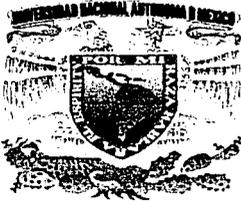


207



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Interacción de levaduras de *Histoplasma capsulatum* con diferentes células fagocíticas de murciélago, a través de ensayos de adherencia in situ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ROBERTO OSVALDO SUÁREZ ALVAREZ

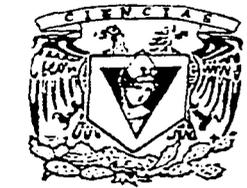
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Director de tesis :
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



Lucile Taylor da Cunha e Mello

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



FACULTAD DE CIENCIAS

México, D.F. 2002



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Roberto Osvaldo
Suárez Álvarez
FECHA: 4 - Nov - 2002
FIRMA: R. Suárez

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

RECIBO
LIBRERIA DE LA UNAM



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Interacción de levaduras de *Histoplasma capsulatum* con diferentes células fagocíticas de murciélago, a través de ensayos de adherencia *in situ*"

realizado por *Pas. Biol. Roberto Osvaldo Suárez Alvarez*

con número de cuenta *9223838-3* , quién cubrió los créditos de la carrera de: *Biología*

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello

Propietario

Dr. Armando Pérez Torres

Propietario

Dra. Patricia Rivas Manzano

Suplente

Dr. Guillermo Laguna Hernández

Suplente

M. en C. José Luis Villarruel Ojeda

Consejo Departamental de *Biología*

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

Asesor de Tesis

DR. ARMANDO PÉREZ TORRES

Asesoría en el procesamiento e interpretación
de la metodología histoquímica

Tesis realizada en:

El Laboratorio de Inmunología de Hongos del
Departamento de Microbiología y Parasitología; y Laboratorio de
Inmunohistoquímica del Departamento de Biología Celular y Tisular;
Facultad de Medicina, UNAM

FINANCIAMIENTO

**Este trabajo fue en su totalidad apoyado por la Dirección General de Asuntos
del Personal Académico (DGAPA), UNAM**

Proyecto clave: IN207801

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Lucía Taylor da Cunha e Mello

Por la confianza, la paciencia, el coraje y el amor compartidos en cada momento de la realización de este trabajo, por demostrarme que sólo con entrega se puede alcanzar cualquier meta

Al Dr. Armando Pérez Torres

Por la amistad incondicional desde el primer momento, la confianza y tantos conocimientos enseñados con el único interés de mi formación profesional

A la M. en C. Esperanza Duarte Escalante

La primera persona que me recibió en este laboratorio ofreciéndome su amistad, su confianza y sus innumerables conocimientos sobre el tema de la presente tesis

A todo el equipo del Laboratorio de Inmunología de Hongos:

Dra. Rocío R M, Gaby R A, Rafael, Aurora, Maribel, Araceli, Don Aniceto y Chalfa,
por su amistad y su apoyo profesional y personal

A las histotecnólogas Verónica Rodríguez Mata y María Isabel Vega

Por toda la disponibilidad y el esfuerzo dedicados al apoyo técnico de la parte experimental de este trabajo

A la Dra. Catalina Beatriz Chávez Tapia

Por todo el apoyo y la experiencia compartida en la obtención de los murciélagos
utilizados

Al Dr. Guillermo Laguna Hernández

Por su amistad y sus sinceras palabras de confianza, por la minuciosa revisión de
mi tesis y sus acertadas observaciones para mejorarla

A la Dra. Patricia Rivas Manzano

Por su amable aceptación para revisar este trabajo y por sus enriquecedoras
aportaciones al mismo

Al M. en C. José Luis Villarruel Ordaz

Por dedicar parte de su valioso tiempo a la revisión de esta tesis y por sus
importantes aportaciones a ella

DEDICATORIAS

A mi hermano Mario

Por compartir nuestra infancia, haciéndola la mejor de mis experiencias de vida

A mis padres

Cuyos principios inculcados con el ejemplo y con amor, han marcado mi vida y han hecho de mi un ser libre, pensante y agradecido con Dios

A mis hermanos

Fernando, Ana y Monserrat, inspiración constante para tratar de ser mejor cada día, espero no haberlos decepcionado

A mi extensísima familia

Abuelos, tíos, primos, sobrinos, por su constante e incondicional apoyo siempre firme y con correspondido cariño

A Edith, Braulio y Bryan

Quienes ahora forman parte de mi querida familia

A Cristina Canteros y a Jorge Sahaza

Por hacer de mi vida un torbellino, por compartir juntos el extenso concepto de amistad y tantas cosas más...

A mi amigo P. Rubén Sandoval Meneses

Por todo el cariño, el ejemplo y el constante apoyo desde que nos conocimos

A mi amigo Gerardo García, a Toñita, Daniel, Eli y al gordito

Por la cariñosa amistad de tantos años, todos los consejos y el apoyo incondicional de todo momento

A Carmen

Por la increíble calidad del tiempo compartido, por los fuegos artificiales, el confeti
y las serpentinas

A mis amigos de la carrera, gracias por su increíble amistad

Pedro, Sara, David Ortíz, Mónica Padilla, Javier, Raquel, Adolfo, Mónica Salas,
Héctor, Nayeli, Alari, Elena, David, Paty y todos los que ahora se me olvidan

A Sandra y Luz

Mis mejores amigas y compañeras de muchas aventuras, gracias por la confianza
y el amor compartidos

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. OBJETIVO GENERAL	12
5. OBJETIVOS PARTICULARES	12
6. HIPÓTESIS	13
7. MATERIALES Y MÉTODOS	14
7.1 Cepas	14
7.2 Animales	15
7.3 Captura de murciélagos	15
7.4 Extracción de órganos y obtención de criosecciones	16
7.5 Obtención de inóculos de las cepas fúngicas	16
7.6 Ensayos de adherencia <i>in situ</i>	17
7.6.1 Tinción de cristal violeta (CV) para levaduras	18
7.6.2 Método de Inmunoperoxidasa	19
7.6.3 Observación y cuantificación del ensayo <i>in situ</i>	20
7.7 Análisis estadístico	21
8. RESULTADOS	22
8.1 Pulmón	27
8.2 Bazo	27

8.3 Hígado	28
8.4 Intestino	28
8.5 Tráquea	29
8.6 Testigos	29
9. DISCUSIÓN	30
10. CONCLUSIONES	37
11. BIBLIOGRAFÍA	39

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1. Diagrama de flujo de los procedimientos realizados	50
Fig. 2. Interacción entre la adherencia de levaduras de las cepas fúngicas, los órganos animales y los métodos de procesamiento, utilizados en murciélagos <i>A. hirsutus</i>	51
Fig. 3. Interacción entre la adherencia de levaduras de las cepas fúngicas, los órganos animales y los métodos de procesamiento, utilizados en ratones BALB/c	52
Fig. 4. Capacidad de adherencia de levaduras de las cepas fúngicas a los órganos de murciélagos <i>A. hirsutus</i>	53
Fig. 5. Capacidad de adherencia de levaduras de las cepas fúngicas a los órganos de ratones BALB/c	54
Fig. 6. Capacidad de adherencia de levaduras de las cepas fúngicas a todos los órganos de los animales estudiados	55
Fig. 7 (a, b). Adherencia de levaduras a pulmón de murciélagos <i>A. hirsutus</i>	56
Fig. 8 (a-c). Adherencia de levaduras a bazo de murciélagos <i>A. hirsutus</i>	57

Fig. 9 (a, b). Adherencia de levaduras a bazo de murciélago y de ratón	58
Fig. 10 (a, b). Adherencia de levaduras a hígado de murciélago y de ratón	59
Fig. 11 (a-c). Adherencia de levaduras a intestino de murciélagos <i>A. hirsutus</i>	60
Fig. 12 (a-c). Adherencia de levaduras a intestino de ratones BALB/c	61
Fig. 13 (a-d). Adherencia de levaduras a tráquea de murciélagos <i>A. hirsutus</i>	62
Fig. 14 (a-e). Testigos de no adherencia a órganos de murciélagos <i>A. hirsutus</i>	63
Tabla 1. Promedios de levaduras adheridas a cortes de órganos	64

RESUMEN

La interacción entre la célula parásito- levaduras de *Histoplasma capsulatum* (*Hc*) y células hospederas de murciélago, fue estudiada en ensayos de adherencia *in situ*, donde se incubaron levaduras de *Hc* de las cepas EH-53 o EH-375 (3×10^7 levaduras/ml) con criosecciones de órganos de murciélagos machos adultos de la especie *Artibeus hirsutus*. La adherencia de las levaduras se realizó en tejidos que constitutivamente tienen una alta densidad de células fagocíticas profesionales (pulmón, bazo e hígado) y de no profesionales (intestino y tráquea), teniendo como referencia la adherencia de *Candida albicans* (*Ca*) en ensayos comparativos en murino (BALB/c, machos adultos) y como testigos negativos ensayos sin partículas o con látex ($0.45 \mu\text{m}$). En los ensayos de adherencia, las levaduras fueron identificadas por tinción con cristal violeta (CV) o por el método de inmunoperoxidasa (IP), utilizando anticuerpos específicos. Los resultados demostraron levaduras de *Hc* sobre todos los tejidos de los animales estudiados, aunque de manera preferencial para el pulmón. En los cortes de bazo de ambas especies animales, las levaduras de *Hc* se adherieron, en particular, a la pulpa blanca y roja; mientras que con las levaduras de *Ca* se observó una distribución más uniforme, incluyendo la cápsula. Asimismo, las levaduras de *Hc* adheridas a los cortes de hígado mostraron una preferencia por la cara sinusoidal de los hepatocitos. De los tejidos con fagocitos no profesionales, el intestino mostró un mayor número de levaduras adheridas que la tráquea. En murciélagos y en ratones, se observó mayor selectividad en la adherencia de levaduras, tanto de *Hc* como de *Ca*, a la lámina propia de las vellosidades intestinales. En los cortes de tráquea, de murciélagos y ratones, se observaron levaduras adheridas, tanto de *Hc* como de *Ca*, principalmente sobre la lámina propia, así como en la túnica adventicia. La cepa EH-53 (humano infectado) mostró mayor capacidad de adherencia a tejidos de murciélagos y de ratones que la cepa EH-375 (murciélago naturalmente infectado); mientras que el número de levaduras adheridas de *Ca* fue siempre menor que el de *Hc*. No se observó en ninguna circunstancia la adherencia de partículas de látex y los testigos sin incubación con levaduras, en los dos métodos empleados, fueron siempre negativos. Al comparar los métodos utilizados (CV e IP) para identificar las levaduras adheridas a los tejidos, no se encontraron diferencias significativas entre ambos. Los datos encontrados en el presente estudio son de gran relevancia ya que constituyen los primeros hallazgos en la interacción célula:célula representada en el binomio *Histoplasma*:Murciélago.

INTRODUCCIÓN

El hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* - Darling 1906, es el agente etiológico de la micosis sistémica histoplasmosis. El hongo se favorece de condiciones apropiadas de los nichos ecológicos especiales que le proporcionan nutrientes y factores ambientales que optimizan el crecimiento y esporulación del hongo en ambientes naturales. Estos nichos son más comunes en zonas de climas templados y tropicales. La mayoría de los casos de infección por *H. capsulatum* han sido registrados dentro de un área geográfica ubicada a una latitud entre los 45° Norte y los 30° Sur del ecuador (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

El hábitat natural del hongo lo constituye de preferencia los lugares cerrados, húmedos y oscuros, tales como cuevas, grutas, minas, túneles, puentes, alcantarillas, torres de iglesias así como construcciones viejas y deshabitadas. Sin embargo, el hongo también ha sido aislado de lugares abiertos como parques, patios y plazas, donde se encuentran zanates, golondrinas, palomas y aves de corral como gallinas y pavos. La presencia de altas concentraciones de nitrógeno y fósforo, además de oligoelementos, permite que *H. capsulatum* crezca favorablemente en guano de murciélagos y aves, así como en el complemento alimenticio denominado gallinaza o pollinaza, utilizado para ganado. Las condiciones físicas como, poca luz (que favorece la esporulación), temperaturas óptimas tanto de suelo como del ambiente que fluctúan en un rango de 25-30 °C y

una humedad relativa >60 %, son factores abióticos que junto con los bióticos, representados principalmente por la microbiota asociada e insectos y ácaros micófagos (Hoffmann, 1998), conforman el nicho ecológico ideal para este patógeno fúngico. En estos ambientes, *H. capsulatum* desarrolla su fase infectiva produciendo microconidios y pequeños fragmentos de hifas, los cuales pueden causar la enfermedad histoplasmosis con curso clínico de moderado a grave, si son inhalados particularmente por hospederos susceptibles -inmunodeprimidos-.

En la morfología microscópica de la fase micelial del hongo, se observan hifas que miden de 1.2 a 1.5 μm de diámetro, con dos tipos de conidios solitarios (aleuroconidios): microconidios o microaleuroconidios redondos, piriformes o en forma de clavos de 1.4 x 2.6 μm , los cuáles pueden estar fijos a la hifa o unidos a ellas por pequeños conidióforos; y macroconidios o macroaleuroconidios de paredes gruesas, por lo general, redondos de 8-14 μm de diámetro, los cuales tienen proyecciones digitiformes de diferentes tamaños, típicas de la especie. Los macroconidios están adheridos a las hifas por conidióforos cortos, que con frecuencia, forman un ángulo aproximado de 90° con las mismas. El hongo crece en su fase levaduriforme y virulenta, tanto como parásito intracelular de fagocitos profesionales (macrófagos y polimorfonucleares) y no profesionales (células epiteliales) de hospederos susceptibles, dependiendo del microambiente intracelular de la célula parasitada; así como en medios de cultivo sintéticos a 37 °C, adicionados con glucosa y cisteína.

