

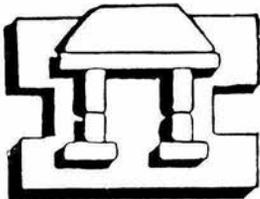


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“ESTUDIO DE LA INTERACCION DE LEVADURAS DEL HONGO *Histoplasma capsulatum* CON FAGOCITOS PROFESIONALES DE MURCIELAGO DE LA ESPECIE *Artibeus hirsutus*”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ARACELI ROJAS BERNABE



IZTACALA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E. MELLO

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARÍA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO

Jefa del Laboratorio de Inmunología de Hongos

Asesoría técnica

M. en C. ESPERANZA DUARTE ESCALANTE

Asesoría en los procedimientos metodológicos

LUGAR DE REALIZACIÓN DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Laboratorio de Inmunología de Hongos

Departamento de Microbiología y Parasitología

Facultad de Medicina, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Maria Lucia Taylor

A la M. en C. Esperanza Duarte Escalante

A la Dra. Catalina Beatriz Chávez Tapia

Proyecto financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal

Académico (DGAPA), UNAM, clave: IN207801

A MIS PADRES

Mamá: Por ser una mujer admirable, por tu paciencia y esfuerzo para escucharme y alentarme siempre, gracias por tu apoyo incondicional para poder cumplir esta meta.

Papá: Por forjar ese carácter en mí enseñándome que las cosas no son fáciles y que hay que luchar mucho para lograrlas. Por ser ese hombre honesto y respetable y sobre todo por ser mi padre.

A MIS HERMANOS

Cesar: Por ser un soporte y un ejemplo para mí y enseñarme siempre el camino a seguir por que se que siempre estarás apoyándome en todo lo que emprenda y siempre estaré orgullosa de ti.

Miguel Ángel: Por tu apoyo y tus palabras de aliento en los momentos difíciles, por cuidarme siempre y demostrarme con tu ejemplo que todo se puede lograr.

A Consuelo y Miguelito

Por estar a mi lado compartiendo triunfos y fracasos y siempre encontrar las palabras necesarias para animarme.

A miguelito: Por ser una luz que ilumino mi vida y siempre darme una sonrisa inocente y amorosa.

A Hortencia: Por ser la hermana que nunca tuve y brindarme todo tu cariño.

A mis compañeros de Laboratorio por su solidaridad y apoyo incondicional.

A Esperanza y Gabriela por su amistad sincera y enseñanzas.

A todas la personas que me han brindado una oportunidad personal o profesional y me han facilitado de una manera u otra cada uno de los pasos a seguir en esta tesis. Gracias.

A mis amigos por hacer que esta etapa fuera inolvidable: Ana, Aurora, Arturo, Brenda, Carlos, Cesar, Daniela, Erica, Gabriela. P, Gabriela. J, Gustavo, Heidi, Israel, Israel. S, Jorge Angel, José Luis. O, José Luis.G, Juan Carlos, Nancy, Luis Arturo, Marisol, Omar, Sonia, Samuel, Tania.

ÍNDICE

IZT.

RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS GENERALES	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Cepas fúngicas	21
Animales	21
Células	22

Obtención de inóculos de las cepas fúngicas	22
Tratamiento de levaduras con carbohidratos	23
Ensayos de adherencia de levaduras a células de murciélagos y de ratones	23
Ensayos de inhibición de adherencia de levaduras a células de murciélagos y de ratones, utilizando levaduras tratadas con carbohidratos	24
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	26
Adherencia de levaduras a células de murciélagos y de ratones	26
Inhibición de adherencia de levaduras a células de murciélagos y de ratones, utilizando levaduras tratadas con carbohidratos	27
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS	40

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1.** Adherencia de levaduras de *Histoplasma capsulatum* a células de pulmón, bazo e hígado de murciélago. 46
- Figura 2.** Adherencia de levaduras de *Candida albicans* a células de pulmón, bazo e hígado de murciélago. 47
- Figura 3.** Adherencia de levaduras de *Histoplasma capsulatum* a células de pulmón, bazo e hígado de ratón. 48
- Figura 4.** Adherencia de levaduras de *Candida albicans* a células de pulmón, bazo e hígado de ratón. 49
- Figura 5.** Análisis comparativo de la inhibición de la interacción entre todas las células de los diferentes órganos estudiados de murciélagos y levaduras tratadas con carbohidratos. 50
- Figura 6.** Análisis comparativo de la inhibición de la interacción entre todas las células de los diferentes órganos estudiados de ratones y levaduras tratadas con carbohidratos. 51
- Figura 7.** Análisis comparativo de la inhibición de la interacción entre el conjunto de células de pulmón, bazo o hígado procedente de los diferentes murciélagos

estudiados, y levaduras tratadas con carbohidratos. 52

Figura 8. Análisis comparativo de la inhibición de la interacción entre el conjunto de células de pulmón, bazo o hígado procedente de los diferentes ratones estudiados, y levaduras tratadas con carbohidratos. 53

