* está mediada por una probable lectina del hongo que reconoce, de preferencia, residuos galactosil expuestos en la membrana de estos macrófagos.
2. La β -galactosa fue siempre mejor reconocida que su α -anómero en ensayos de inhibición de adherencia de levaduras, tratadas con diferentes azúcares, a macrófagos peritoneales y alveolares.
3. La interacción entre levaduras de *H. capsulatum* y eritrocitos de algunos mamíferos es descrita por primera vez. Esta interacción reveló además, que existen diferencias en la especificidad de reconocimiento de las levaduras hacia moléculas de superficie de los eritrocitos.
4. La habilidad de levaduras de *H. capsulatum* para adherirse y aglutinar eritrocitos humanos es un hallazgo interesante que puede estar asociado a la patogénesis del hongo.
5. El OH axial del carbono 4 y el del carbono anomérico de la β -galactosa parecen ser importantes para la interacción de la molécula de reconocimiento del hongo (probable lectina) con eritrocitos humanos.
6. La interacción entre levaduras de *H. capsulatum* de distintas cepas y eritrocitos humanos de diferentes grupos sanguíneos sugiere que el reconocimiento, para estructuras galactosiladas de los eritrocitos, está bien preservado en este patógeno.
7. La interacción de *H. capsulatum* con las estructuras glicosiladas y/o sialiladas de los eritrocitos podría estar también mediada por fuerzas iónicas, según los resultados de la inhibición con glicosaminoglicanos que comparten residuos galactosil (condroitin sulfato A y C) y glucosil (heparán sulfato), así como la inhibición con ácido siálico.
8. La importancia de la interacción de levaduras de *H. capsulatum* (fase parasitaria y virulenta del hongo) con diferentes células del hospedero puede estar asociada a mecanismos de patogenicidad aún no descritos para este parásito.

REFERENCIAS

- Alviano, C. S., L. R. Travassos, and R. Schauer. 1999. Sialic acids in fungi: a minireview. *Glycoconjugate J.* 16:545-554.
- Aramaky, Y., M. Murai, and S. Tsuchiya. 1993. Contribution of N-acetyl- β -D-galactosamine-specific lectin to Fc receptor-mediated phagocytosis by mouse peritoneal macrophages. *Immunology* 79:403-407.
- Barr, K., R. A. Laine, and R. L. Lester. 1984. Carbohydrate structures of three novel phosphoinositol-containing sphingolipids from the yeast *Histoplasma capsulatum*. *Biochemistry* 23:5589-5596.
- Barr, K., and R. L. Lester. 1984. Occurrence of novel antigenic phosphoinositol-containing sphingolipids in the pathogenic yeast *Histoplasma capsulatum*. *Biochemistry* 23:5581-5588.
- Beverly, S. M. 1996. Hijacking the cell: parasites in the driver's seat. *Cell* 87:787-789.
- Bouchara, J. P., M. Sánchez, A. Chevailler, A. Marot-Leblond, J. C. Lissitzky, G. Tronchin, and D. Chabasse. 1997. Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* 65:2717-2724.
- Bouchara, J. P., G. Tronchin, and D. Chabasse. 1994. Mechanisms and implications of the adhesion phenomenon in *Aspergillus fumigatus*. *Pathol. Biol. (Paris)* 42:640-646.
- Bromley, I. M., and K. Donaldson. 1996. Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung. *Thorax* 51:1203-1209.
- Bullock, W. E. 1993. Interactions between human phagocytic cells and *Histoplasma capsulatum*. *Arch. Med. Res.* 24:219-223.
- Bullock, W. E., and 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.
- Calderone, R. A. 1993. Molecular interactions at the interface of *Candida albicans* and host cells. *Arch. Med. Res.* 24:275-279.
- Cohen, C. M., D. I. Kalish, B. S. Jacobson, and D. Branton. 1977. Membrane isolation on polylysine-coated beads. Plasma membrane from HeLa cells. *J. Cell Biol.* 75:119-134.
- Davis, C. D., and R. E. Kuhn. 1990. Selective binding of *Trypanosoma cruzi* to host cell

- membrane polypeptides. *Infect. Immun.* 58:1-6.
- Deepe G. S. Jr. 2000. Immune response to early and late *Histoplasma capsulatum* infections. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:359-362.
- Deresinski, S. C., D. Pappagianis, and D. A. Stevens. 1979. Association of ABO blood group and outcome of coccidial infection. *Sabouraudia* 17:261-264.
- Diamond, R. D. 1993. Interactions of phagocytic cells with *Candida albicans* and other opportunistic fungi. *Arch. Med. Res.* 24:361-369.
- Duarte-Escalante, E. 1993. Identificación de proteínas de membrana de macrófagos murinos que interaccionan con componentes del hongo patógeno *Histoplasma capsulatum*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D.F.
- Dumont, A., and A. Robert. 1970. Electron microscopic study of phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* by hamster peritoneal macrophages. *Laboratory Invest.* 23:278-286.
- Eisenberg, L. G., W. E. Goldman, and P. H. Schlesinger. 1993. *Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. *J. Exp. Med.* 177:1605-1611.
- Eisenberg, L. G., and W. E. Goldman. 1994. The interplay between *Histoplasma capsulatum* and its host cells. *Bailliere's Clin. Infect. Dis.* 1:265-283.
- Elgavish, S., and B. Shaanan. 1997. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem. Sci.* 22:462-467.
- Gil, M. L., M. C. Penalver, J. L. López-Ribot, J. E. O'Connor, and J. P. Martínez. 1996. Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* 64:5239-5247.
- Gorocica, P., E. Duarte-Escalante, R. Chávez, F. Porrás, M. L. Taylor, and E. Zenteno. 1998. Fagocitosis no opsónica, lectinofagocitosis de *Histoplasma capsulatum*. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 11:232-236.
- Gorocica, P., P. Hernández, A. Pérez, R. Chávez, R. Baez, E. Zenteno, and R. Lascurain. 2000. Impairment of *Leishmania maxicana* phagocytosis in peritoneal macrophages induced by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunol. Invest.* (En prensa).
- Hamilton, A. J., L. Jeavons, S. Youngchim, and N. Vanittanakom. 1999. Recognition of fibronectin by *Penicillium marneffeii* conidia via a sialic acid-dependent process and its