La micromorfología de las levaduras está representada por células

individuales uninucleadas de 2-6 μm de diámetro, unigemantes con brotamiento de base estrecha (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Taylor *et al.*, 2000c; Tewari *et al.*, 1998).

Se ha propuesto que los aislados de *H. capsulatum*, representando las variedades *capsulatum*, *duboisii* y *farciminosum*, comprenden ocho especies filogenéticas en lugar de tres variedades. *Histoplasma capsulatum* puede considerarse una especie críptica, ya que representa un complejo de especies, siendo cada especie un clado, que puede agrupar cepas con diferencias biológicas en serotipos, quimiotipos, virulencias y en aspectos morfo y fisiológicos (Kasuga *et al.* 1999; Kasuga *et al.* 2002). Las ocho especies filogenéticas identificadas a la fecha, son las siguientes: 1) Población clase 1 de Norteamérica; 2) Población clase 2 de Norteamérica; 3) Población grupo A de Sudamérica; 4) Población grupo B de Sudamérica; 5) Población Australiana, 6) Población de una colonia holandesa; 7) Población Euroasiática; y 8) Población Africana. La población Africana incluye aislados de las tres variedades. La var. *farciminosum* fue colocada en tres especies filogenéticas, la clase 2 de Norteamérica, la Africana y la Euroasiática.

Las variedades *capsulatum* y *duboisii*, son indistinguibles en su forma saprobia (micelial) pero difieren en su forma parasitaria, las levaduras de *H. c.* var. *duboisii* en tejidos animales y humanos son ovoides y tienen una pared celular más delgada que las de *H. c.* var. *capsulatum*. Ambas variedades han sido referidas como productoras de infecciones de humanos (en particular), de

murciélagos y de otros mamíferos (Tewari *et al.*, 1998). Sin embargo, es oportuno mencionar que *H. c. var. duboisii* nunca ha sido aislado en América.

Los casos de histoplasmosis debido a *H. c. var. capsulatum* han sido diagnosticados en 60 países de todo el mundo, donde se han encontrado distintos grados de prevalencia. Las áreas endémicas del mundo con la mayor cantidad de casos clínicos conocidos se localizan en los valles de los ríos Mississippi y Ohio en los Estados Unidos de América y en varias regiones de Latinoamérica. En Asia, para 1970, habían sido diagnosticados 13 casos, exceptuando uno de Japón, todos fueron del sureste de Asia: Malasia, Indonesia, Tailandia, India, Singapur y Vietnam. En Europa, fueron confirmados casi 30 casos autóctonos en 12 países en 1980 (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

La histoplasmosis producida por *H. c. var. capsulatum* (histoplasmosis capsulatii) (Tewari *et al.*, 1998) presenta formas clínicas diversas, que varían de benignas a severas. La forma más frecuente en México, generalmente asociada a epidemias, es la Histoplasmosis Pulmonar Primaria (HPP), que afecta principalmente adultos y tiene la más alta tasa de letalidad en el mundo. El mayor riesgo en la adquisición de esta enfermedad está relacionado con la incursión en espacios cerrados, donde los aerosoles con propágulos del hongo están presentes en altas concentraciones. Estos lugares son generalmente usados por murciélagos como refugios permanentes y/o temporales, y representan un riesgo para la salud de todos aquellos individuos que entran o trabajan en ellos. En este sentido, espeleólogos, biólogos, geólogos, arqueólogos, antropólogos, y

particularmente trabajadores rurales, como mineros, limpiadores de minas, colectores de guano, están expuestos a altas concentraciones de esporas fúngicas y representan la población profesional de alto riesgo, susceptible a infectarse con *H. capsulatum* (Taylor *et al.*, 2000b).

Por otro lado, desde hace varios años se conoce que los murciélagos pueden infectarse con *H. capsulatum* (Kunz, 1988; Taylor *et al.*, 1994; 1999a).

En México, se han reportado cerca de 140 especies de murciélagos (Medellín *et al.*, 1997), de las cuales 27 utilizan ambientes cavernícolas como refugio permanente; 33 como refugio alternativo y 18 como refugio ocasional (Arita, 1993), lo que representa más del 50 % de la quiropterofauna del país asociada a estos ecosistemas. Estos ambientes conforman el nicho ecológico ideal para este patógeno fúngico. La íntima asociación de *H. capsulatum* con quirópteros en relación con el mecanismo de dispersión del hongo en la naturaleza (Hoff & Bigler, 1981; Taylor *et al.*, 2000a) ha causado gran interés tanto entre los microbiólogos como en los mastozoólogos, ya que se podría utilizar ciertas características de la interacción entre el binomio hongo-murciélago para estudios puntuales de estos mamíferos como, la de emplear el patrón polimórfico del DNA del hongo como un marcador de los sitios de infección para histoplasmosis (marcador geográfico), y poder rastrear la distribución de este biomarcador en murciélagos capturados en otros sitios (Chávez-Tapia *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2000a).

Se han reportado porcentajes de infección en murciélagos dentro de sus mismos refugios que van de 1 a 66 %. En México, Taylor *et al.* (1994;1999a) y Peña-Sandoval *et al.* (2002) han logrado aislamientos a partir de diferentes especies infectadas: *Mormoops megalophylla*, *Myotis californicus*, *Pteronotus davyi* y *Leptonycteris curasoae* (primer registro para el mundo), *P. pamellii*, *Natalus stramineus*, *Artibeus hirsutus*, *L. nivalis*, *Desmodus rotundus* y *Tadarida brasiliensis* (primer registro para México).

La fase morfológica levaduriforme de *H. capsulatum* tiene afinidad por el sistema fagocítico mononuclear del hospedero. Los macrófagos en armonía con el mecanismo inmune celular son los efectores más importantes para la eliminación de parásitos intracelulares en el hospedero infectado. Las interacciones parásito-macrófago implican un reconocimiento íntimo, y cómo estas interacciones participan en la ruta de entrada y en el destino del parásito en la célula del hospedero, ya sea en su muerte o en su capacidad para sobrevivir en las condiciones adversas intracelulares, constituyen aspectos claves para entender el desarrollo de algunos procesos infecciosos. De ahí que las características de algunas moléculas de superficie de los parásitos sean importantes en la selección de la vía de entrada a las células del hospedero, sean estas fagocitos profesionales o no profesionales (entendiéndose por "profesionales" a las células capaces de ingerir y procesar al parásito o la partícula fagocitada; y "no profesionales" a ciertas células, como las epiteliales por

ejemplo, que ejercen la función fagocítica asociada eventualmente a tránsito y comunicación intra e intercelular) (Rabinovtch, 1995).

Se conoce muchos de los eventos que median la interacción de *H. capsulatum* con la célula hospedera parasitada, los cuales han sido estudiados de modo preferencial tanto en células cultivadas de humano como en modelo murino (Bullock, 1993; Bullock & Wright, 1987; Dumond & Robert, 1970; Eissenberg *et al.*, 1988; 1991; 1993; Eissenberg & Goldman, 1991; Howard, 1964; 1965; 1973; Jeréz & Taylor, 1989; Lane *et al.*, 1994; León *et al.*, 1989; Newman *et al.*, 1990; 1992; 1993; 1994; Randall & Hackney, 1953; Randall & McVickar, 1951; Randall & Turner, 1953; Retallack & Woods, 1999; Schaffner *et al.*, 1986; Schunur & Newman, 1990; Taylor *et al.*, 1989; 1995; 1998; Taylor & Duarte-Escalante, 1995; Wolf *et al.*, 1989; 1992). Sin embargo, en el ambiente donde prevalecen las condiciones óptimas para el crecimiento y reproducción del hongo cohabitan diferentes animales, de los cuales, algunos son susceptibles de desarrollar e incluso resolver la infección por *H. capsulatum*. Entre estos animales, se destacan los murciélagos. Aunque estos mamíferos voladores pueden cursar la infección en forma diseminada no se conocen las características de la interacción célula fúngica/fagocitos de murciélago. Observaciones histopatológicas en varios tejidos de diferentes murciélagos infectados, mostraron la presencia de levaduras intracelulares compatibles con la fase parasitaria de *H. capsulatum*, especialmente en macrófagos pulmonares intra-alveolares. A la fecha, observaciones en estudios histopatológicos de murciélagos natural y

experimentalmente infectados con *H. capsulatum* evidencian una escasa reacción inflamatoria en los órganos infectados, particularmente en pulmón, hígado y bazo, lo que sugiere que el murciélago resuelve la infección por el hongo de un modo más eficiente y rápido que el ratón y el humano, sin dejar huellas consistentes de una reacción inflamatoria localizada importante, a pesar de la presencia del parásito en el tejido infectado, por lo que estos mamíferos constituyen un modelo interesante para el estudio hospedero-parásito en la infección por *H.capsulatum*.

JUSTIFICACIÓN

En México, *H. capsulatum* se encuentra en ambientes catalogados como sitios de alto riesgo de infección generalmente asociados a la forma epidémica de la enfermedad. Las actividades relacionadas con la exposición a excretas de aves y murciélagos son uno de los principales factores de riesgo para adquirir histoplasmosis, particularmente en las personas que habitan zonas rurales y/o suburbanas. La interacción de *H. capsulatum*-célula hospedera, ha sido estudiada de modo preferencial tanto en el humano como en el modelo murino, sin embargo, en el ambiente donde prevalecen las fuentes de infección con el hongo, algunos animales desarrollan también en forma natural histoplasmosis (los más comunes han sido pequeños mamíferos), entre ellos se destacan los murciélagos, que producen grandes cantidades de guano con las condiciones propicias para el desarrollo del hongo. Por lo referido anteriormente, se sabe que *H. capsulatum* posee la potencialidad de infectar a estos animales, sin embargo, se desconoce el curso clínico de la enfermedad y la prognosis de la misma en los murciélagos, por lo que es de gran interés conocer la interacción inicial que facilita la infección, representada por el primer paso de reconocimiento entre el hongo y la célula del hospedero a ser parasitada.

Con base en los antecedentes, nuestra atención en el presente estudio estuvo dirigida a los mecanismos de reconocimiento operantes en la relación levaduras de *H. capsulatum* y fagocitos (profesionales y no profesionales) de

distintos órganos blanco de murciélagos. La presente tesis contribuye a entender aspectos críticos de la dinámica de infección en el murciélago y obtener datos que apoyen su probable papel como reservorio natural del hongo.

OBJETIVO GENERAL

⇒ Comprobar la capacidad de adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a tejidos de diferentes órganos blanco de murciélagos.

OBJETIVOS PARTICULARES

⇒ Determinar el patrón de la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* en órganos como pulmón, bazo e hígado de murciélagos, que contienen células fagocíticas profesionales.

⇒ Determinar el patrón de la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* en órganos como intestino y tráquea de murciélagos, que contienen células fagocíticas no profesionales.

HIPÓTESIS

Histoplasma capsulatum en su fase levaduriforme es capaz de adherirse a órganos que constitutivamente tienen células fagocíticas profesionales y no profesionales de distintos órganos blanco de murciélago.

MATERIALES Y MÉTODOS

Una integración de la secuencia de procedimientos realizados en este estudio se ilustra en un diagrama de flujo (Fig. 1).

Cepas

Se emplearon dos cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, la EH-53 aislada de un paciente infectado en una cueva de Hidalgo-México y la EH-375 aislada de un murciélago infectado en la naturaleza, capturado al azar en una cueva de Morelos-México. Estas cepas se encuentran actualmente depositadas en la Colección de Cepas de *H. capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de Hongos de la Facultad de Medicina, UNAM (Taylor *et al.*, 1999b). Asimismo se utilizó, como testigo en los ensayos de adherencia, una cepa de *Candida albicans* (cepa 15) donada gentilmente por el Dr. Rubén López Martínez del Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina, UNAM. La fase levaduriforme de cada cepa fue mantenida a 37 °C en medio de infusión-cerebro-corazón (BHI-líquido) (Bioxón, México, D.F.) suplementado con 0.1 % de L-cisteína y 1 % de glucosa.

Animales

Se emplearon murciélagos machos adultos, de la especie *Artibeus hirsutus* los cuales pertenecen a una colonia gregaria con más de 3500 ejemplares que ha sido monitoreada desde hace seis años en la misma cueva llamada "El Salitre", localizada en el ejido de Santa Rosa Treinta, municipio de Tlaltizapán, en el estado de Morelos. Como modelo de comparación se utilizaron ratones machos, de ocho semanas de edad de la cepa singénica BALB/c, mantenidos con purina (Purina de México, D.F.) y agua destilada acidificada *ad libitum* en el bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

Captura de murciélagos

La captura de los especímenes de *A. hirsutus* se realizó con redes de niebla colocadas estratégicamente a la entrada de la cueva al atardecer, ya que los hábitos alimenticios de estos mamíferos son preferentemente vespertino-nocturnos. Se seleccionaron sólo los murciélagos machos, las hembras y aquellos de otras especies fueron liberados en el mismo lugar. Se transportaron al laboratorio en sacos de manta para su inmediato procesamiento.