Tabla 1. Resultados de la inhibición de adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos, a células de pulmón de murciélagos. 54

Tabla 2. Resultados de la inhibición de adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos, a células de bazo de murciélagos. 55

Tabla 3. Resultados de la inhibición de adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos, a células de hígado de murciélagos. 56

Tabla 4. Resultados de la inhibición de adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos, a células de pulmón de ratones. 57

Tabla 5. Resultados de la inhibición de adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos, a células de bazo de ratones. 58

Tabla 6. Resultados de la inhibición de adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos, a células de hígado de ratones. 59

RESUMEN

La información sobre la interacción del hongo *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (*Hc*) con murciélagos es escasa. Se sabe que éstos pueden infectarse con *Hc* como lo demuestra la histopatología de órganos de murciélagos naturalmente infectados y los aislamientos de *Hc* de diferentes tejidos de estos mamíferos, sin embargo, se desconocen los mecanismos involucrados en esta interacción. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la capacidad de adherencia de levaduras de *Hc* a células hospederas (posibles fagocitos profesionales) de pulmón, bazo e hígado de murciélago, y además identificar si en esta interacción participa un mecanismo de reconocimiento mediado por carbohidratos, como ha sido descrito por otros investigadores en el modelo murino. Para este estudio se emplearon dos distintas cepas de *Hc*, una (EH-53) aislada de un paciente infectado en cueva y otra (EH-375) aislada de un murciélago infectado, además de una cepa testigo de *Candida albicans* (*Ca*), utilizada como microorganismo comparativo por su conocida capacidad de adherirse a varios sistemas biológicos. Para el estudio de la interacción hongo:célula, se utilizaron ensayos de adherencia de levaduras tanto de *Hc* como *Ca* a células de murciélagos y de ratones (testigos), a través de un método de ELISA modificado para células, descrito por otros autores. Inicialmente, se probó la adherencia de levaduras de *Hc* a células adherentes de pulmón, bazo e hígado a tres diferentes relaciones (1:10, 1:25 y 1:50) de levaduras:células hospederas. Los resultados destacaron una mayor adherencia de levaduras de las dos cepas de *Hc* que la de *Ca*, dada por los altos valores de densidad óptica (DO) detectados por ELISA. La relación de 1:50 reveló una mejor interacción entre la cepa EH-53 y células de pulmón, hígado y bazo de murciélagos o bien células de pulmón, bazo e hígado de ratones. Para determinar la mediación de carbohidratos en la adherencia de *Hc* a células de murciélagos, se utilizaron ensayos de inhibición de adherencia de levaduras a células de pulmón, bazo e hígado, los cuales también fueron revelados por ELISA, realizando el tratamiento de las levaduras con diferentes azúcares previo a los ensayos de adherencia. Las levaduras de la cepa EH-53 tratadas con β -Gal a la concentración 1.5 mM mostraron valores superiores al 100 % de inhibición de adherencia a células de pulmón, bazo e hígado de murciélagos. Mientras que las levaduras de *Ca* fueron preferentemente inhibidas por Man y α -Metil-Man en su adherencia a células de pulmón, bazo e hígado de murciélagos. En el modelo murino se registraron resultados similares. Lo anterior sugiere una interacción de *Hc* con moléculas glicosiladas que están presentes en la superficie de cada población celular estudiada (pulmón, bazo e hígado) capaces de mediar la interacción con componentes tipo lectina presentes en la superficie de levaduras del hongo. Este estudio resulta importante para entender la interacción del hongo con distintas poblaciones de fagocitos profesionales de murciélago e identificar uno de los posibles mecanismos de reconocimiento entre estas células hospederas y las células fúngicas.

INTRODUCCIÓN

Los quirópteros son uno de los grupos más diversos de mamíferos, habitan en todas las regiones del mundo a excepción del polo Antártico y comprenden una cuarta parte de las especies de mamíferos. Los quirópteros tienen cerca de 1000 especies de murciélagos, de las cuales aproximadamente 140 viven en nuestro país. Sin ellos, muchos ecosistemas se verían afectados de manera notable en su estructura, naturaleza y diversidad. Algunas especies son importantes en la regeneración de selvas otras son excelentes controladoras de plagas, un ejemplo destacable son los murciélagos de cola libre, que forman colonias de más de 20 millones de especímenes que en una sola noche pueden consumir cerca de 200 toneladas de insectos, lo que representa un control biológico que, entre otras cosas, beneficia enormemente a la agricultura (Medellín *et al.*, 1997).