- relationship to the interaction between conidia and laminin. *Infect. Immun.* 67:5200-5205.
- Hamilton, A. J., L. Jeavons, S. Youngchim, N. Vanittanakom, and R. J. Hay.** 1998. Sialic acid-dependent recognition of laminin by *Penicillium marneffeii* conidia. *Infect. Immun.* 66:6024-6026.
- Holland, P.** 1971. Circulating human phagocytes and *Histoplasma capsulatum*: Ultrastructural observations, p. 580-583. *In Histoplasmosis.* L. Ajello, E. W. Chick and M. L. Furcolow. (eds.), Proceedings of the Second National Conference. Thomas, Springfield, Illinois.
- Jacobson, B. S.** 1980. Improved method for isolation of plasma membrane on cationic beads. Membranes from *Dictyostelium discoideum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 600:769-780.
- Jérez, M. E., y M. L. Taylor.** 1989. Estudio del receptor manosa/fucosa en la fagocitosis de levaduras de *Histoplasma capsulatum*. *Rev. Mex. Mic.* 5:241-259.
- Jiménez-Lucho, V., V. Ginsburg, and H. C. Krivan.** 1990. *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal β 1-4Glc β 1-1Cer), a possible adhesion receptor for yeasts. *Infect. Immun.* 58:2085-2090.
- Keipe, H., U. Shumacer, and M. Parwaresch.** 1986. Lectin binding and surface glycoprotein pattern of human macrophage populations. *Histochem.* 86:201-206.
- Kennedy, M. J., R. A. Calderone, J. E. Cutler, T. Kanabe, M. H. Riesselman, R. Robert, J. M. Senet, V. Annaix, A. Bouali, C. Mahaza, G. Tronchin, J. P. Bouchara, M. Miegerville, A. Marot-Leblond, and E. Segal.** 1992. Molecular basis of *Candida albicans* adhesion. *J. Med. Vet. Mycol.* 30:95-122.
- Klimas, N. G., K. E. Caldwell, P. L. Whitney, and M. A. Fletcher.** 1982. Comparison of receptor properties of erythrocyte membrane glycoproteins. *Dev. Comp. Immunol.* 6:765-774.
- Krotkiewski, H.** 1988. The structure of glycophorins of animal erythrocytes. *Glycoconjugate J.* 5:35-48.
- Maldonado, G., P. Gorocica, C. Agundis, A. Pérez, J. Molina, and E. Zenteno.** 1998. Inhibition of phagocytic activity by the N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Amaranthus leucocarpus*. *Glycoconjugate J.* 15:615-622.
- McMahon, J. P., J. Wheat, M. E. Sobel, R. Pasula, J. F. Downing, and W. J. Martin II.**

1995. Murine laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. *J. Clin. Invest.* 96:1010-1017.
- Newman, S. L., C. Bucher, J. Rhodes, and 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.
- New, R. R. C. 1990. Preparation of liposomes, p. 33-104. *In* Liposomes. A practical approach. IRL PRESS and Oxford University Press, Oxford.
- Ni, Y., and I. Tizard. 1996. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 55:205-223.
- Ofek, I., J. Goldhar, Y. Keisari, and N. Sharon. 1995. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:239-276.
- Ofek, I., and N. Sharon. 1988. Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infect. Immun.* 56:539-547.
- Rico-Galindo, B., E. Duarte-Escalante, and M. L. Taylor. 1991. Fagocitosis por macrófagos murinos de levaduras de *Histoplasma capsulatum* opsonizadas con diferentes subclases de IgG. *Rev. Mex. Mic.* 7:157-174.
- Sánchez, S. B., and L. M. Carbonnell. 1975. Immunological studies in *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 11:387-394.
- Sharon, N. 1996. Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease, p. 1-8. *In* I. Kahane and I. Ofek (ed.), *Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases*. Plenum Press, New York.
- Schnur, R. A., and 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.
- Taylor, M. L., M. E. Espinosa-Schoelly, B. Rico-Galindo, J. Casasola, and F. Goodsaid. 1989. Evaluation of phagolysosome fusion in acridine orange stained macrophages infected with *Histoplasma capsulatum*. *Clin. Exp. Immunol.* 75:466-470.
- Taylor, M. L., y E. Duarte-Escalante. 1995. Estrategias del *Histoplasma capsulatum* para evadir los mecanismos citocidas de los fagocitos. *Rev. Invest. Clin.* 47:499-506.