Extracción de órganos y obtención de criosecciones

Se sacrificaron por dislocación cervical los murciélagos y se realizaron disecciones para obtener muestras de los siguientes órganos: pulmón, bazo, hígado, intestino y tráquea. Se lavó por separado cada órgano en solución salina estéril para posteriormente incluirlos en resina O.C.T. (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) y congelar los bloques de órganos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes de proceder al corte en congelación, cada bloque fue transferido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un corto periodo, para permitir la eliminación manual del exceso de resina. Se trabajó con el criostato dentro de un rango de -16 a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se obtuvieron criosecciones de los tejidos incluidos de cada órgano de $10\text{ }\mu\text{m}$ de grosor. Se seleccionaron las mejores secciones de cada tejido (tres cortes) y se colocaron en portaobjetos especiales Superfrost Plus (Shandon Inc. Pittsburgh, PA), cargados positivamente. Los cortes, para los experimentos de adherencia *in situ*, se utilizaron dentro de la siguiente hora de su obtención.

Obtención de inóculos de las cepas fúngicas

A partir de levaduras, de cada cepa, criopreservadas (EH-53, EH-375 y cepa 15), se realizaron precultivos en BHI líquido y se transfirieron 2-3 ml a 10 ml del medio fresco en tubos cónicos de 15 ml. Se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h para obtener el inóculo adecuado de cada cepa. Después de la incubación, se centrifugaron los

tubos a 800 x g por 15 min, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron los botones de levaduras en 10 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY). Se repitió el procedimiento una vez más y de los botones finales de levaduras se prepararon suspensiones en DMEM. Se hicieron las diluciones necesarias para ajustar la concentración de trabajo de 3×10^7 levaduras/ml. Cada suspensión final de levaduras se guardó en refrigeración hasta su uso, lo que ocurrió dentro de las siguientes seis horas.

Ensayos de adherencia *in situ*

La preparación de los reactivos y de las levaduras así como el ensayo *in situ*, fueron hechos en condiciones de baja temperatura, en un cuarto frío. Se adicionaron 100 μ l de una suspensión de levaduras (para cada cepa), ajustada a 3×10^7 levaduras/ml en DMEM, a cada corte de tejido colocado sobre el portaobjeto. Se incubaron los tejidos con las levaduras por 15 min, se decantaron los fluidos de los portaobjetos, se lavaron con PBS 0.1 M pH 7.2 y se secaron los bordes de las preparaciones. Se adicionó a cada uno de los portaobjetos la cantidad suficiente de glutaraldehído al 1.5 % en PBS por 2 h, para la fijación de las muestras. Se enjuagaron éstas, cinco veces en agua fría, cambiando el agua cada vez. Se colocaron todas las muestras en agua fría durante toda la noche (para eliminar las levaduras que no se adhirieron). Se sacaron los portaobjetos del

agua y se dejaron escurrir y secar a temperatura ambiente para su tinción con cristal violeta o para inmunohistoquímica enzimática (inmunoperoxidasa).

En los ensayos realizados se obtuvieron 20 preparaciones por órgano programado, tanto de ratón como murciélago, las cuales se dividieron en cinco grupos, según el procedimiento al que se destinó cada uno: 1 y 2) adherencia de las levaduras de la cepa EH-53 o EH-375 de *H. capsulatum* (Hc); 3) adherencia de la cepa 15 de *C. albicans* (Ca); 4) testigo de no adherencia con partículas de látex (Sigma) de 0.45 μm de diámetro; y 5) testigo de no adherencia sin ninguna partícula adicional. Se formaron grupos de 10 preparaciones por cada método de procesamiento, cristal violeta o inmunoperoxidasa.

Tinción de cristal violeta (CV) para levaduras.- Las preparaciones seleccionadas para esta tinción fueron sumergidas durante 1 min en solución de CV (preparada disolviendo por separado 20 g de CV en 200 ml de etanol al 95 % y 8 g de ácido oxálico en 800 ml de agua destilada, dejando reposar la mezcla de ambas soluciones toda la noche a temperatura ambiente, y filtrándola hasta su uso para eliminar cristales suspendidos). Se sacaron las preparaciones del colorante, se escurrieron y después de varios lavados con agua corriente, se sumergieron durante 1 min en una solución mordente de lugol (preparada disolviendo 6.7 g de yoduro de potasio en 800 ml de agua destilada, adicionando de 3.3 g de yodo, aforando la mezcla a 1 L de agua destilada, y filtrando y almacenando la solución de lugol hasta su uso). Después del lugol, se lavaron con dos o tres cambios de agua corriente y se destiñeron las preparaciones en

mezcla acetona-etanol con dos cambios de 5 min cada uno. Posteriormente, se dejaron secar al aire y se contratiñeron con verde brillante al 1 % en agua, durante 1 min. Finalmente, las preparaciones fueron sometidas a la deshidratación rutinaria empleada para técnica histológica, de 10 a 20 s en cada paso de alcohol de gradación creciente hasta xilol. Por último, se montaron las preparaciones colocando en cada sección de tejido una gota de Permount (Fisher SP15-500) mezclado en una proporción de 2:1 con xilol y se dejaron secar al aire por 12 h, aproximadamente.

Método de inmunoperoxidasa.- Los tejidos cortados por congelación, fueron adheridos a los portaobjetos Superfrost Plus y se dejaron secar al aire por 20 min para estabilizarlos, seguido de fijación en acetona total por 20 min y nuevo secado al aire. Se bloqueó la peroxidasa endógena en cada preparación adicionando peróxido de hidrógeno 1 % en metanol (vol/vol), durante 30 min a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Se lavaron las preparaciones tres veces por 5 min con PBS 0.1 M pH 7.2. Se bloquearon los sitios no reactivos con PBS 0.1 M/Triton X 100 al 0.1 %/ASB 1 %, 1 h a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Se lavaron ligeramente las preparaciones y se incubaron durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda con dos diferentes diluciones (1:50 y 1:100) de suero hiperinmune de conejo anti-*H. capsulatum* o anti-*C. albicans* obtenidos en el laboratorio y probados previamente en inmunoensayo enzimático (ELISA) (Voller *et al.*, 1979) con títulos >1:640. Como testigo negativo se utilizó suero normal de conejo. Al día siguiente, se lavaron las preparaciones

tres veces por 5 min con PBS 0.1 M pH 7.2, se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de conejo obtenido en cabra (Gibco) diluido 1:100 en PBS, durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavaron las preparaciones tres veces por 5 min con PBS 0.1 M pH 7.2 y se incubaron con el complejo avidina-peroxidasa diluido 1:100 en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron las preparaciones tres veces por 5 min con PBS 0.1 M pH 7.2 y se incubaron con solución de diaminobenzidina (DAB)-peróxido, para el cual se mezclaron 5 mg de DAB con 10 ml de PBS 0.1 M pH 7.2 y se adicionaron 300 μ l de H_2O_2 al 3 %. Se incubaron las preparaciones en esta solución 10 min hasta que se produjo coloración. Posteriormente, se lavaron las preparaciones en agua corriente y se deshidrataron en etanol 95 % con tres cambios de 5 min c/u. Se contratiñeron con hematoxilina de Harris y se montaron con resina Permout.

Observación y cuantificación del ensayo *in situ*.- Para la cuantificación de las levaduras adheridas a los tejidos se utilizaron los microscopios Olympus (Olympus Optical, Japan) BX 40 e IX 70 (invertido). La observación de los ensayos fue realizada por microscopia de luz empleando las técnicas de Nomarski y de campo claro. Los resultados fueron expresados por el promedio de levaduras adheridas por zona determinada de cada corte, considerando cuatro campos ópticos por cada tejido de cada preparación (cada campo óptico con objetivo de 40x y ocular de 10x = 96211.5 μm^2). Los resultados del conteo con la tinción de CV fueron comparados con los valores obtenidos de los ensayos realizados con los sueros anti-*Histoplasma* y anti-*Candida* en el método de

inmunoperoxidasa, así como con los testigos negativos de adherencia (látex), y los testigos no incubados con partículas. Se obtuvieron 720 promedios que correspondieron a los datos arrojados por los conteos de los tejidos, de cada especie animal, incubados con las dos cepas de *H. capsulatum* y la cepa de *C. albicans*. Las preparaciones incubadas con látex y las no incubadas con partículas no mostraron adherencia de ningún tipo sobre los tejidos, por lo que su valor fue siempre cero.

Las imágenes microscópicas de los ensayos fueron fotografiadas con una cámara Olympus SC 35 automática, acoplada a los microscopios BX 40 o IX 70, empleando para ésto una película Kodak Pro-Image 100 de 35 mm.

Análisis estadístico

Los ensayos fueron evaluados por análisis de varianza simple y multifactorial (ANOVA-MANOVA) (Statsoft, Inc. 1998; STATISTICA for Windows). Las diferencias en promedios entre dos variables fueron analizadas por la prueba t de Student.

RESULTADOS

De la cuantificación de las levaduras adheridas a las criosecciones de órganos, de cada especie animal, se obtuvieron en total 720 lecturas expresadas en 30 promedios, 360 lecturas y 15 promedios por cada método de procesamiento, los cuales fueron sometidos a análisis estadístico (Tabla 1).

Al evaluar, la interacción entre las cepas fúngicas con cada órgano de los murciélagos estudiados y los métodos de procesamiento empleados (Fig. 2), se encontró que:

- a) Para la cepa EH-53, en las muestras de órganos con predominio de fagocitos profesionales, el pulmón presentó el mayor número de levaduras adheridas ($X = 2661.63 \pm 596.17$ con CV; $X = 2806.83 \pm 514.83$ con IP), en menor escala el bazo ($X = 1236.88 \pm 292.59$ con CV; $X = 1476.25 \pm 237.07$ con IP) y el hígado ($X = 971.92 \pm 287.58$ con CV; $X = 1090.79 \pm 379.17$ con IP). En los órganos con fagocitos no profesionales, el intestino mostró un mayor número de levaduras adheridas ($X = 1525.92 \pm 544.96$ con CV; $X = 1474.29 \pm 445.88$ con IP) que la tráquea ($X = 1027.42 \pm 190.16$ con CV; $X = 1114.25 \pm 306.59$ con IP).
- b) Para la cepa EH-375, tanto el pulmón como el bazo fueron los órganos con mayor número de levaduras adheridas mostrando una pequeña diferencia numérica entre ambos, el bazo en primer lugar ($X = 1286.04 \pm 263.99$ con CV; $X = 1496.25 \pm 262.13$ con IP), seguido de muy cerca por el pulmón ($X = 1245.96 \pm$

460.17 con CV; $X = 1460.96 \pm 396.01$ con IP) y por último el hígado ($X = 884.13 \pm 240.26$ con CV; $X = 1029.42 \pm 379.79$ con IP). El intestino mostró mayor número de levaduras adheridas ($X = 1346.88 \pm 536.75$ con CV; $X = 1397.75 \pm 474.56$ con IP) que la tráquea ($X = 855.58 \pm 180.72$ con CV; $X = 1275.21 \pm 270.50$ con IP).

c) Para el caso de la cepa de *Ca* (cepa 15) los promedios de adherencia de levaduras fueron mucho más bajos. Tanto en pulmón ($X = 105.79 \pm 68.60$ con CV; $X = 142.96 \pm 54.54$ con IP), en bazo ($X = 110.04 \pm 29.62$ con CV; $X = 138.04 \pm 46.87$ con IP) y en hígado ($X = 33.17 \pm 14.51$ con CV; $X = 41.21 \pm 13.59$ con IP) como en el intestino ($X = 142.54 \pm 35.07$ con CV; $X = 136.29 \pm 49.25$ con IP) y la tráquea ($X = 88.21 \pm 21.51$ con CV; $X = 124.33 \pm 42.48$ con IP). En general los valores de adherencia fueron muy similares.

En el procedimiento con el modelo murino, la interacción entre las cepas fúngicas con cada órgano de los ratones estudiados y los métodos de procesamiento empleados (Fig. 3), se destacó que:

a) Para la cepa EH-53, el órgano con fagocitos profesionales que presentó mayor número de levaduras adheridas fue el pulmón ($X = 1823.25 \pm 225.21$ con CV; $X = 1785.21 \pm 211.08$ con IP), seguido del hígado ($X = 1372.21 \pm 140.54$ con CV; $X = 1298.46 \pm 208.74$ con IP) y finalmente el bazo ($X = 1127.67 \pm 512.78$ con CV; $X = 1173.08 \pm 472.19$ con IP). De los órganos con fagocitos no profesionales, el intestino mostró un mayor número de levaduras adheridas ($X = 1157.29 \pm 520.97$ con CV; $X = 1152.54 \pm 496.16$ con IP) que la tráquea ($X = 1136.92 \pm 224.27$ con

CV; $X = 1141.33 \pm 244.06$ con IP).

b) Para la cepa EH-375 los valores de adherencia de levaduras fueron similares a los de la cepa EH-53. El pulmón fue el órgano que registró el mayor número de levaduras adheridas ($X = 1729.38 \pm 247.40$ con CV; $X = 1695.38 \pm 257.58$ con IP) después el hígado ($X = 1426.46 \pm 271.30$ con CV; $X = 1398.92 \pm 363.36$ con IP) y finalmente el bazo ($X = 1156.08 \pm 452.75$ con CV; $X = 1114.21 \pm 493.94$ con IP). Asimismo, el intestino mostró mayor cantidad de levaduras adheridas ($X = 1062.33 \pm 1097.83$ con CV; $X = 1097.83 \pm 443.02$ con IP) que la tráquea ($X = 967.38 \pm 145.33$ con CV; $X = 946.79 \pm 177.58$ con IP).

c) De modo similar al encontrado en murciélagos, en el modelo murino *Ca* mostró los menores promedios de adherencia de levaduras. Se observaron valores muy homogéneos tanto en los denominados órganos con fagocitos profesionales, el pulmón ($X = 203.08 \pm 75.70$ con CV; $X = 232.75 \pm 81.0$ con IP), el hígado ($X = 174.25 \pm 65.24$ con CV; $X = 210.13 \pm 55.93$ con IP) y el bazo ($X = 179.08 \pm 70.06$ con CV; $X = 194.63 \pm 74.56$ con IP) como en los no profesionales, el intestino ($X = 213.92 \pm 71.50$ con CV; $X = 216.88 \pm 73.15$ con IP) y la tráquea ($X = 174.88 \pm 117.69$ con CV; $X = 202.96 \pm 91.20$ con IP).