En el pasado los murciélagos eran asociados a supersticiones y creencias sobrenaturales (Villa, 1966), sin embargo, desde principios de este siglo empezaron a ser considerados como animales útiles al hombre porque realizan funciones importantes para la vida silvestre. Entre las aportaciones de estos animales está la utilización de su guano como fertilizante para la agricultura, costumbre tradicional de campesinos por décadas.

Algunos factores ecológicos relacionados con los murciélagos, como su ciclo de vida y el tamaño de sus poblaciones, son difíciles de analizar. Asimismo, la destrucción directa del hábitat de muchos de sus especímenes está causando la extinción de varias especies en el mundo y la disminución de otras en forma alarmante. Sin embargo, en los mecanismos de control poblacional de los quirópteros, no se contempla el papel adverso de las infecciones naturales que pueden ser producidas por algunos parásitos, con evolución a una probable

enfermedad severa y desencadenando la muerte, lo que podría afectar la cantidad de individuos de las colonias. Entre las especies de murciélagos que se refugian en los ambientes cavernícolas, los riesgos de desarrollar enfermedad por la exposición a esporas del hongo patógeno *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, Darling 1906, puede conducir a una infección generalizada en hospederos susceptibles.

La enfermedad (histoplasmosis) ha sido observada en diferentes especies animales (Jensen *et al.*, 1998; Kunz, 1988; Rosas-Rosas *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 1999; 2000; Vargas-Yáñez *et al.*, 1998). En la naturaleza el agente fúngico se encuentra asociado generalmente a la acumulación de excretas de aves y de murciélagos, siendo Emmons (1958) el primer investigador que logró establecer la relación entre el murciélago, su hábitat y la histoplasmosis. Esta enfermedad, también denominada “histoplasmosis capsulati” está considerada como una micosis sistémica, de gran importancia en el continente Americano. Su historia comienza con los hallazgos histopatológicos realizados por Darling (1906) en un paciente que trabajaba en la construcción del canal de Panamá y en el cual se encontró, en el material de sus lesiones, un parásito de forma ovoide con 1-6 μ de diámetro, rodeado por un halo no coloreado. Debido al parecido con *Leishmania*, Darling pensó que se trataba de un protozoo y que el halo era una cápsula, razón por la cual denominó a la especie descrita “*capsulatum*”. En la naturaleza, el hongo crece en fase micelial (saprobio-geofílica) presentando macro y microconidios que junto a pequeños fragmentos de hifas son su forma infectiva. Al ser inhalados por un hospedero susceptible, los propágulos fúngicos cambian a la fase levaduriforme, parasitaria y virulenta. A temperaturas inferiores a 37 °C, el hongo crece en los medios de cultivo con aspecto filamentosos de color blanco o pardo claro a oscuro propio de su fase micelial, mientras que a 37 °C, tanto en cultivos *in vitro* como en los tejidos

del hospedero, *H. capsulatum* crece como levadura aislada o unigemente. Este patógeno es un parásito intracelular facultativo con preferencia para fagocitos profesionales.

El hongo se encuentra principalmente en regiones tropicales y subtropicales de los diferentes continentes con una temperatura media anual de 22-29 °C, una humedad relativa de 67-87 % y con un promedio de precipitación anual de 1000 mm; se desarrolla en suelos con alto contenido de nitrógeno y fosfato (guano de aves y murciélagos) que aunado a las condiciones previas favorecen su proliferación (Aguirre-Pequeño, 1959; Emmons, 1949; González-Ochoa, 1963; Kwon-Chung y Bennett, 1992; Taylor *et al.*, 1994; 1999). Los brotes de “histoplasmosis capsulati” (forma epidémica) se originan por la exposición de un grupo de personas a una fuente común. La enfermedad endémica es de amplia distribución en el mundo y las áreas más importantes se localizan en el centro de los Estados Unidos de América, donde el 80-90 % de la población suele ser positiva a la prueba intradérmica con el antígeno fúngico específico denominado histoplasmina, otras áreas endémicas importantes se localizan en países de América Latina y el Caribe.