- Taylor, M. L., B. Rico, and F. Goodsaid.** 1995. Study of Fc gamma murine macrophage receptors (Fc gamma R) in the internalization of *Histoplasma capsulatum* yeasts. *Arch. Med. Res.* 26:179-184.
- Taylor, M. L., E. Duarte-Escalante, M. R. Reyes-Montes, N. Elizondo, G. Maldonado, and E. Zenteno.** 1998. Interaction of murine macrophage-membrane proteins with components of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Clin. Exp. Immunol.* 113:423-428.
- Tronchin, G., J. P. Bouchara, G. Larcher, J. C. Lissitzky, and D. Chabasse.** 1993. Interaction between *Aspergillus fumigatus* and basement membrane laminin: binding and substrate degradation. *Biol. Cell* 77:201-208.
- Varki, A.** 1997. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J.* 11:248-255.
- Voller, A, D. E. Bidwell, and A. Bartlett.** 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), A guide with abstracts of microplate applications, p. 35-43. Dynatech Europe Laboratories Inc., London.
- Wasylnka, J. A., and M. M. Moore.** 2000. Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface. *Infect. Immun.* 68:3377-3384.
- Wheat, L. J., P. A. Connolly-Stringfield, R. L. Baker, M. F. Curfman, K. S. Israel, S. A. Norris, D. H. Webb, and M. L. Zeckel.** 1990. Disseminated histoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome: Clinical findings, diagnosis and treatment, and review of the literature. *Medicine* 69:361-374.
- Wolf, J. E. , S. E. Massof, J. R. Sherwin, and R. V. Considine.** 1992. Inhibition of murine macrophage protein kinase C activity by nonviable *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 60:2683-2687.
- Wolf, J. E., V. Kerchberger, G. S. Kobayashi, and J. R. Little.** 1987. Modulation of the macrophage oxidative burst by *Histoplasma capsulatum*. *J. Immunol.* 138:582-586.

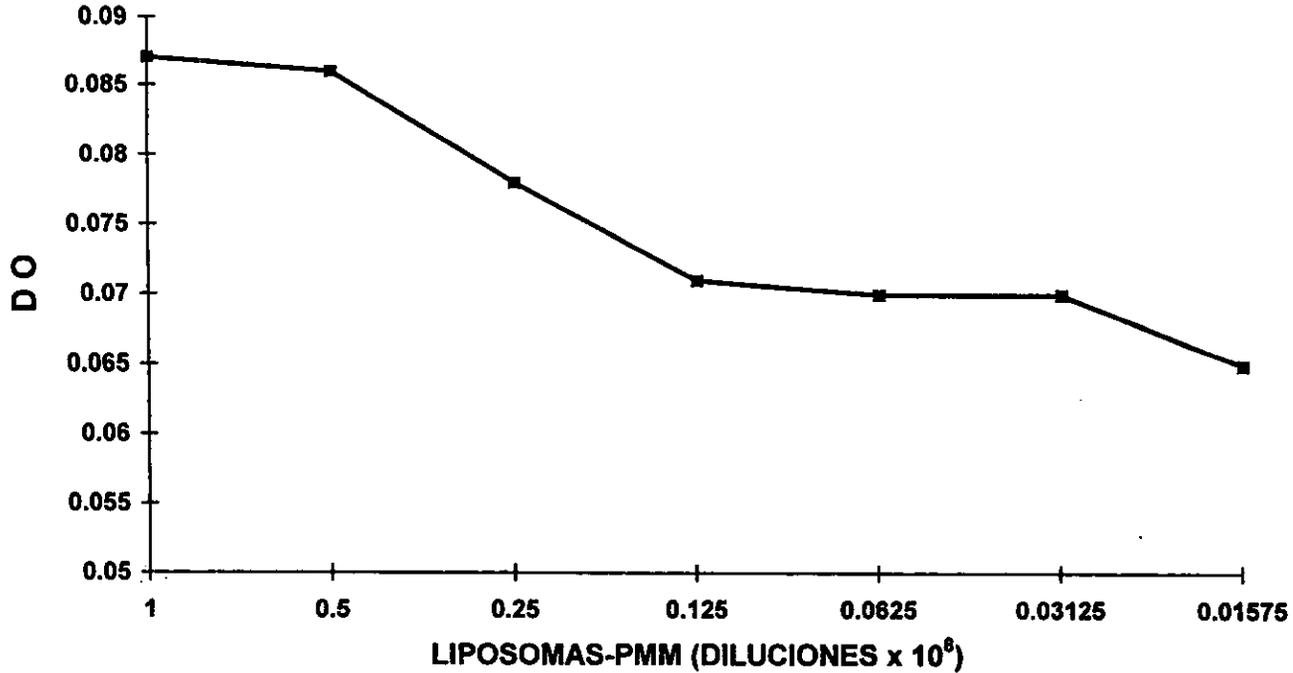


Figura 1. Adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a liposomas-PMM no radioactivos. Se utilizó un método de ELISA adaptado para la detección de levaduras adheridas a liposomas-PMM. Estos fueron purificados, diluidos y fijados en placas de 96 pozos. Después de la adición de levaduras, se añadieron a los pozos sueros hiperinmune anti-*Histoplasma* o normal de conejo. Los pozos sin levaduras fueron utilizados como testigo de actividad inespecífica de los liposomas-PMM. La reacción fue revelada con el sistema anti-IgG biotinilada/estreptavidina-peroxidasa. Para detalles de procedimiento ver materiales y métodos. Los valores de DO graficados expresan dos tipos de correcciones, una de las lecturas obtenidas de los pozos procesados con suero hiperinmune y los procesados con suero normal, la otra corrección consideró, para cada tipo de suero, los valores corregidos de los pozos con y sin levaduras.