Al comparar por ANOVA-MANOVA los métodos utilizados (cristal violeta e inmunoperoxidasa), para identificar las levaduras adheridas a los tejidos, no se encontró diferencias significativas entre ambos ($p > 0.05$), tanto en los ensayos realizados en murciélagos (Fig. 2) como en ratones (Fig. 3).

En los ensayos testigos, no se observaron en ninguna circunstancia la adherencia de partículas de látex sobre los tejidos y los resultados de los dos métodos empleados sin incubación con partículas fueron siempre negativos.

Al analizar la interacción cepa-órgano en *A. hirsutus* (Fig. 4), con respecto a la cepa EH-53, se encontraron diferencias significativas entre los promedios de adherencia de levaduras en pulmón y los otros cuatro órganos estudiados ($p < 0.05$, $\alpha = 0.01$), asimismo entre el intestino y la tráquea o el hígado, o bien entre el bazo y la tráquea o el hígado ($p < 0.05$); mientras que entre el intestino y el bazo, así como entre la tráquea y el hígado, no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Los resultados referentes a la cepa EH-375, mostraron que el pulmón, el intestino y el bazo alcanzaron promedios similares de levaduras adheridas no evidenciando diferencias entre sus valores ($p > 0.05$). No obstante, entre el pulmón y la tráquea, así como entre el pulmón y el hígado, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$; $\alpha = 0.01$) en los promedios de levaduras adheridas. La adherencia de levaduras de Ca en los cinco tejidos estudiados mostró promedios homogéneos entre ellos, por lo general, inferiores a 250 levaduras/tejido, por lo que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

En el análisis de la interacción cepa-órgano en el modelo murino (Fig. 5), se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$; $\alpha = 0.01$) en la adherencia de levaduras de la cepa EH-53 entre el pulmón y los demás órganos, así como entre el hígado y el intestino, el bazo, y la tráquea; mientras que entre los tres últimos

órganos el promedio de levaduras adheridas no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$). Con respecto a la cepa EH-375, las diferencias entre los promedios de levaduras adheridas fueron significativas ($p < 0.05$) entre el pulmón y los demás órganos, así como entre el hígado y el bazo, la tráquea, y el intestino; sin embargo, las diferencias entre los promedios de levaduras adheridas a estos tres últimos órganos no fueron significativas ($p > 0.05$; $\alpha = 0.05$). Por último, la adherencia de levaduras de *Ca* a todos los tejidos de ratones mostró promedios aproximados a las 200 levaduras/tejido, no evidenciando diferencias significativas ($p > 0.05$).

Al integrar por ANOVA-MANOVA en la figura 6 los promedios de adherencia de levaduras de cada cepa fúngica a todos los órganos de cada especie animal, en los dos procesamientos (CV e IP), las cepas de *Hc*, tanto la EH-53 ($X = 1538.62$ levaduras adheridas a órganos de murciélagos; 1315.77 levaduras adheridas a órganos de ratones) como la EH-375 (1227.82 levaduras adheridas a órganos de murciélagos; 1234.17 levaduras adheridas a órganos de ratones), mostraron mayor capacidad de adherencia a todas las criosecciones de los tejidos estudiados que la cepa 15 de *Ca* (106.26 levaduras adheridas a órganos de murciélagos y 222.76 levaduras adheridas a órganos de ratones).

Las levaduras de la cepa EH-53 se adhirieron más a ciertos órganos de murciélagos que las de la cepa EH-375 ($p < 0.05$), aunque en ratones la diferencia entre los promedios de ambas cepas no fue significativa ($p > 0.05$) (Fig. 6). Al comparar los promedios de adherencia de levaduras obtenidos para cada una de

las cepas de *Hc* con los de *Ca*, en ambas especies animales, se encontró diferencias significativas con valores de $p < 0.05$ para $\alpha = 0.001$ (Fig. 6).

Las observaciones microscópicas realizadas permitieron identificar las áreas de cada órgano estudiado sobre las cuales se adhirieron las levaduras de las diferentes cepas.

Pulmón- La figura 7a muestra numerosas levaduras de *Hc* adheridas a los componentes tisulares del parénquima pulmonar de murciélago, dejando prácticamente libres los espacios aéreos. En contraste, se observó un escaso número de levaduras de *Ca* adheridas al corte de pulmón con la misma distribución (Fig. 7b). Lo anterior, coincidió con los resultados obtenidos en el ratón, corroborándose así cualitativamente los datos numéricos antes expresados para ambas especies de animales.

En las observaciones sobre la distribución de las levaduras de cada cepa a los cortes de pulmón, tanto de murciélago como de ratón, se encontró que ésta fue uniforme ya que no se apreció una preferencia por algún componente del parénquima pulmonar, aunque la adherencia de levaduras aisladas o en cúmulos a macrófagos en los bordes alveolares (macrófagos alveolares) ha sido observada tanto para *Hc* como *Ca* (Fig. 7b).

Bazo- En los cortes de bazo de ambas especies de animales, se observó una mayor distribución de levaduras de *Hc* adheridas en la pulpa blanca y roja,

mientras que la cápsula mostró un número escaso de levaduras, como lo muestra la figura 8a. El número de levaduras de *Ca* adheridas a los cortes de bazo de murciélago así como de ratón fue mucho menor que *Hc*, y mostró mayor uniformidad de la distribución de las levaduras, aisladas o en pequeños cúmulos, sobre la pulpa blanca y roja, incluyendo la zona marginal, así como en el tejido conjuntivo de la cápsula (Fig. 8b y c). En la figura 9a, se muestran cúmulos de levaduras de *Hc* adheridas a células de bazo de murciélago, algunas de las cuales, posiblemente, son macrófagos; la figura 9b, muestra la misma interacción en el bazo de ratón.

Hígado- La distribución de las levaduras adheridas a los cortes de hígado mostró tanto para murciélagos como para ratones (Figs. 10a y b) una localización preferencial por la cara sinusoidal de los hepatocitos y por la formación de cúmulos en células intrasinusoidales, probables células de Küpffer (Fig. 10a).

Intestino- En los murciélagos, se observó una mayor selectividad en la adherencia de levaduras, tanto de *Hc* (Figs. 11a y b) como de *Ca* (Fig. 11c), a la lámina propia de las vellosidades intestinales y en menor grado a la submucosa. Mientras que, en y sobre el epitelio así como en la capa muscular externa, se observó escaso número de levaduras (Figs. 11a-c). En el ratón, se encontró una distribución similar, aunque con menor número de levaduras adheridas de *Hc* (Figs. 12a y b) y de *Ca* (Fig. 12c).

Tráquea- En los cortes de tráquea de las dos especies de animales estudiadas, se observaron las levaduras adheridas, tanto de *Hc* (Figs. 13a y b) como de *Ca* (Figs. 13c y d), distribuidas de modo similar a los cortes de intestino, concentrándose el mayor número de levaduras en las regiones subepiteliales que corresponden a la lámina propia, y por fuera de los cartilagos traqueales, región conocida como adventicia. Mientras que, el número de levaduras adheridas fue escaso en y sobre el epitelio traqueal.

Testigos- Los cortes testigos de todos los órganos estudiados, observados tanto por CV como por IP, resultaron siempre negativos (Figs. 14a-e), sea los incubados con partículas de látex como los sin incubación con cualquier tipo de partícula.

DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* sobre los tejidos de órganos con predominio de células fagocíticas profesionales y no profesionales de murciélagos, mamíferos considerados como los más vinculados con las fuentes de infección de *H. capsulatum* debido a su estrecha relación con espacios cerrados, los cuales constituyen temporal o permanentemente su hábitat natural y en donde por sus características ambientales se pueden encontrar los propágulos fúngicos causales de la histoplasmosis.

Los animales utilizados fueron seleccionados bajo el criterio de que deberían ser lo más genéticamente homogéneos posible, razón por la cual los ratones machos adultos empleados pertenecieron a la cepa singénica BALB/c y los murciélagos machos adultos de la especie *A. hirsutus* procedieron de una colonia gregaria monitoreada sistemáticamente durante seis años en la misma cueva, lo que aumenta la probabilidad de que sus especímenes presenten una alta homología genética.

Los órganos extraídos de cada animal fueron elegidos con base en dos criterios: uno, la implicación en la vía de entrada del patógeno (respiratoria) y en su posible diseminación a órganos que constitutivamente contienen células del sistema fagocítico mononuclear del hospedero; el otro, por el predominio de

fagocitos profesionales (pulmón, hígado y bazo) y no profesionales (intestino y tráquea) en sus tejidos.

En los murciélagos procesados, los ensayos de adherencia *in situ* realizados sobre las muestras de órganos con predominio de fagocitos profesionales, resaltan que el pulmón es el órgano que mostró más adherencia de levaduras de *H. capsulatum* (Figs. 2 y 4), lo que sugiere que tiene un mayor número de sitios de reconocimiento para éstas. Este hallazgo, coincide con el planteamiento de que la infección natural compromete al sistema respiratorio como vía de entrada del patógeno, y de que el pulmón es el órgano blanco principal de la infección. La unión de levaduras de *H. capsulatum* a macrófagos pulmonares de murciélagos ha sido previamente reportada en murciélagos naturalmente infectados y capturados al azar (Taylor *et al.*, 1999a). La interacción de levaduras de *H. capsulatum* con el entorno tisular del pulmón es notoriamente diferente, en términos cuantitativos, de la interacción de *C. albicans*, tanto en murciélagos como en ratones, lo que sugiere que el pulmón tiene componentes posiblemente asociados a la superficie celular o a la matriz extracelular que reconocen, con preferencia, componentes de la fase parasitaria de *H. capsulatum* (levaduras) o vice-versa. Este reconocimiento sólo puede estar mediado por interacciones no opsónicas, como las que ocurren entre proteína-carbohidrato, proteína-proteína o por cargas eléctricas. Se descarta la participación de mecanismos opsónicos en estos ensayos debido a que los cortes están fijados y no fueron adicionadas opsoninas. La posibilidad de la existencia de opsoninas

previamente unidas a las células o a los componentes de matriz extracelular fue parcialmente controlada por los lavados repetidos previa adición de levaduras y con el uso del suero negativo en los ensayos de inmunoperoxidasa.

La distribución de las levaduras de las tres cepas fúngicas utilizadas fue uniforme sobre el parénquima pulmonar, encontrándose algunos macrófagos alveolares con levaduras adheridas (Figs. 7a y b). Un hallazgo relevante que sólo se observa en pulmón de murciélago fue la diferencia ($p < 0.05$, $\alpha = 0.01$) en el comportamiento entre las dos cepas de *H. capsulatum*, donde la EH-53 se adhirió en mayor número que la EH-375 (Figs. 2 y 4). Lo anterior se puede interpretar con base en la procedencia de ambas cepas, la EH-53 se aisló de un paciente infectado en una cueva de Hidalgo, por probable inhalación de esporas del hongo asociadas a guano de murciélagos y la EH-375 se aisló de un murciélago naturalmente infectado. Es posible que el pase por un hospedero intermediario en el caso de la EH-53 (humano) le permitiera activar mecanismos de reconocimiento que favorecieron su mayor adherencia al parénquima pulmonar del murciélago (posible hospedero natural), mientras que la EH-375 es una cepa más adaptada a murciélagos (reservorio) (Taylor *et al.*, 1999b).

La capacidad de adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a cortes de bazo e hígado de murciélagos, fue similar en ambas cepas, aunque se adhirieron en mayor número a bazo que a hígado ($p < 0.05$) (Figs. 2 y 4). Sin embargo, las levaduras se distribuyeron según la organización tisular de estos órganos. En

bazo, se observó particularmente la adherencia de las levaduras de *H. capsulatum* a la pulpa blanca y roja (Fig. 9a). Aunque no es posible distinguir la preferencia por las zonas T o B de la pulpa blanca, si se observa el compromiso de la zona marginal asociada a los espacios sinusoides, por el cúmulo de levaduras, posiblemente adheridas a macrófagos (Fig. 9a). La interacción de levaduras de *H. capsulatum* con la pulpa roja, puede estar relacionada con la capacidad del hongo de unirse a eritrocitos (Taylor *et al.*, 2002) y a los macrófagos esplénicos. El número de levaduras de *C. albicans* adheridas a los cortes de bazo de murciélago también fue mucho menor que de *H. capsulatum*, y mostró similar distribución de las levaduras en la pulpa blanca y roja; posiblemente, en particular, en la zona marginal (Fig. 9c), sin embargo es notoria la presencia de *C. albicans* en la cápsula (Fig. 9b).