La infección no se transmite de persona a persona y como se adquiere por la inhalación de los conidios, el foco primario generalmente es pulmonar. La histoplasmosis presenta formas clínicas diversas, que varían de benignas a severas, en ocasiones en las formas severas el paciente puede desarrollar hepato y esplenomegalia. La forma más frecuente en México, generalmente asociada a epidemias es la Histoplasmosis Pulmonar Primaria, que afecta principalmente adultos y tiene la más alta tasa de letalidad en el mundo. En México, los casos más conocidos han sido reportados en personas que por una u otra razón han incursionado en sitios o espacios cerrados, donde el hongo está presente en aerosoles en altas concentraciones. y/o temporales, y representan un riesgo para la salud de todos aquellos individuos que entran o trabajan en ellos. Por lo que, espeleólogos, biólogos, geólogos, arqueólogos, antropólogos, y

particularmente trabajadores rurales, como mineros, limpiadores de minas, colectores de guano, representan la población profesional de alto riesgo, susceptible a infectarse (Taylor, *et al.* 1996; 1997; 2000).

La especie taxonómica *H. capsulatum* var. *duboisii* se distribuye en algunos lugares del Mediterráneo y África donde ha sido descrita en humanos la llamada “histoplasmosis africana” que se parece a la “histoplasmosis capsulati” con una diferencia marcada de su tropismo a piel y a hueso, y comparte con la var. *capsulatum* similitudes fenotípicas y genotípicas, incluyendo la capacidad de infectar a murciélagos y crecer en su guano (Kwon-Chung y Bennett, 1992).

Existen datos en la literatura que sugieren que algunos murciélagos pueden actuar como portadores del parásito cursando infección y/o enfermedad. Desde que Disalvo *et al.* (1969) realizaron un amplio estudio, con el objeto de determinar un posible foco de histoplasmosis, se aceptó el papel del murciélago como portador del parásito de modo más contundente, al aislar el hongo de 15 ejemplares de un total de 555 y referir valores altos de aislamiento fúngico en órganos internos como pulmón (48 %), bazo (42 %) e hígado (10 %), lo que sugería una posible infección diseminada. A partir de este estudio, la descripción de la infección natural en murciélagos ha sido reportada paulatinamente (Fernández-Andreu, 1988; Kunz, 1988; Peña-Sandoval *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 1994; 1999). Sin embargo, aún en la actualidad, se desconoce con precisión el curso clínico de la infección y la prognosis de la enfermedad en los murciélagos, aunque en el ámbito experimental se ha registrado en estos animales los signos asociados a la enfermedad en murino (pérdida de peso, segregación y pelo hirsuto) a pesar de que los parámetros histológicos revelan que los murciélagos tienen la habilidad para resolver más eficientemente la infección y la enfermedad que el modelo comparativo murino (Taylor *et al.*, 1999; 2001). También se ha visto que los niveles de

infección en el murciélago varían con las condiciones físicas del hábitat que exponen a estos animales a un mayor o menor riesgo de cursar enfermedad, posiblemente asociado a la dosis infectiva de propágulos del hongo, que se encuentran dispersados en el ambiente cavernícola (Taylor *et al.*, 1999; 2001). Por tal motivo, queda aún abierta a discusión la posibilidad de determinar como influye este patógeno fúngico en la densidad poblacional de especímenes residentes en refugios altamente contaminados.

Las características de reconocimiento entre las levaduras de *H. capsulatum* y las células hospederas, han sido estudiadas de modo preferencial tanto en el humano como en ratones. A la fecha, no habían sido abordadas en el murciélago. Existen diferentes sistemas de reconocimiento de levaduras de *H. capsulatum* por fagocitos profesionales (macrófagos, polimorfonucleares, células dendríticas) y no profesionales (células epiteliales, fibroblastos).

Los reconocimientos mediados por opsoninas (IgG, C3bi) prevalecen en los fagocitos profesionales (macrófagos) que disparan señales asociados a varios eventos citocidas para las células fúngicas. Sin embargo, es posible que el hongo utilice también un reconocimiento no opsónico que involucra señales críticas que no intervienen en los mecanismos citocidas de la célula hospedera (tanto fagocitos profesionales como no profesionales) y permiten el escape y permanencia del patógeno en forma de infección latente intracelular.

Uno de los mecanismos no opsónicos descritos para *H. capsulatum* es el mediado por integrinas de la familia $\beta 2$, CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18 (Bullock y Wright, 1987; Newman *et al.*, 1990); otro involucra lectinas que son proteínas capaces de unir a carbohidratos (Taylor *et al.*, 1998; Duarte-Escalante *et al.*, 2003). Esta lectinointeracción ha sido inicialmente observada en eritrocitos de bovinos (Jiménez-Lucho *et al.*, 1990) y no se descarta su participación en células humanas. Taylor *et al.* (1998) han descrito la existencia de

componentes del hongo capaces de reconocer residuos terminales D-galactosil en la superficie de macrófagos peritoneales murinos y la participación de β -galactosa, como ligando específico para la molécula tipo lectina presente en levaduras de *H. capsulatum*, ha sido sistemáticamente demostrada a través de ensayos de inhibición de adherencia, utilizando el tratamiento de levaduras con diferentes carbohidratos (Duarte-Escalante *et al.*, 2003). Asimismo, se ha reportado la adherencia de estas levaduras a eritrocitos humanos de los grupos sanguíneos ABO (Taylor *et al.*, 2003). Estos hallazgos sugieren la presencia de un componente tipo lectina en la superficie de levaduras de *H. capsulatum*, evento poco documentado en la mayoría de los hongos patógenos.