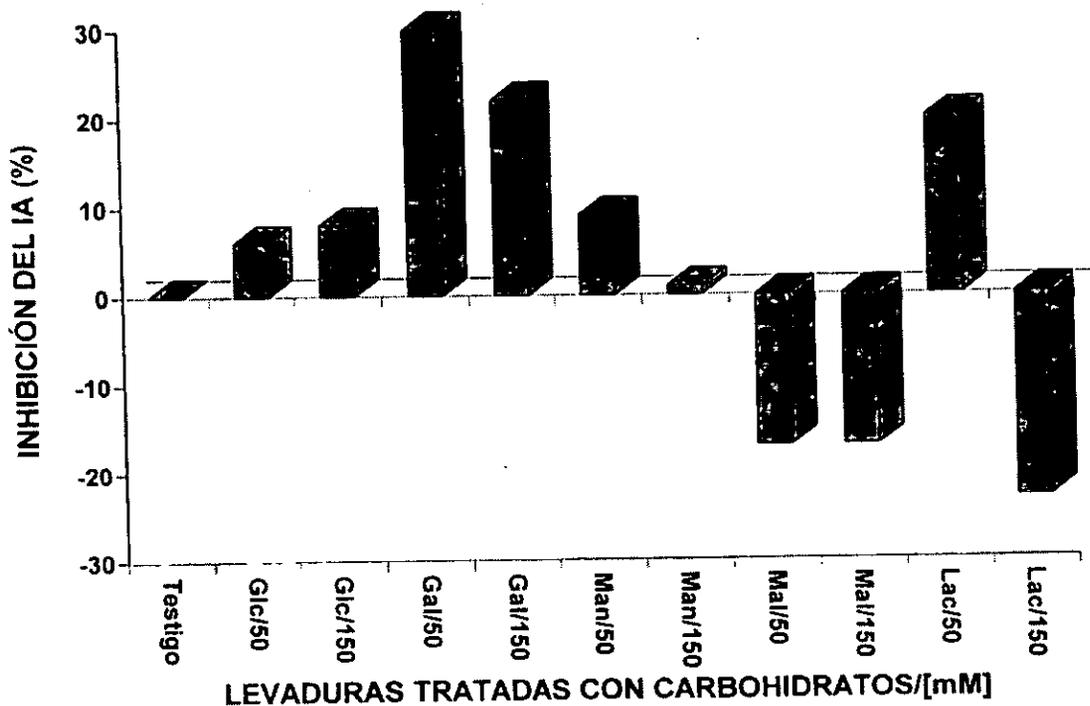


Figura 2. Inhibición de la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* tratadas con monosacáridos o disacáridos a liposomas-[1,2-³H(N)-colesterol-PMM. Levaduras tratadas con monosacáridos y disacáridos a dos distintas concentraciones, fueron incubadas a 4°C por 1 h con liposomas-[1,2-³H(N)-colesterol-PMM, purificados como se describió en materiales y métodos. Levaduras no tratadas con carbohidratos unidas a liposomas-[1,2-³H(N)-colesterol-PMM, funcionaron como testigo de adherencia. Todas las muestras se procesaron por triplicado. Los datos expresan el porcentaje de inhibición del índice de adherencia (IA) calculado como se describe en materiales y métodos.

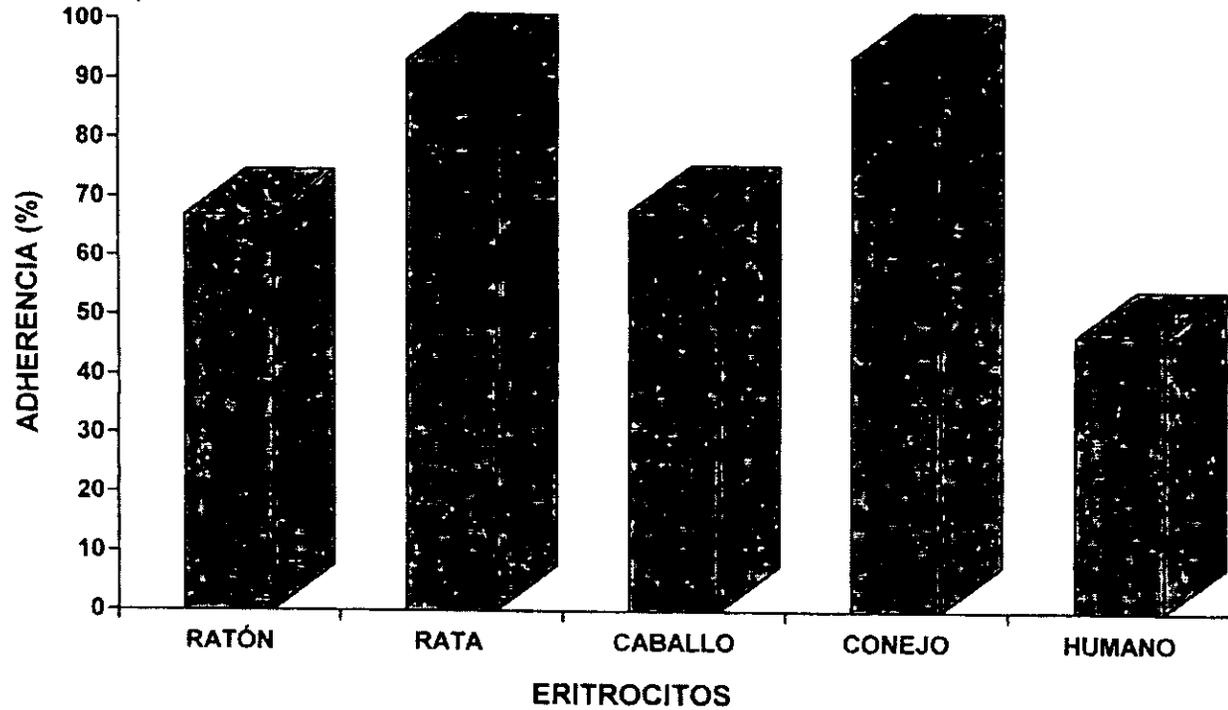


Figura 3. Adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a eritrocitos de mamíferos. Levaduras de la cepa EH-53 (1×10^7) fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 min con 1×10^6 eritrocitos de diferentes especies de mamíferos en PBS 150 mM, pH 7.2. Los ensayos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. Los datos expresan el porcentaje de adherencia. Ver detalles en materiales y métodos.