Observaciones de Riesselman *et al.* (1991) y Kanbe *et al.* (1993), a través de ensayos *ex vivo*, refieren la preferencia de levaduras de *C. albicans* para adherirse a macrófagos de la zona marginal de bazo de ratones. Los resultados marcan diferencias en la preferencia de *H. capsulatum* y *C. albicans* para interactuar con componentes tisulares de bazo.

La distribución de las levaduras en grandes cúmulos, adheridas a la cara sinusoidal de los hepatocitos (espacio perisinusoidal o de Disse) así como a las células intrasinusoidales, probables células de Küpffer (Fig. 11a), sugiere la

presencia de células fagocíticas capaces de reconocer a *H. capsulatum* en estas zonas.

La adherencia de las levaduras, tanto de *H. capsulatum* como de *C. albicans*, a la lámina propia de las vellosidades intestinales fue un hallazgo interesante que evidenció una gran identidad, de estos patógenos, hacia las moléculas constitutivas asociadas a componentes de la lámina propia, en particular en la región de los vasos linfáticos (vaso quillfero central). La unión de *H. capsulatum* a componentes de matriz extracelular, como la laminina, está mediada por una proteína de 50 Kda, como lo demostró en ensayos *in vitro* McMahon *et al.* (1995). Asimismo, la unión de *H. capsulatum* a otros componentes de la matriz extracelular como condroitín-sulfato y heparán-sulfato ha sido observada por Taylor *et al.* (2002), en ensayos de inhibición de adherencia de levaduras, tratadas con estos glicosaminoglicanos, a eritrocitos humanos. Lo anterior no descarta la posibilidad de unión a las células epiteliales de los vasos linfáticos y sanguíneos de las vellosidades y en consecuencia, que éstos participen como vía de diseminación de *H. capsulatum* a los tejidos adyacentes. La unión a componentes de la matriz extracelular también ocurre en *C. albicans* y se ha observado la presencia de receptores de laminina y fibrinógeno, de aproximadamente 68 Kda, en este hongo en ensayos de ELISA utilizando sustratos de estos componentes de matriz (Bouchara *et al.* 1990; Mendes-Giannini *et al.* 2000; Tronchin *et al.* 1991).

La escasa adherencia de levaduras de *H. capsulatum* al epitelio y hacia la luz intestinal disminuye la probabilidad de que la vía digestiva sea la puerta de entrada y salida del agente infeccioso.

La adherencia de las levaduras, tanto de *H. capsulatum* como de *C. albicans*, en mayor número a las regiones subepiteliales que corresponden a la lámina propia de la tráquea, así como fuera de los cartílagos traqueales (túnica adventicia), sugiere que al igual que el intestino, predomina en la tráquea un reconocimiento a componentes de la matriz extracelular local. Sin embargo, no podemos descartar en ambos órganos (intestino y tráquea) el papel de las células epiteliales como permisivas (sin mecanismos citocidas) para el parásito fúngico (Eissenberg *et al.*, 1991). La presencia de estas células cercanas a las zonas donde se describió la adherencia del hongo, sugiere posibles sitios favorables para la persistencia de una infección intracelular latente.

En el procedimiento comparativo con el modelo murino se encontró que la adherencia y la distribución de levaduras de *H. capsulatum* y de *C. albicans*, en los cortes de intestino y tráquea, fueron similares a las observadas en murciélagos, lo que permite sugerir que las dos especies animales comparten algunos constituyentes asociados a la interacción con *H. capsulatum* y *C. albicans*. El pulmón de ratones, como el de murciélagos, mostró el número más alto en adherencia de levaduras y la explicación de tal evento coincide con la vía de entrada del parásito, como fue antes mencionado. Sin embargo, en ratones, no se observó una diferencia tan marcada entre las adherencias de levaduras de las

cepas de *H. capsulatum* como lo visto en murciélagos, lo que apoya la interpretación del comportamiento distintivo de las cepas de *H. capsulatum* en relación con el hospedero quiróptero, como fue referido anteriormente.

En un análisis integral de la interacción dada entre cada cepa fúngica con cada animal, se observó que *H. capsulatum* presentó siempre mayor número de levaduras adheridas que *C. albicans*.

Es importante destacar en el caso de los especímenes de murciélagos procesados (capturados al azar) que éstos no portaban infección diseminada por *H. capsulatum*, como se infiere de la observación de los campos libres de cualquier tipo de partícula adherida en los ensayos testigos (látex y no incubación).

Los métodos utilizados (CV e IP) para identificar las levaduras adheridas a los cortes de tejidos de las dos especies de animales fueron satisfactorios y aportaron resultados muy parecidos, sin mostrar diferencias significativas entre ambos ($p > 0.05$). Aunque CV es más práctico en el conteo, el método de IP es más preciso porque identifica el hongo por un reconocimiento mediado por anticuerpos específicos.

Los resultados del presente estudio sólo demuestran la interacción levadura-tejido y no aportan elementos para discriminar la naturaleza de las moléculas involucradas en ella, aunque se está desarrollando en el laboratorio proyectos dirigidos a dilucidar los mecanismos y las moléculas de los componentes químicos asociados.

CONCLUSIONES

1. Los datos encontrados son de gran relevancia puesto que constituyen los primeros hallazgos en la interacción célula:célula representada en el binomio *Artibeus hirsutus*:*Histoplasma capsulatum*
2. Las levaduras de *Hc* se unieron a tejidos con células fagocíticas profesionales de pulmón, bazo e hígado, asimismo a tejidos con células fagocíticas no profesionales de intestino y tráquea de murciélago, y siempre se adhirieron en mayor número que las de *C. albicans*
3. El pulmón fue el órgano que presentó mayor número de sitios de reconocimiento a componentes de la fase parasitaria de *Hc* lo que refuerza su compromiso como la principal vía de entrada para la infección por este hongo
4. La adherencia de levaduras de *Hc* a bazo, posiblemente está asociada a macrófagos de la pulpa blanca y pulpa roja.
5. La adherencia de levaduras de *Hc* a hígado, posiblemente está asociada a células de Küpffer.
6. La escasa adherencia de levaduras de *Hc* al epitelio y hacia la luz intestinal disminuye la probabilidad de que la vía digestiva sea la puerta de entrada y/o salida del agente infeccioso
7. En el intestino, al igual que en la tráquea, predomina un reconocimiento a componentes de la matriz extracelular local

8. Las observaciones de los ensayos testigos con los murciélagos procesados confirman que éstos no portaban infección diseminada por *Hc*

BIBLIOGRAFÍA

Arita H. 1993. Conservation biology of the cave bats of Mexico. *J Mammal* 74:693-702.

Bouchara JP, Tronchin G, Annaix V, Robert R, Senet JM. 1990. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infect Immun* 58: 48-54.

Bullock WE. 1993. Interactions between human phagocytic cells and *Histoplasma capsulatum*. *Arch Med Res* 24: 219-223.

Bullock WE, Wright SD. 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.

Chávez-Tapia CB, Vargas-Yañez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Toriello C, Reyes-Montes MR, Taylor ML. 1998. I. El murciélago como reservorio y responsable de la dispersión de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza II. Papel de los marcadores moleculares del hongo aislado de murciélagos infectados. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx* 11: 187-191.

Dumond A, Robert A. 1970. Electron microscopic study of phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* by hamster peritoneal macrophages. Lab Invest 23: 278-286.

Eissenberg LG, Goldman WE. 1991. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. Clin Microbiol Rev 4: 411-421.

Eissenberg LG, Goldman WE, Schlesinger PH. 1993. *Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. J Exp Med 177: 1605-1611.

Eissenberg LG, Schlesinger PH, Goldman WE. 1988. Phagosome-lysosome fusion in P388D1 macrophages infected with *Histoplasma capsulatum*. J Leukocyte Biol 43: 483-491.

Eissenberg LG, West JL, Woods JP, Goldman WE. 1991. Infection of P388D1 macrophages and respiratory epithelial cells by *Histoplasma capsulatum*: selection of avirulent variants and their potential role in persistent histoplasmosis. Infect Immun 59: 1639-1646.

Hoff GL, Bigler WJ. 1981. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. J Wildlife Dis 17: 191-196.

Hoffmann A. 1998. Los ácaros asociados a hongos, su papel en la naturaleza. Rev Inst Nal Enf Resp Méx 11: 183-186.

Howard DH. 1964. Intracellular behavior of *Histoplasma capsulatum*. J Bacteriol 87: 33-38.

Howard DH. 1965. Intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. J Bacteriol 89: 518-523.

Howard DH. 1973. Fate of *Histoplasma capsulatum* in guinea pig polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun 8: 412-419.

Jérez ME, Taylor ML. 1989. Estudio del receptor manosa/fucosa en la fagocitosis de levaduras de *Histoplasma capsulatum*. Rev Mex Mic 5: 241-259.

Kanbe T, Han Y, Redgrave B, Riesselman MH, Cutler JE. 1993. Evidence that mannans of *Candida albicans* are responsible for adherence of yeast forms to spleen and lymph node tissue. Infect Immun 61: 2578-2584.

Kasuga T, Taylor JW, White TJ. 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. J Clin Microbiol 37: 653-663.

Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, da Silva Lacaz C, Heins-Vaccari EM, de Freitas RS, Zancopé-Oliveira RM, Zhenyu Q, Negroni R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, Taylor JW. 2002. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. (Enviado a publicación).

Kunz TH. 1988. Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats. London: Smithsonian Institution Press.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. 1992. Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger.

Lane TE, Wu-Hsieh BA, Howard DH. 1994. Antihistoplasma effect of activated mouse splenic macrophages involves production of reactive nitrogen intermediates. Infect Immun 62: 1940-1945.

León ME, Zepeda A, Oliva E, Barrios R, Taylor ML. 1989. Cinética de infección de la línea celular de macrófagos J774.2 con *Histoplasma capsulatum*: estudio por microscopía electrónica Rev Lat-Amer Microbiol 31: 23-29.

MacMahon JP, Wheat J, Sobel ME, Pasula R, Downing JF, Martin WJ. 1995. Murine laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. J Clin Invest 96: 1010-1017.

Medellín R, Arita HT, Sánchez-Herrera O. 1997. Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo. Publicación Especial No. 2. México DF: AMMAC.

Mendes-Giannini MJS, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VLG, ED Escalante, Hanna SA, Lenzi HL, Machado MP, Miyaji M, Monteiro da Silva JL, Mota EM, Restrepo A, Restrepo S, Tronchin G, Vincenzi LR, Xidieh CF, Zenteno E. 2000. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. Med Mycol 38: 113-123.

Newman SL, Bucher C, Rhodes J, Bullock WE. 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.

Newman SL, Gootee L, Brunner G, Deepe GS. 1994. Chloroquine induces human macrophage killing of *Histoplasma capsulatum* by limiting the availability of intracellular iron and is therapeutic in a murine model of histoplasmosis. *J Clin Invest* 93: 1422-1429.

Newman SL, Gootee L, Gabay JE. 1993. Human neutrophil-mediated fungistasis against *Histoplasma capsulatum*. Localization of fungistatic activity to the azurophil granules. *J Clin Invest* 92: 624-631.

Newman SL, Gootee L, Morris R, Bullock WE. 1992. Digestion of *Histoplasma capsulatum* yeasts by human macrophages. *J Immunol* 149: 574-580.

Peña-Sandoval GR, Chávez-Tapia CB, Rodríguez-Arellanes G, Reyes-Montes MR, Duarte-Escalante E, Taylor ML. 2002. Primeros registros para México de aislamientos de *Histoplasma capsulatum* a partir de los murciélagos *Desmodus rotundus* (no migratorio) y *Tadarida brasiliensis* (migratorio de larga distancia). *Rev Mex Mic.* (Enviado a publicación).

Rabinovitch M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5: 85-87.

Randall CC, Hackney AL. 1953. Observations on human tissue cultures naturally infected by *Histoplasma capsulatum*. Am J Pathol 29: 861-867.

Randall CC, McVickar DL. 1951. *Histoplasma capsulatum* in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med 77: 150-158.

Randall CC, Turner DJ. 1953. Cultivation of yeast in Earle's "L" strain mouse cells *in vitro*. Proc Soc Exp Biol Med 83: 584-585.

Retallack D, Woods JP. 1999. Molecular epidemiology, pathogenesis, and genetics of the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. Microb Infect 1: 817-825.

Riesselman MH, Kanbe T, Cutler JE. 1991. Improvements and important considerations of an *ex vivo* assay to study *Candida albicans*-splenic tissue interactions. J Immunol Methods 145: 153-160.

Schaffner A, Davis CE, Schaffner T, Markert M, Douglas H, Braude AL. 1986. *In vitro* susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. J Clin Invest 78: 511-524.

Schunur RA, Newman SL. 1990. The respiratory burst response to *Histoplasma capsulatum* by human neutrophils. Evidence for intracellular trapping of superoxide anion. J Immunol 144: 4765-4772.

Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Reyes-Montes MR. 2000a. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. Fung Genet Biol 30: 207-212.

Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Vargas-Yañez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Toriello C, Pérez A, Reyes-Montes MR. 1999a. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. Am J Trop Med Hyg 61: 914-919.

Taylor ML, Duarte-Escalante E. 1995. Estrategias del *Histoplasma capsulatum* para evadir los mecanismos citocidas de los fagocitos. Rev Invest Clin 47: 499-506.