JUSTIFICACIÓN

Considerando la presencia del parásito fúngico *H. capsulatum* en órganos internos de murciélagos, asociados probablemente a mecanismos de diseminación mediados por interacciones con diferentes células de este hospedero mamífero, el estudiar un posible reconocimiento entre células de murciélago y levaduras de este hongo permitiría entender aspectos claves del proceso infeccioso en estos animales y explicar el destino final del parásito en hospederos silvestres que cohabitan ambientes cavernícolas por varias generaciones.

Considerando además: 1- que *H. capsulatum* produce una infección intracelular con predilección por fagocitos profesionales y que puede utilizar un posible reconocimiento, mediado por lectinas, al interactuar con moléculas glicosiladas en la superficie de la célula hospedera; 2- que las interacciones lectina-carbohidrato han sido demostradas en un gran número de procesos biológicos y en particular en la adhesión de agentes infecciosos a células del hospedero; 3- que las interacciones no opsonicas ni siempre conducen a un evento citocida que conlleva a la destrucción del parásito; 4- y que la presencia o sobrevida de *H. capsulatum* en el ambiente compartido con murciélagos debe haber facilitado mecanismos de interacción entre ambos tipos de células (célula parásito/célula hospedera); es importante dirigir nuestra atención al estudio de la interacción entre las levaduras del hongo que constituyen la fase virulenta y parasitaria de éste y células de murciélagos asociadas al sistema fagocítico mononuclear (posibles células permisivas para el parásito), con el fin de entender el curso de la infección y enfermedad en estos mamíferos silvestres que pueden jugar un papel de reservorio y diseminador del hongo en la naturaleza.

HIPÓTESIS

- Las levaduras del hongo *H. capsulatum* se adhieren a fagocitos profesionales de murciélagos de la especie *Artibeus hirsutus* por un mecanismo de reconocimiento mediado por azúcares.

IZT.

OBJETIVOS GENERALES



- Demostrar la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a células (posibles fagocitos profesionales) de pulmón, bazo e hígado de murciélago, a través de ensayos de ELISA modificado para células.
- Comparar la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a células de pulmón, bazo e hígado de murciélago con la adherencia a las mismas células de ratones (testigo), a través de ensayos de ELISA modificado para células.
- Comparar la adherencia de levaduras del testigo *Candida albicans* a células de pulmón, bazo e hígado de murciélago y de ratón, a través de ensayos de ELISA modificado para células

OBJETIVOS PARTICULARES

- Valorar la capacidad de adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a posibles fagocitos profesionales de pulmón, bazo e hígado de murciélago y ratón, a través de ensayos de

ELISA modificado para células.

- Valorar la capacidad de adherencia de levaduras de *C. albicans* a posibles fagocitos profesionales de pulmón, bazo e hígado de murciélago y ratón, a través de ensayos de ELISA modificado para células.
- Detectar la participación de residuos galactosilados de las moléculas de la superficie de las células (pulmón, bazo e hígado) de los hospederos murciélago y ratón en la adherencia de levaduras de *H. capsulatum*, a través de ensayos de inhibición de adherencia valorados por el método de ELISA modificado para células.
- Detectar la participación de residuos galactosilados de las moléculas de la superficie de las células (pulmón, bazo e hígado) de los hospederos murciélago y ratón en la adherencia de levaduras de *C. albicans*, a través de ensayos de inhibición de adherencia valorados por el método de ELISA modificado para células.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas fúngicas

Se emplearon dos cepas del hongo *Histoplasma capsulatum* de la “Colección de Cepas de *Histoplasma capsulatum*” del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina-UNAM. La cepa EH-53 fue aislada de un paciente infectado en una cueva de Hidalgo y la cepa EH-375 fue aislada de un murciélago naturalmente infectado, capturado al azar en la cueva “El Salitre”, Morelos. Como testigo de adherencia se empleó *Candida albicans* por presentar varios sistemas de reconocimiento para diferentes células hospederas; se utilizó la cepa 15, donada al laboratorio por el Dr. Rubén López Martínez, jefe del Laboratorio de Micología Médica, del mismo departamento. La fase levaduriforme de cada cepa fue mantenida a 37 °C en caldo infusión-cerebro-corazón (BHI) (Bioxón, Becton Dickinson, 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* colectados en la cueva “El Salitre” ubicada en el ejido de Santa Rosa Treinta Municipio de Tlaltzapán, en el estado de Morelos. La captura de murciélagos se realizó al azar colocando una red de niebla en la entrada de la cueva. Una vez capturados los especímenes, éstos se depositaron en costales de tela y se trasladaron al laboratorio para su posterior manejo. Se utilizaron como testigos ratones machos singénicos BALB/c de 6-8 semanas de edad, procedentes del Bioterio de la Facultad de Medicina-UNAM y mantenidos con purina y agua acidificada *ad libitum*.