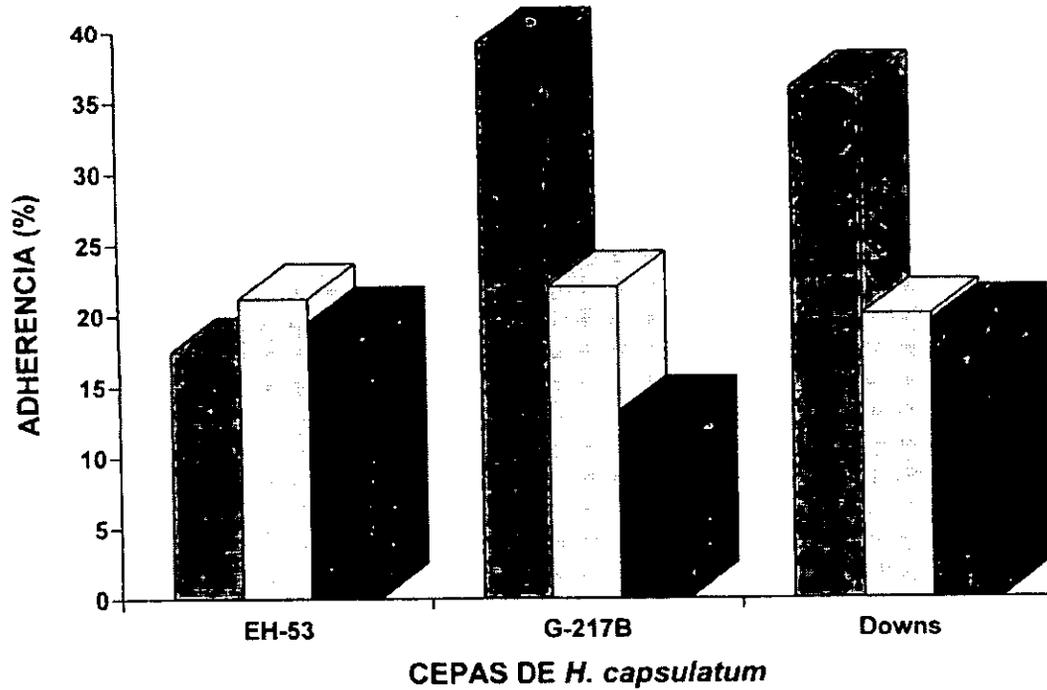


Figura 4. Adherencia de levaduras de diferentes cepas de *H. capsulatum* a eritrocitos humanos de distintos grupos sanguíneos. Levaduras de tres distintas cepas fueron incubadas con eritrocitos de los grupos sanguíneos A (■), B (□) u O (▒). Se procedió de manera similar a lo descrito en la figura 3. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos expresan el porcentaje de adherencia. Ver detalles en materiales y métodos.