Taylor ML, Duarte-Escalante E, Pérez A, Zenteno E. 2002. Attachment of *Histoplasma capsulatum* yeast-cells to human erythrocytes, mediated by a yeast-lectin like molecule. Microbial Path. (Enviado a publicación).

Taylor ML, Duarte-Escalante E, Reyes-Montes MR, Elizondo N, Maldonado G, Zenteno E. 1998. Interaction of murine macrophage-membrane proteins with components of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. Clin Exp Immunol 113: 423-428.

Taylor ML, Espinosa-Schoelly ME, Rico-Galindo B, Casasola J, Goodsaid F. 1989. Evaluation of phagolysosome fusion in acridine orange stained macrophages infected with *Histoplasma capsulatum*. Clin Exp Immunol 75: 466-470.

Taylor ML, Reyes-Montes MR, Chávez-Tapia CB, Curiel-Quesada E, Duarte-Escalante E, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Valenzuela-Tovar F. 2000b. Ecology and molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum*, in Mexico. In Research Advances in Microbiology. Mojan RM & Benedik M (eds.), pp. 29-35. Kerala: Global Research Network.

Taylor ML, Rico B, Goodsaid F. 1995. Study of Fc gamma murine macrophage receptors (Fc gamma R) in the Internalization of *Histoplasma capsulatum* yeast. Arch Med Res 26: 179-184.

Taylor ML, Rodríguez-Arellanes G, Duarte-Escalante E. 1999b. Catálogo de cepas de "*Histoplasma capsulatum*". México, DF: Facultad de Medicina, UNAM.

Taylor ML, Rodríguez-Arellanes G, Romero-Martínez R. 2000c. Diversidad de cepas de *Histoplasma capsulatum*. In III Diplomado de Micología Médica. López-Martínez & Hernández F (eds.), p. 191-204. México, DF: Facultad de Medicina, UNAM.

Taylor ML, Toriello C, Pérez-Mejía A, Martínez MA, Reyes-Montes MR, Espinosa-Ávila L, Chávez-Tapia C. 1994. Histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico: A biological approach. Rev Mex Mic 10: 49-62.

Tewari R, Wheat LJ, Ajello L. 1998. Agents of Histoplasmosis. In Topley & Wilson's. Microbiology and Microbial Infections. Medical Mycology. Volume 4. Ajello L & Hay RJ (eds.), pp. 373-393. New York: Arnold & Oxford University Press, Inc.

Tronchin G, Bouchara JP, Annaix V, Robert R, Senet JM. 1991. Fungal cell adhesion molecules in *Candida albicans*. Eur J Epidemiol 7: 23-33.

Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), A guide with abstracts of microplate applications, p.35-43. London: Dynatech Europe Laboratories Inc.

Wolf JE, Abegg AL, Travis SJ, Kobayashi GS, Little JR. 1989. Effects of *Histoplasma capsulatum* on murine macrophage functions: inhibition of macrophage priming, oxidative burst, and antifungal activities. *Infect Immun* 57: 513-519.

Wolf JE, Massof SE, Sherwin JR, Considine RV. 1992. Inhibition of murine macrophage protein kinase C activity by nonviable *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 60: 2683-2687.

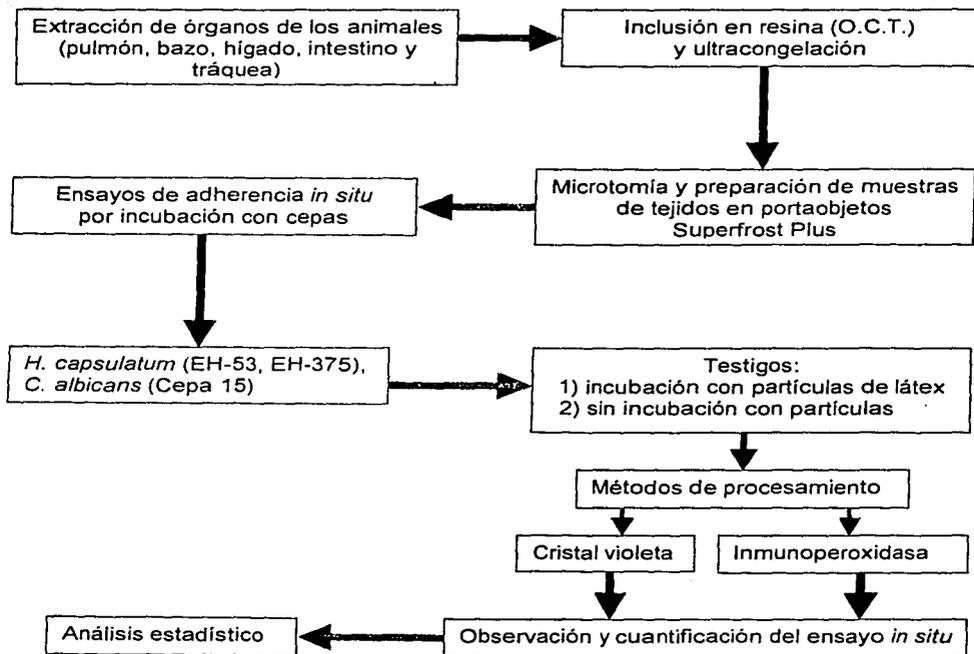


Fig. 1. Diagrama de flujo de los procedimientos realizados. Para los detalles de cada procedimiento ver Materiales y Métodos.

Interacción: cepa-órgano-método (*A. hirsutus*)

$p > 0.05$

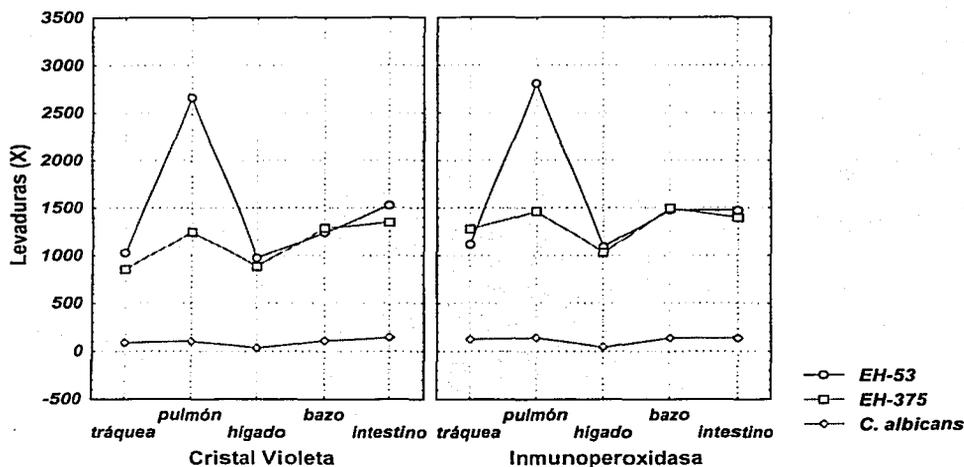


Fig. 2. Interacción entre la adherencia de levaduras de las cepas fúngicas, los órganos animales y los métodos de procesamiento, utilizados en murciélagos *A. hirsutus*. Los detalles de los procedimientos para los ensayos de adherencia *in situ* a los órganos están descritos en Materiales y Métodos. En el análisis por ANOVA-MANOVA se utilizaron 360 lecturas por cada método de procesamiento (CV e IP), los cuales no presentaron diferencias significativas entre ambos, $p > 0.05$.

Interacción: cepa-órgano-método (BALB/c)

$p > 0.05$

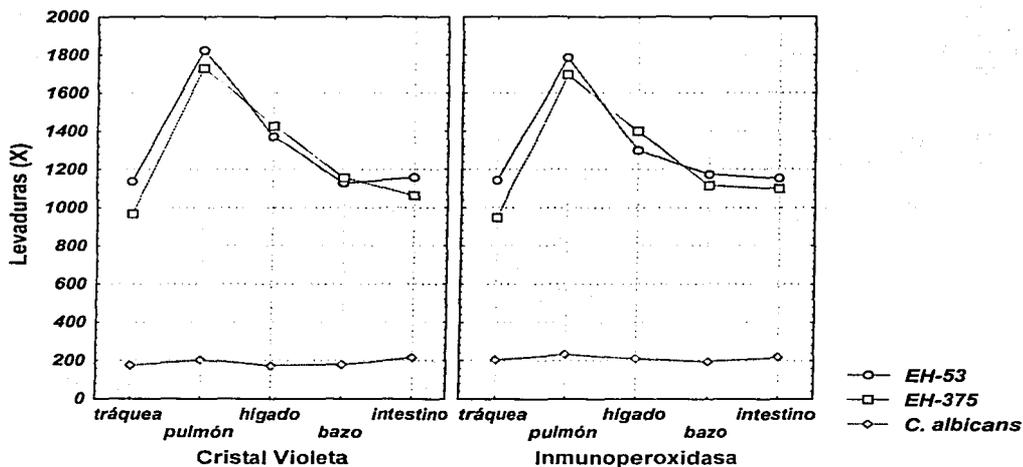


Fig. 3. Interacción entre la adherencia de levaduras de las cepas fúngicas, los órganos animales y los métodos de procesamiento, utilizados en ratones BALB/c. Para el modelo murino se siguieron las mismas indicaciones de la figura 2.

Interacción: cepa-órgano (*A.hirsutus*)

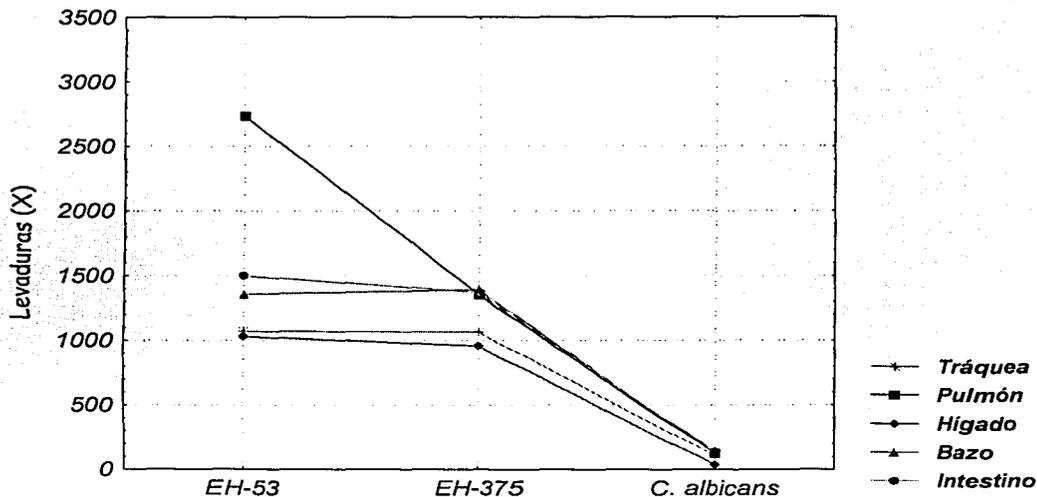


Fig. 4. Capacidad de adherencia de levaduras de las cepas fúngicas a los órganos de murciélagos *A. hirsutus*. Para el análisis por ANOVA-MANOVA se consideraron 720 lecturas, utilizando los dos métodos, CV e IP. Los detalles de los procedimientos para los ensayos de adherencia *in situ* vienen descritos en Materiales y Métodos.

interacción: cepa-órgano (BALB/c)

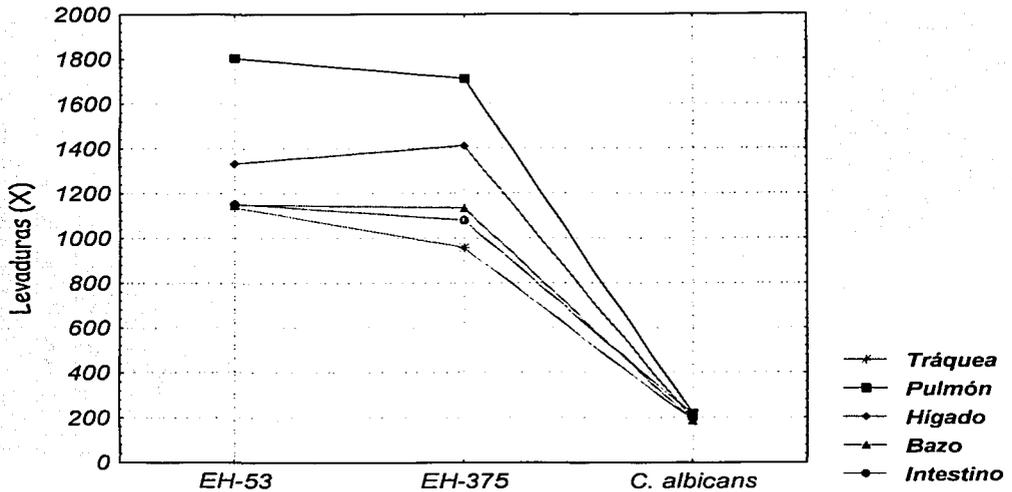


Fig. 5. Capacidad de adherencia de levaduras de las cepas fúngicas a los órganos de ratones BALB/c. Para el modelo murino se siguieron las mismas indicaciones de la figura 4.