Células

Se utilizaron células adherentes de pulmón, bazo e hígado obtenidas de murciélagos y de ratones. Los procedimientos se realizaron bajo estrictas condiciones de esterilidad, separando las células a partir de los órganos obtenidos de los animales sacrificados por dislocación cervical. Brevemente, los órganos fueron colocados en cajas de Petri y posteriormente disgregados mecánicamente en amortiguador salino de fosfatos (PBS) 150 mM, pH 7.2. Después de 15 min de reposo, se decantó el sobrenadante conteniendo la suspensión celular y se depositó la suspensión en botellas de 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, D. F.), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 20 % de suero fetal bovino (Gibco). La suspensión celular fue incubada de 1-3 h a 37 °C con atmósfera húmeda y 5 % de CO₂. Las células adheridas después de 3 h fueron lavadas con DMEM y su número fue ajustado, antes de cada ensayo, utilizando azul de tripano para el conteo de células viables.

Obtención de inóculos de las cepas fúngicas

A partir de levaduras, de cada cepa, se realizaron precultivos en caldo-BHI y se transfirieron 2-3 ml a 10 ml del mismo medio fresco en tubos cónicos con rosca de 15 ml. Se incubaron a 37 °C durante 24 h para obtener el inóculo adecuado de cada cepa. Después de la incubación, se centrifugaron los tubos a 800 x g durante 15 min; se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron los botones de levaduras en 10 ml de medio DMEM (Gibco). Se repitió el procedimiento una vez más y de los botones finales de levaduras se

prepararon suspensiones en DMEM para su uso subsecuente.

Tratamiento de levaduras con carbohidratos

Los siguientes azúcares (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) fueron utilizados: α - o β -metil-D-galactosa (α - o β -Gal), D-manosa (Man) o α -metil-D-manosa (α -Metil-Man). Cada azúcar fue solubilizado en PBS 150 mM, pH 7.2, e incubado a 4° C durante 1 h con levaduras vivas de *H. capsulatum* o de *C. albicans*. Las levaduras tratadas con los carbohidratos fueron centrifugadas a 800 x g durante 20 min en PBS. Cada botón de levaduras, correspondiente a los diferentes azúcares en dos concentraciones distintas, 1.5 o 15 mM, fue cuantificado y ajustado en DMEM en las cantidades de trabajo descritas para cada ensayo.

Ensayos de adherencia de levaduras a células de murciélagos y de ratones

Se utilizó el método de ELISA modificado para células por Aramaky *et al.* (1993). Brevemente, se depositaron 4×10^5 células de cada una de las poblaciones adherentes de los diferentes órganos de murciélagos o de ratones a ser probadas, en cada pozo de placas de cultivo de 96 pozos (Nunc) en presencia de DMEM y se incubaron las placas a 37 °C con atmósfera húmeda y 5 % de CO₂, durante toda la noche. Al día siguiente, se decantó el medio de cada placa y se agregaron 2×10^6 , 8×10^6 o 2×10^7 levaduras de una de las dos cepas de *H. capsulatum* por serie de tres pozos, suspendidas en medio fresco DMEM. Se permitió la adherencia de las levaduras durante 1 h a 4 °C. Transcurrido el tiempo de adherencia, se lavaron los pozos para eliminar las levaduras no adheridas y se agregaron 100 μ l/pozo PBS-Tween-20 (0.05 %) con albúmina sérica bovina (0.5 %). Posteriormente, se lavó cada placa