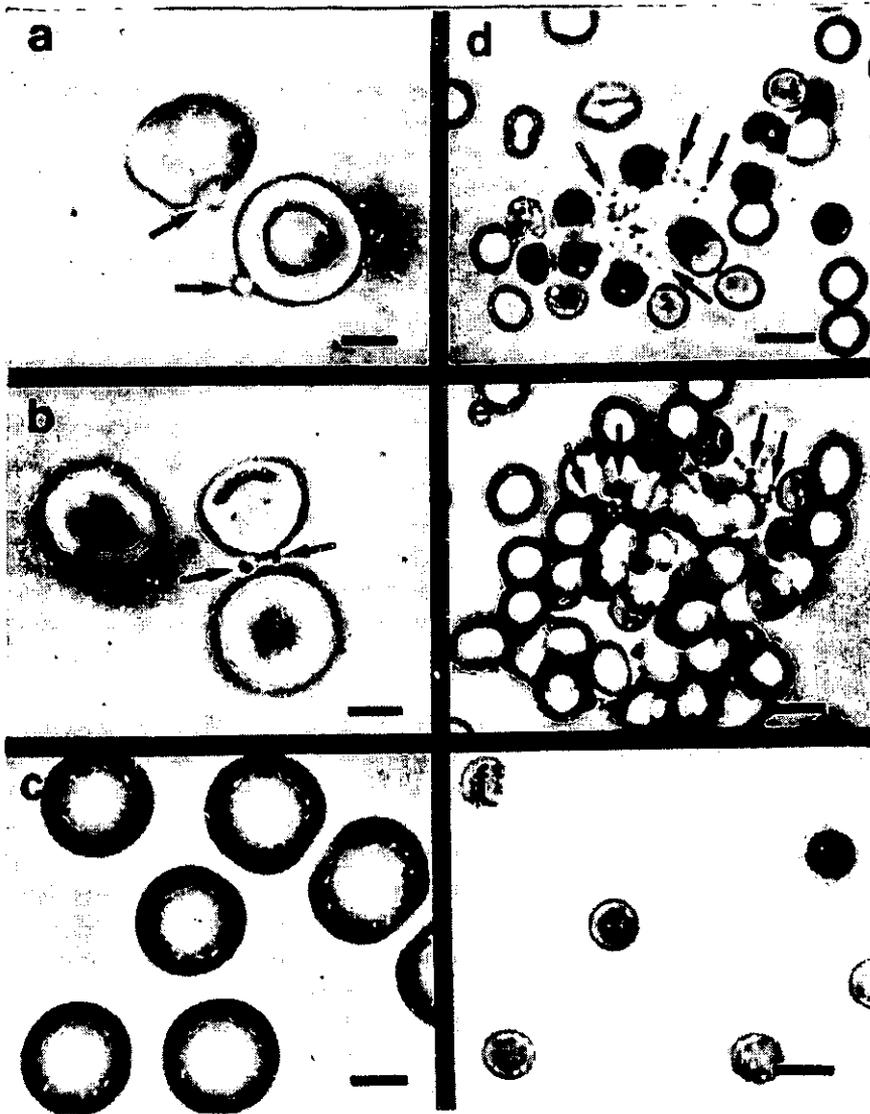


Figura 5 (a, b, c, d, e, f). Actividad hemaglutinante de levaduras de *H. capsulatum*. Tres concentraciones distintas de levaduras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 min con eritrocitos del grupo sanguíneo O. a y b) dosis no aglutinante- 5×10^5 levaduras/ 1×10^6 eritrocitos; d) dosis preaglutinante- 1×10^7 levaduras/ 1×10^6 eritrocitos; e) dosis aglutinante- 5×10^7 levaduras/ 1×10^6 eritrocitos; c y f) testigos de eritrocitos sin levaduras. La adherencia de las levaduras a los eritrocitos fue observada y fotografiada, utilizando un fotomicroscopio Olympus BX50. Ver detalles en materiales y métodos. Las flechas indican levaduras de *H. capsulatum*. Barras = $5 \mu\text{m}$ (a-c); $10 \mu\text{m}$ (d-f).

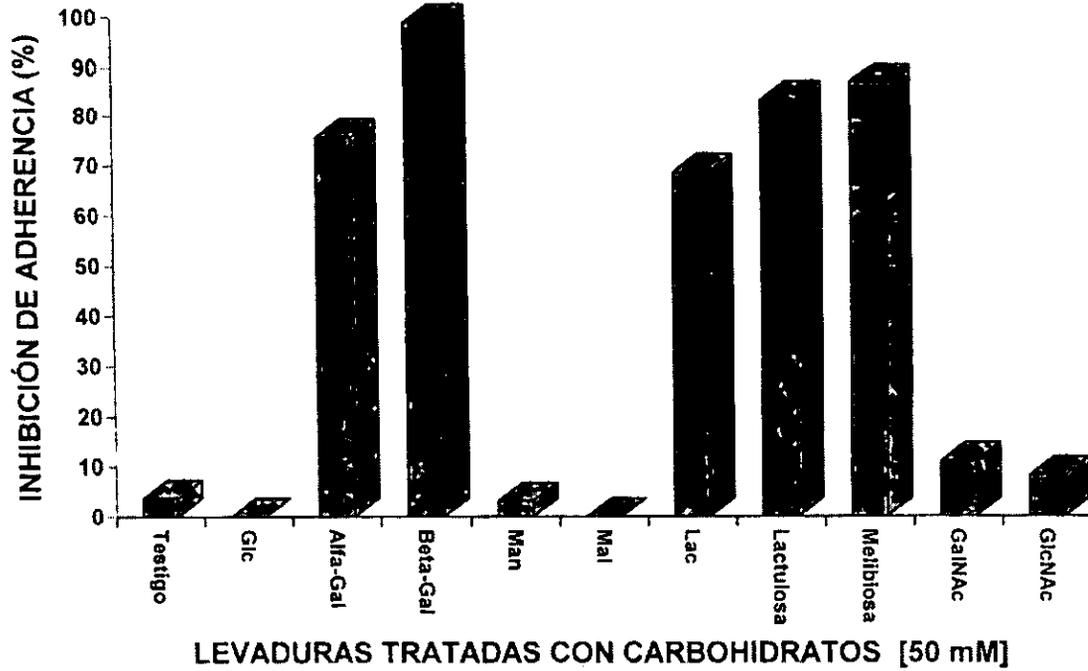


Figura 6. Inhibición de la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* tratadas con monosacáridos, disacáridos o aminoazúcares, a eritrocitos del grupo sanguíneo O. Las levaduras (1×10^7) tratadas con 50 mM de los carbohidratos probados, fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 min con 1×10^6 eritrocitos, en PBS 150 mM, pH 7.2. Levaduras sin tratamiento fueron procesadas como testigos. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos expresan el porcentaje de inhibición de adherencia. Ver detalles en materiales y métodos.

Tabla 1. Efecto del tratamiento de levaduras de *H. capsulatum* con monosacáridos, disacáridos o aminoazúcares en la adherencia a macrófagos peritoneales de ratón

Carbohidrato	Concen- tración [mM]	Índice $\bar{X} \pm DE$	Inhibición (%) $\bar{X} \pm DE$
Lev/NT		602.33 \pm 60.35	
Glc	150	501.5 \pm 19.25	16.73 \pm 8.34
	15	508.5 \pm 14.93	15.57 \pm 9.39
	1.5	519 \pm 7.79	13.83 \pm 9.86
α -Gal	150	54.66 \pm 8.61	90.92 \pm 1.86
	15	70.83 \pm 22.71	88.24 \pm 4.25
	1.5	71.16 \pm 4.62	88.18 \pm 1.65
β -Gal	150	47.5 \pm 9.69	92.11 \pm 2.05
	15	30.83 \pm 5.91	94.88 \pm 1.57
	1.5	NR	NR
Man	150	618.83 \pm 30.15	0 \pm 6.07
	15	581.0 \pm 23.65	3.54 \pm 5.60
	1.5	543.83 \pm 36.09	11.20 \pm 7.84
Mal	150	480.83 \pm 11.30	20.17 \pm 6.93
	15	471.0 \pm 10.43	21.80 \pm 7.64
	1.5	446.5 \pm 10.70	25.87 \pm 10.23
Lac	150	311.0 \pm 9.31	48.36 \pm 5.57
	15	310.5 \pm 10.05	48.45 \pm 5.38
	1.5	303.5 \pm 5.08	49.61 \pm 5.54
GalNAc	150	191.0 \pm 7.79	31.71 \pm 3.92
	15	258.16 \pm 9.88	57.13 \pm 3.99
	1.5	284.33 \pm 7.47	52.79 \pm 5.04
GlcNAc	150	479.16 \pm 8.08	20.44 \pm 8.98
	15	423.16 \pm 7.05	29.74 \pm 8.20
	1.5	421.33 \pm 6.65	30.1 \pm 6.70