Interacción: cepa-animal

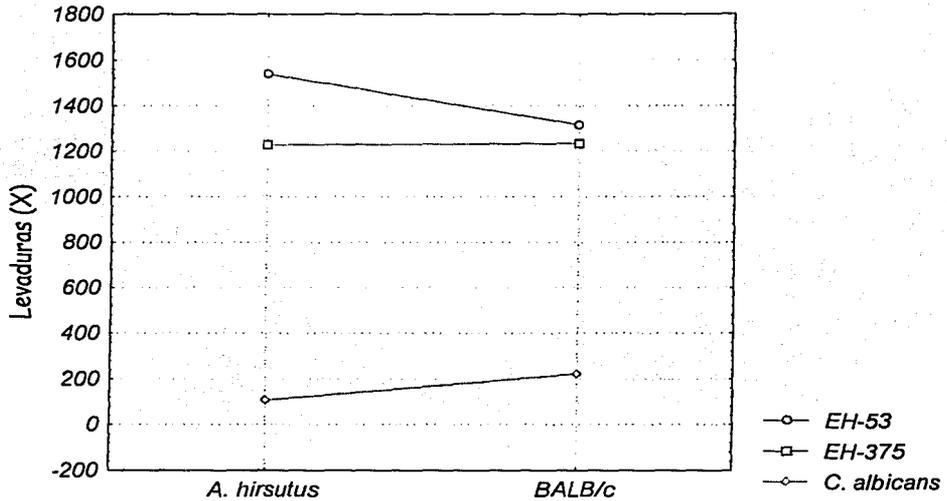


Fig. 6. Capacidad de adherencia de levaduras de las cepas fúngicas a todos los órganos de los animales estudiados. Para el análisis por ANOVA-MANOVA se consideraron 1440 lecturas para las dos especies animales al utilizar los dos procesamientos (CV e IP). Los detalles de los procedimientos para los ensayos de adherencia *in situ* están descritos en Materiales y Métodos.

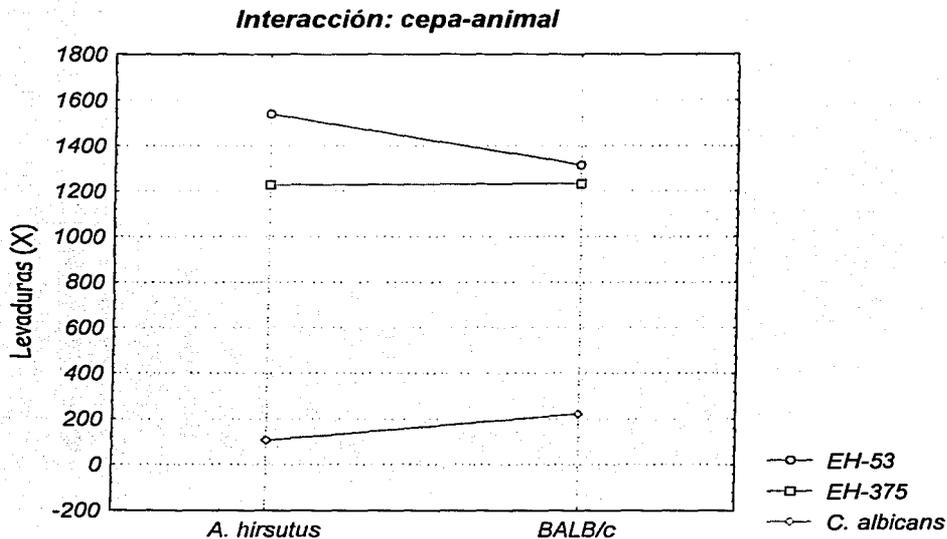


Fig. 6. Capacidad de adherencia de levaduras de las cepas fúngicas a todos los órganos de los animales estudiados. Para el análisis por ANOVA-MANOVA se consideraron 1440 lecturas para las dos especies animales al utilizar los dos procesamientos (CV e IP). Los detalles de los procedimientos para los ensayos de adherencia *in situ* están descritos en Materiales y Métodos.

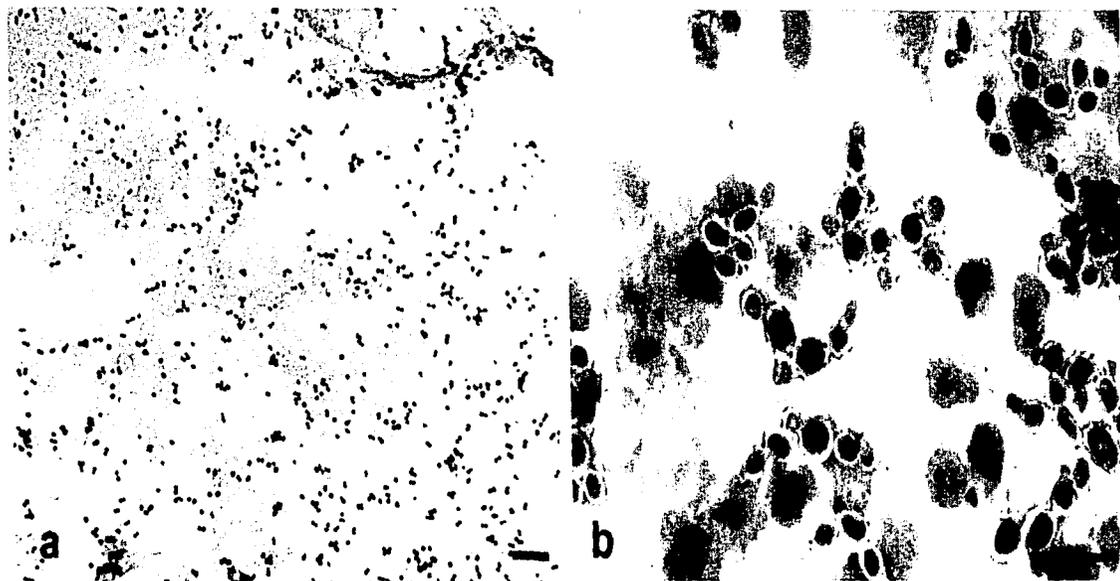


Fig. 7 (a, b). Adherencia de levaduras a pulmón de murciélagos *A. hirsutus*. a) Se observa la distribución de levaduras de la cepa EH-53 de *Hc* sobre el parénquima pulmonar. Tinción con CV, barra = 10 μm ; b) Se observa la distribución de levaduras de la cepa 15 de *Ca* sobre el parénquima pulmonar, revelado con IP, barra = 5 μm . Ver detalles en Materiales y Métodos.

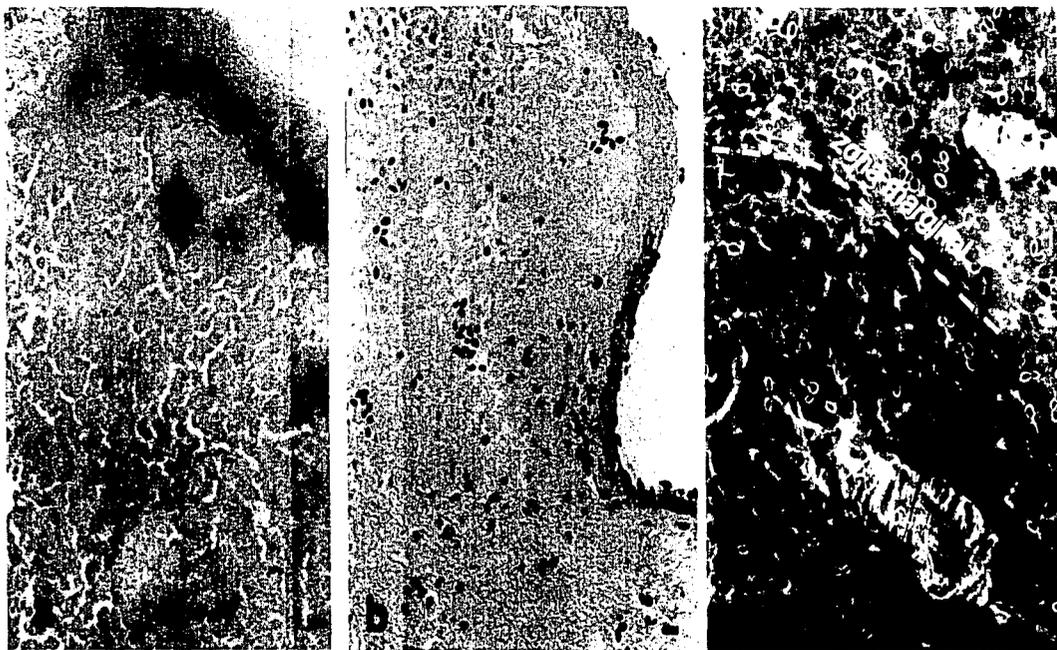


Fig. 8 (a-c). Adherencia de levaduras a bazo de murciélagos *A. hirsutus*. Se observa la distribución de levaduras sobre cortes de bazo. Tinción con CV; a) cepa EH-53 de *Hc*, se observa el mayor número de levaduras sobre la pulpa blanca y roja. b) cepa 15 de *Ca*, se observa una distribución de levaduras más uniforme, incluyendo la cápsula. c) cepa 15 de *Ca*, se destaca la adherencia de levaduras a la zona marginal. Barra = 10 μ m. Ver detalles en Materiales y Métodos.

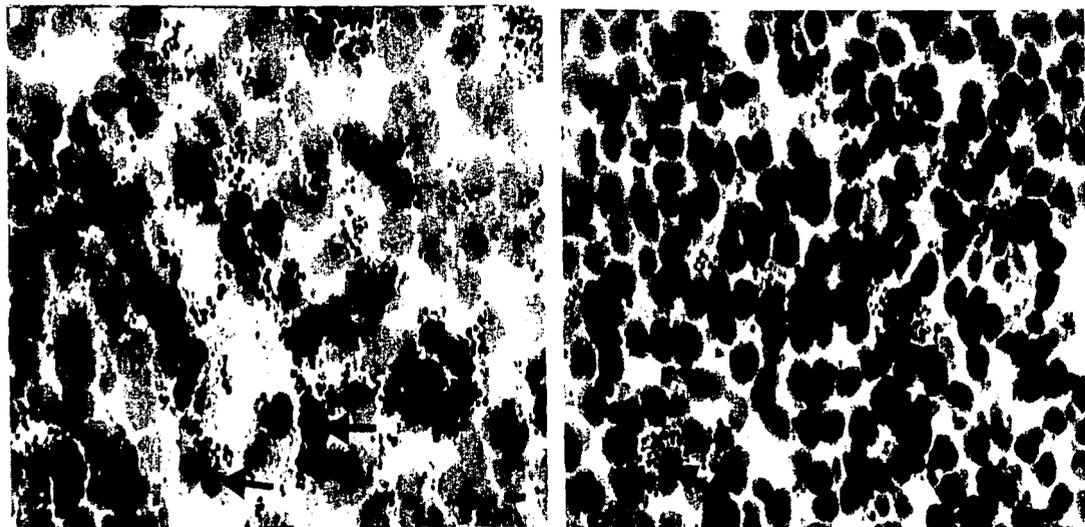


Fig. 9 (a, b). Adherencia de levaduras a bazo de murciélago y de ratón. Se observan las levaduras de la cepa EH-53 de *Hc* sobre cortes de bazo, reveladas con IP; a) murciélago; b) ratón. Ver detalles en *Materiales y Métodos*. Las flechas indican posibles macrófagos de bazo. Barra = 5 μ m.

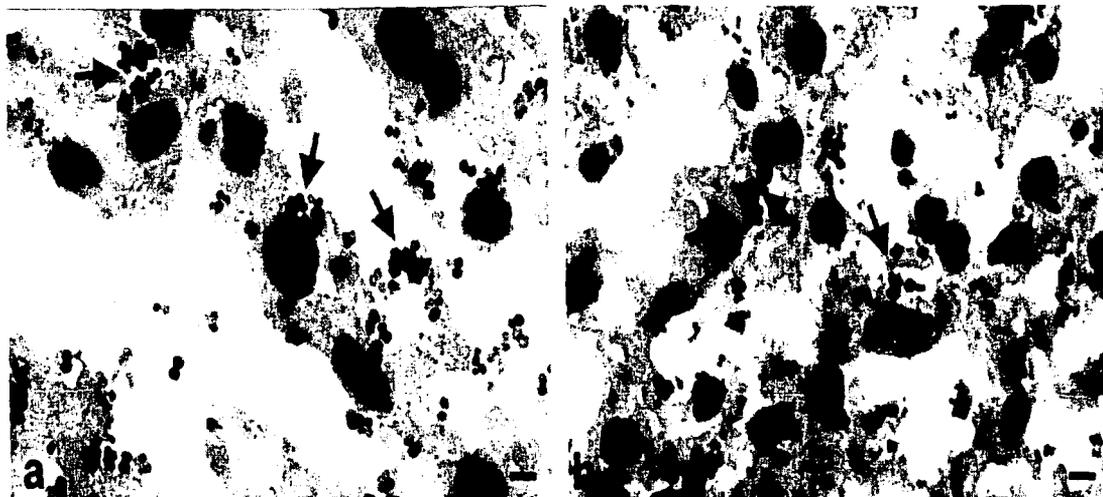


Fig. 10 (a, b). Adherencia de levaduras a hígado de murciélago y de ratón. Se observan las levaduras de la cepa EH-375 de *Hc* sobre cortes de hígado, reveladas con IP; a) murciélago; b) ratón. Ver detalles en Materiales y Métodos. Las flechas indican cúmulos de levaduras adheridas a células intrasinusoidales que corresponden probablemente a células de Kupffer; barras = 10 μ m.