con PBS-Tween-20 (PBST) y se adicionaron 100 μ l/pozo de suero inmune de conejo anti-*Histoplasma* o suero normal de conejo como testigo negativo. Se incubó cada placa durante 1 h a 4 °C, se lavó con PBST y enseguida se agregaron 100 μ l/pozo del conjugado biotinilado anti-IgG de conejo obtenido en cabra (Sigma) y se incubó durante 1 h a 4 °C. Posteriormente, se lavó cada placa con PBST, se agregaron 100 μ l/pozo de estreptavidina/peroxidasa (Sigma) y se incubó 1 h a 4 °C. Enseguida, se lavó con PBST y se adicionaron 100 μ l de la solución de sustrato, o-fenilendiamina (Sigma), preparada en una concentración de 40 mg en 100 ml de amortiguador de citrato-fosfato, 0.05 M, pH 5.0, adicionado de 40 μ l de peróxido de hidrógeno al 30 %. Se incubó cada placa en condiciones de oscuridad, a temperatura ambiente por 20 min. La reacción enzima-sustrato fue detenida con la adición 50 μ l de ácido sulfúrico 2.5 M, a cada pozo de las placas, y los valores de Densidad Óptica (DO) fueron leídos a 492 nm en un aparato Multiskan MS Labsystems (Helsinki, Finlandia). Se realizaron ensayos simultáneos en las mismas condiciones con levaduras testigo de la cepa 15 de *C. albicans*, utilizando para su sistema en ELISA suero inmune de conejo anti-*Candida*. Para ajustar los resultados específicos con suero inmune anti-*H. capsulatum* o anti-*Candida*, los valores de DO de cada pozo fueron corregidos con los obtenidos de los pozos revelados con suero normal.

Ensayos de inhibición de adherencia de levaduras a células de murciélagos y de ratones, utilizando levaduras tratadas con carbohidratos

Se utilizó el mismo procedimiento descrito en los ensayos de adherencia de levaduras a células de murciélagos y de ratones, con la única variante de que previo a la adición de levaduras de una de las dos cepas de *H. capsulatum*, éstas fueron tratadas con α -galactosa, β -galactosa, manosa o α -metil-manosa, a 15 y 1.5 mM. La interacción fue revelada como se

describió anteriormente, utilizando el método de ELISA modificado para células por Aramaky *et al.* (1993). Se realizaron ensayos simultáneos en las mismas condiciones con levaduras de la cepa 15 de *C. albicans* como testigo de microorganismos con capacidad de reconocer manosa en lugar de galactosa, como azúcar de unión a la molécula tipo lectina de su superficie (Calderone, 1993).

Los datos de las levaduras no tratadas con carbohidratos fueron considerados como testigo de 100 % de adherencia (cero porcentaje de inhibición), los cuales sirvieron para el cálculo del porcentaje de inhibición de adherencia (% IA) para cada ensayo con levaduras tratadas con carbohidratos. Los resultados se expresaron en porcentajes de inhibición de adherencia (% IA), calculados según la fórmula: $\% IA = [1 - (\text{DO de los pozos con levaduras tratadas con cada carbohidrato} / \text{DO de los pozos con levaduras no tratadas con carbohidratos})] \times 100$. Se consideró los valores de IA \geq al 75 %, como un límite arbitrario para estimar inhibiciones positivas.

Análisis estadístico

Los ensayos fueron evaluados por análisis de varianza simple y multifactorial ANOVA-MANOVA ($\alpha = 0.05$ y 0.001) (Statsoft, Inc. 1998; STATISTICA for Windows).

RESULTADOS

Adherencia de levaduras a células de murciélagos y de ratones

Con el objeto de encontrar una mejor interacción entre células levaduriformes del hongo y células del hospedero la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* o *C. albicans* a células adherentes de pulmón, bazo e hígado, tanto de murciélagos como de ratones, se probó con tres diferentes relaciones levaduras:células del hospedero (1:10, 1:25 y 1:50) (Figs. 1-4).

En la figura 1 se observa una mayor adherencia de levaduras de las cepas de *H. capsulatum* a células de pulmón de murciélagos en las tres relaciones utilizadas, destacando que la relación 1:50 mostró los valores más altos de adherencia. Asimismo, la adherencia en la relación 1:50 fue mayor para células de hígado que para las de bazo de murciélagos. En todos los ensayos de murciélagos con las tres relaciones de células probadas, la cepa EH-53 presentó mayor capacidad de adherirse que la EH-375 (Fig. 1).

La figura 2 muestra que la adherencia de levaduras de *C. albicans* a células de pulmón de murciélagos, en las tres relaciones utilizadas, presentó siempre valores más bajos que los obtenidos para levaduras de *H. capsulatum*. De igual modo que los resultados de la figura 1, la adherencia en la relación 1:50 fue mayor tanto para células de pulmón como para las de hígado y de bazo de murciélagos.

En la figura 3 se observa, al igual que en la 1, una preferencia de levaduras de las cepas de *H. capsulatum* para adherirse a células de pulmón de ratones en las tres relaciones utilizadas, destacando de nuevo que la relación 1:50 esta asociada a los valores más altos de adherencia. Sin embargo, en las tres relaciones probadas, después del pulmón las células de bazo de ratón adhirieron más levaduras que las de hígado. También en células de ratón, con las tres relaciones probadas, la cepa EH-53 de *H. capsulatum* se adhirió mejor que la EH-375

(Fig. 3).