La adherencia de levaduras se llevó a cabo a 4°C. Los datos con cada carbohidrato probado corresponden al promedio (\bar{X}) del índice de adherencia y del porcentaje de inhibición de la adherencia \pm desviación estándar (DE). Cada ensayo se realizó por triplicado. Ver detalles de procedimiento en materiales y métodos. Lev/NT- Levaduras no tratadas con carbohidratos; NR- No realizado.

Tabla 2. Efecto del tratamiento de levaduras de *C. albicans* con monosacáridos, disacáridos o aminoazúcares en la adherencia a macrófagos peritoneales de ratón

Carbohidrato	Concentración [mM]	Índice $\bar{X} \pm DE$	Inhibición (%) $\bar{X} \pm DE$
Lev/NT		809 \pm 9.18	
Glc	150	623.83 \pm 10.47	22.88 \pm 1.55
	15	593.66 \pm 6.25	26.61 \pm 1.22
	1.5	620 \pm 8.71	23.36 \pm 1.57
α -Gal	150	537.66 \pm 47.94	33.54 \pm 6.54
	15	469 \pm 32.67	42.02 \pm 4.53
	1.5	395 \pm 11.91	51.17 \pm 4.53
β -Gal	150	467.5 \pm 15.70	42.21 \pm 1.82
	15	404 \pm 22.80	49.93 \pm 2.77
	1.5	249.83 \pm 82.09	69.11 \pm 1.05
Man	150	82 \pm 4.77	89.86 \pm 0.52
	15	78.16 \pm 17.67	90.33 \pm 2.28
	1.5	72.66 \pm 16.57	91.01 \pm 2.10
Mal	150	425.5 \pm 13.75	47.40 \pm 1.66
	15	462.66 \pm 12.65	42.81 \pm 2.01
	1.5	485 \pm 8.5	40.04 \pm 1.52
Lac	150	406 \pm 12.26	49.81 \pm 1.74
	15	392.66 \pm 11.94	51.43 \pm 1.73
	1.5	384.83 \pm 12.2	52.43 \pm 1.89
GalNAc	150	472.16 \pm 10.88	41.63 \pm 1.83
	15	462.66 \pm 12.65	42.81 \pm 1.11
	1.5	485 \pm 8.5	40.04 \pm 0.96
GlcNAc	150	616 \pm 10.65	23.85 \pm 0.82
	15	624.83 \pm 10.43	22.76 \pm 0.94
	1.5	658.83 \pm 18.84	18.59 \pm 2.63

La adherencia de levaduras se llevó a cabo a 4°C. Los datos con cada carbohidrato probado corresponden al promedio (\bar{X}) del índice de adherencia y del porcentaje de inhibición de la adherencia \pm desviación estándar (DE). Cada ensayo se realizó por triplicado. Ver detalles de procedimiento en materiales y métodos. Lev/NT- Levaduras no tratadas con carbohidratos.

Tabla 3. Efecto del tratamiento de levaduras de *H. capsulatum* con diferentes formas de la galactosa en la adherencia a macrófagos peritoneales de ratón, detectado por ELISA

Carbohidrato	Concen- tración [mM]	Inhibición (%)		
		Exp. 1 $\bar{X} \pm DE$	Exp. 2 $\bar{X} \pm DE$	Exp. 3 $\bar{X} \pm DE$
α -Gal	150	61.64 \pm 0	61.64 \pm 0	61.64 \pm 2.96
	50	61.64 \pm 0	65.55 \pm 5.11	61.64 \pm 0
	15	73.29 \pm 3.93	66.47 \pm 2.34	73.29 \pm 3.93
	1.5	99.14 \pm 1.47	96.59 \pm 3.24	99.14 \pm 1.47
β -Gal	150	99.14 \pm 0.49	100 \pm 1.29	99.14 \pm 0.49
	50	99.14 \pm 0.49	100 \pm 5.14	99.14 \pm 2.34
	15	98.29 \pm 0.16	98.57 \pm 2.24	98.28 \pm 0.16
	1.5	97.44 \pm 0.65	98.57 \pm 4.49	97.44 \pm 0.65
Lac	150	75.85 \pm 8.20	61.64 \pm 10.13	75.85 \pm 5.20
	50	75.85 \pm 8.20	61.64 \pm 6.38	75.85 \pm 4.32
	15	96.59 \pm 1.47	99.14 \pm 2.82	96.59 \pm 1.12
	1.5	96.87 \pm 1.47	98.86 \pm 4.49	96.87 \pm 0.28
GalNAc	150	NR	NR	NR
	50	NR	NR	NR
	15	100 \pm 0	76.66 \pm 7.97	100 \pm 0
	1.5	75.85 \pm 4.94	66.47 \pm 4.13	77.48 \pm 3.56

Se utilizó un método de ELISA de acuerdo a Aramaky *et al.* (1993). La adherencia de levaduras se llevó a cabo a 4°C para prevenir su internalización por los macrófagos. Los datos con cada carbohidrato probado corresponden al promedio (\bar{X}) del porcentaje de inhibición de la adherencia, considerando las lecturas de DO corregidas con las de los testigos de levaduras no tratadas y de suero normal \pm desviación estándar (DE). Cada ensayo se realizó por triplicado. Ver detalles en materiales y métodos. NR- No realizado.