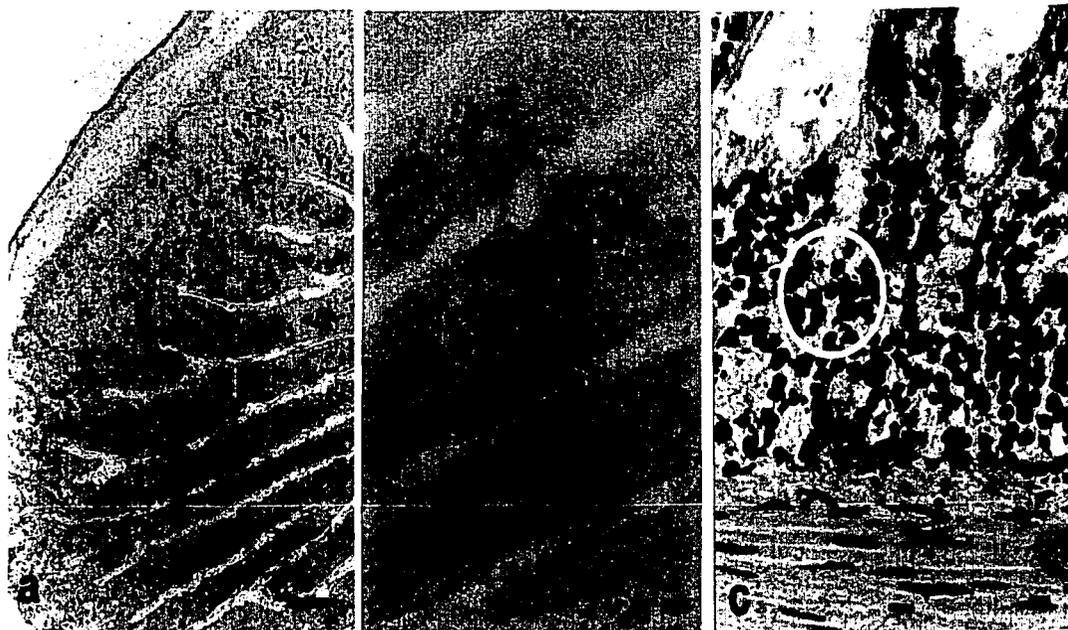


Fig. 11 (a-c). Adherencia de levaduras a intestino de murciélagos *A. hirsutus*. Se observa la distribución de levaduras de *Hc*, así como de *Ca*, adheridas a diferentes cortes de intestino, principalmente sobre la lámina propia de las vellosidades, en menor grado a la submucosa y casi nula sobre epitelio y capa muscular. Tinción con CV. a) cepa EH-53; b) cepa EH-375; c) cepa 15 de *Ca*, el círculo encierra algunas de las levaduras adheridas al tejido. Barras = 10 μ m. Ver detalles en Materiales y Métodos.

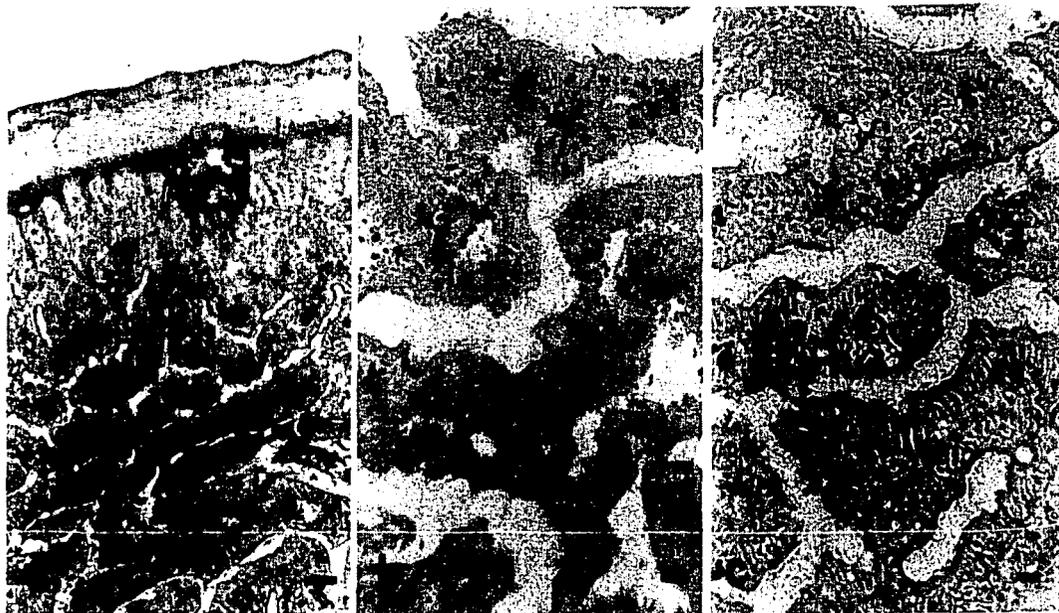


Fig. 12 (a-c). Adherencia de levaduras a intestino de ratones BALB/c. Se observan las levaduras *Hc* y de *Ca* adheridas a cortes de intestino. Tinción con CV. a) cepa EH-53, se observa mayor número de levaduras sobre la lámina propia de las vellosidades intestinales, en menor grado a la submucosa y muy escasas sobre epitelio y capa muscular; b) cepa EH-375, se observan levaduras sobre la lámina propia; c) cepa 15, se observan levaduras sobre la lámina propia y no en epitelio, imagen vista con contraste interferencial (Nomarski) en IX-70. Barras = 10 μ m. Ver detalles en Materiales y Métodos.

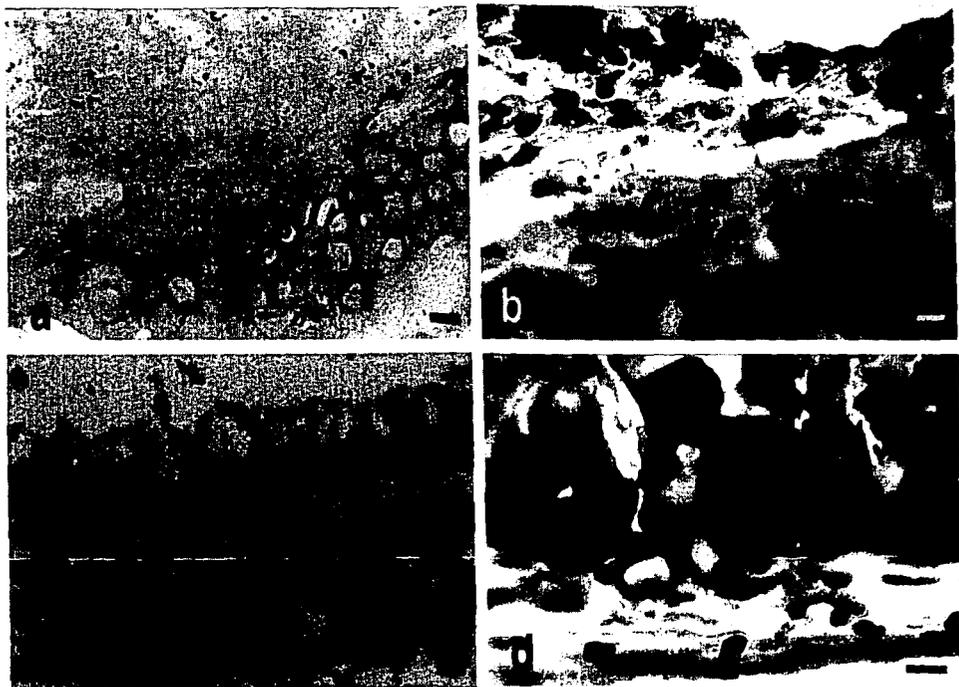


Fig. 13 (a-d). Adherencia de levaduras a tráquea de murciélagos *A. hirsutus*. Se observa la distribución de levaduras de *Hc* y de *Ca* adheridas a cortes de tráquea; en a) cepa EH-53 teñida con CV; b) cepa EH-375 revelada con IP; y c) cepa 15 teñida con CV, se observan levaduras sobre la lámina propia; en d) cepa 15 revelada con IP, se observan levaduras sobre la túnica adventicia. Barras = 10 μ m. Ver detalles en Materiales y Métodos.

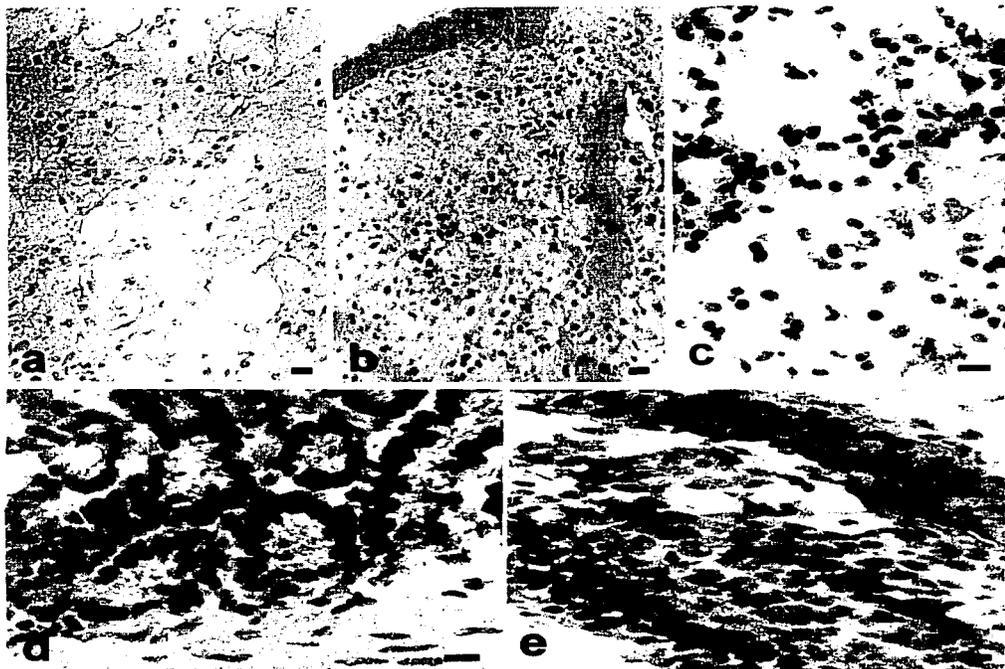


Fig. 14 (a-e). Testigos de no adherencia a órganos de murciélagos *A. hirsutus*. Se destaca la ausencia de partículas sobre los cortes testigos de no adherencia de todos los órganos procesados de murciélagos. a) pulmón teñido con CV; b) bazo teñido con CV; c) IP en hígado; d) intestino teñido con CV; e) tráquea teñida con CV, barras = 10 μm .

Tabla 1. Promedios de levaduras adheridas a cortes de órganos

ÓRGANO	CEPA	MÉTODO	LEVADURAS ADHERIDAS (X ± DS)	
			<i>A. hirsutus</i>	BALB/c
Pulmón	EH-53	CV	2661.63 ± 596.17	1823.25 ± 225.21
	EH-53	IP	2806.83 ± 514.83	1785.21 ± 211.08
	EH-375	CV	1245.96 ± 460.17	1729.38 ± 247.40
	EH-375	IP	1460.96 ± 396.01	1695.38 ± 257.58
	15	CV	0105.79 ± 068.60	0203.08 ± 075.70
	15	IP	0142.96 ± 054.54	0232.75 ± 081.00
Bazo	EH-53	CV	1236.88 ± 292.59	1127.67 ± 512.78
	EH-53	IP	1476.25 ± 237.07	1173.08 ± 472.19
	EH-375	CV	1286.04 ± 263.99	1156.08 ± 452.75
	EH-375	IP	1496.25 ± 262.13	1114.21 ± 497.94
	15	CV	0110.04 ± 029.62	0179.08 ± 070.06
	15	IP	0138.04 ± 046.87	0194.63 ± 074.56
Hígado	EH-53	CV	0971.92 ± 287.58	1372.21 ± 140.54
	EH-53	IP	1090.79 ± 379.17	1298.46 ± 208.74
	EH-375	CV	0884.13 ± 240.26	1426.46 ± 271.30
	EH-375	IP	1029.42 ± 379.79	1398.92 ± 363.36
	15	CV	0033.17 ± 014.51	0174.25 ± 065.24
	15	IP	0041.21 ± 013.59	0210.13 ± 055.93
Intestino	EH-53	CV	1525.92 ± 544.96	1157.29 ± 520.97
	EH-53	IP	1474.29 ± 445.88	1152.54 ± 494.16
	EH-375	CV	1346.88 ± 536.75	1062.33 ± 453.90
	EH-375	IP	1397.75 ± 474.56	1097.83 ± 443.02
	15	CV	0142.54 ± 035.07	0213.92 ± 071.50
	15	IP	0136.29 ± 049.25	0216.88 ± 073.15
Tráquea	EH-53	CV	1027.42 ± 190.16	1136.92 ± 224.27
	EH-53	IP	1114.25 ± 306.59	1141.33 ± 244.06
	EH-375	CV	0855.58 ± 180.72	0967.38 ± 145.33
	EH-375	IP	1275.21 ± 270.50	0946.79 ± 177.58
	15	CV	0088.21 ± 021.51	0174.88 ± 117.69
	15	IP	0124.33 ± 042.48	0202.96 ± 091.20

Los datos fueron analizados por ANOVA-MANOVA ($p < 0.5$). DS = Desviación estándar.