Tabla 4. Efecto del tratamiento de levaduras de *H. capsulatum* con diferentes formas de la galactosa en la adherencia a macrófagos alveolares de ratón, detectado por ELISA

Carbohidrato	Concentración [mM]	Inhibición (%)		
		Exp. 1 $\bar{X} \pm DE$	Exp. 2 $\bar{X} \pm DE$	Exp. 3 $\bar{X} \pm DE$
α -Gal	150	79.77 \pm 3.92	84.26 \pm 2.95	78.65 \pm 2.96
	50	56.17 \pm 4.16	64.04 \pm 3.36	85.39 \pm 5.11
	15	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
	1.5	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
β -Gal	150	77.52 \pm 1.96	79.77 \pm 0.49	77.52 \pm 1.29
	50	77.52 \pm 2.93	74.15 \pm 0.49	88.26 \pm 5.14
	15	87.64 \pm 0.49	84.26 \pm 1.17	83.14 \pm 2.34
	1.5	95.50 \pm 1.15	91.01 \pm 2.93	86.51 \pm 4.49
Lac	150	87.64 \pm 3.26	78.65 \pm 3.23	82.02 \pm 1.13
	50	91.01 \pm 4.13	78.65 \pm 2.93	87.64 \pm 3.48
	15	94.38 \pm 2.9	98.76 \pm 0.49	91.01 \pm 2.82
	1.5	91.01 \pm 1.15	95.50 \pm 1.15	100 \pm 0
GalNAc	150	96.62 \pm 3.16	98.87 \pm 0.48	92.13 \pm 3.43
	50	89.88 \pm 2.11	98.82 \pm 1.15	100 \pm 0
	15	83.14 \pm 1.16	77.52 \pm 2.93	67.41 \pm 5.41
	1.5	89.88 \pm 0.93	61.79 \pm 3.17	73.03 \pm 4.62

Se utilizó un método de ELISA de acuerdo a Aramaky *et al.* (1993). La adherencia de levaduras se llevó a cabo a 4°C para prevenir su internalización por los macrófagos. Los datos con cada carbohidrato probado corresponden al promedio (\bar{X}) del porcentaje de inhibición de la adherencia, considerando las lecturas de DO corregidas con las de los testigos de levaduras no tratadas y de suero normal \pm desviación estándar (DE). Cada ensayo se realizó por triplicado. Ver detalles en materiales y métodos.

Tabla 5. Efecto del tratamiento de levaduras de *H. capsulatum* con glicosaminoglicanos en la adherencia a eritrocitos humanos del grupo sanguíneo O

Carbohidrato	Concen- tración	Inhibición (%)		
		Exp. 1 $\bar{X} \pm DE$	Exp. 2 $\bar{X} \pm DE$	Exp. 3 $\bar{X} \pm DE$
α -Gal	150 mM	26.33 \pm 1.52	26.22 \pm 1.76	27.63 \pm 0.57
	15 mM	34.96 \pm 3.93	34.66 \pm 0.57	35.34 \pm 1.52
	1.5 mM	26.22 \pm 1.47	26.33 \pm 2.19	29.34 \pm 1.96
β -Gal	150 mM	43.70 \pm 1.29	43.33 \pm 0.57	44.65 \pm 2.19
	15 mM	37.33 \pm 1.52	37.87 \pm 3.11	36.93 \pm 1.52
	1.5 mM	33.97 \pm 0.16	33.66 \pm 2.34	34.84 \pm 1.52
GalNAc	150 mM	11.33 \pm 1.29	12.33 \pm 2.34	10.36 \pm 0.57
	15 mM	NR	NR	NR
	1.5 mM	NR	NR	NR
Neu5Ac	150 mM	39.80 \pm 3.43	39.36 \pm 0.57	39.66 \pm 1.52
	15 mM	32.33 \pm 0.57	32.05 \pm 1.47	33.36 \pm 1.47
	1.5 mM	47.55 \pm 1.14	47.33 \pm 1.52	48.34 \pm 2.19
Condroitin- SO ₄ A	1000 μ g	35.66 \pm 1.52	33.93 \pm 3.43	34.66 \pm 1.14
	100 μ g	48.66 \pm 0.57	47.66 \pm 1.52	48.66 \pm 1.14
	10 μ g	21.66 \pm 4.94	23.96 \pm 4.13	23.66 \pm 1.52
Condroitin- SO ₄ C	1000 μ g	55.33 \pm 2.63	56.33 \pm 0.57	55.66 \pm 2.19
	100 μ g	61.66 \pm 1.15	62.33 \pm 1.52	61.79 \pm 2.19
	10 μ g	59.33 \pm 0.57	58.73 \pm 1.52	59.33 \pm 1.52
Heparán- SO ₄	1000 μ g	40.33 \pm 0.57	41.33 \pm 1.52	40.66 \pm 2.19
	100 μ g	37.33 \pm 0.57	35.66 \pm 1.56	36.83 \pm 2.17
	10 μ g	53.66 \pm 1.15	55.33 \pm 1.52	53.66 \pm 1.52

La adherencia de levaduras se llevó a cabo a temperatura ambiente. Los datos con cada carbohidrato probado corresponden al promedio (\bar{X}) del porcentaje de inhibición de la adherencia, considerando las lecturas de cuatro diferentes campos ópticos corregidas con las de levaduras no tratadas \pm desviación estándar (DE). Cada ensayo se realizó por triplicado. Ver detalles de procedimiento en materiales y métodos. NR- No realizado.