En la figura 4 se muestra, al igual que en la 2, que la adherencia de levaduras de *C. albicans* a células de pulmón de ratones, en las tres relaciones utilizadas, presentó siempre valores más bajos que los obtenidos para levaduras de *H. capsulatum*. En orden de preferencia, la adherencia de *C. albicans* a células de ratón fue mayor para las de pulmón seguidas por las de bazo y finalmente las de hígado.

Inhibición de adherencia de levaduras a células de murciélagos y de ratones, utilizando levaduras tratadas con carbohidratos

En los ensayos de inhibición de adherencia (IA) de levaduras a células de murciélagos (Tablas 1-3) y de ratones (Tablas 4-6), se trataron éstas con cuatro diferentes monosacáridos a dos distintas concentraciones, previo a la realización de la adherencia a monocapas de células de pulmón, bazo e hígado de cada animal utilizado.

En las tablas 1-3 se registran los resultados de tres ensayos de inhibición de adherencia de levaduras de *H. capsulatum* o de *C. albicans* a células de pulmón, bazo e hígado de murciélagos.

La cepa EH-53 desarrolló con β -Gal porcentajes superiores al 100 % de IA en los tres experimentos, con valores en un rango de 103.27 a 127.95 % para células de pulmón (Tabla 1), de 99.43 a 127.55 % en células de bazo (Tabla 2) y de 103.04 a 152.48 % para células de hígado (Tabla 3). La cepa EH-375 presentó con β -Gal, valores entre el 98.98 y el 109.26 % de IA (Tabla 1), del 99.79 al 114.74 % (Tabla 2) y del 98.13 al 184.61 % (Tabla 3). En contraste, la cepa 15 de *C. albicans* desarrolló con β -Gal, valores inferiores al 75 % de IA en todos los ensayos con las diferentes células de murciélagos (Tablas 1-3).

Los valores obtenidos tanto para las levaduras de las dos cepas de *H. capsulatum* como para las de *C. albicans* tratadas con α -Gal no alcanzaron inhibiciones importantes, a excepción de dos ensayos con la concentración de 15 mM de α -Gal, uno con la cepa EH-375 de *H. capsulatum* que dio un valor de 96.93 % de IA (Tabla 2) y otro con la cepa 15 de *C. albicans* que registró un 93.10 % de IA (Tabla 1).

Por otro lado, con respecto a Man uno de tres ensayos con la cepa EH-53 registró el 76.55 % de IA en células de pulmón (Tabla 1), el 86.33 % en células de bazo (Tabla 2), y en dos ensayos con células de hígado se registraron valores de 91.91, 100.44 y 108.96 % de IA (Tabla 3). Para la cepa EH-375 uno de tres ensayos registró para Man el 82.18 % de IA en células de pulmón (Tabla 1), el 85.75 % en células de bazo (Tabla 2), así como 99.15 y 102.50 % a las concentraciones de 1.5 y 15 mM en células de hígado (Tabla 3). Mientras que para la cepa 15 de *C. albicans* los porcentajes de inhibición alcanzados en los tres experimentos evidenciaron valores muy altos en un rango de 101.02 a 121.56 % para células de pulmón (Tabla 1), de 101.36 a 128.44 % para células de bazo (Tabla 2) y de 102.46 a 151.48 % de IA para células de hígado (Tabla 3).

Finalmente, en lo que se refiere a las levaduras tratadas con α -Metil-Man en ambas concentraciones y probadas con las diferentes células de murciélagos, la cepa EH-53 registró valores importantes de IA en un único experimento con células de bazo, 84.96 % a 15 mM y 89.49 % a 1.5 mM (Tabla 2), así como en dos ensayos con células de hígado, 94.11 a 1.5 mM y 98.95-104.16 % de IA a 1.5-15 mM (Tabla 3). La cepa EH-375 sólo registró valores de inhibición en un ensayo con células de cada órgano utilizado, 77.45 % en pulmón (Tabla 1), 84.63 % en bazo (Tabla 2) y 98.13 o 102.50 % de IA en hígado a las concentraciones de 1.5 o 15 mM, respectivamente (Tabla 3). Nuevamente, para la cepa 15 de *C. albicans* los

porcentajes de inhibición alcanzados en tres experimentos evidenciaron valores muy altos en un rango de 102.55 a 120.58 % para las células de pulmón (Tabla 1), de 102.94 a 131.03 % para las de bazo (Tabla 2) y 105.04 a 144.03 % de IA para las de hígado (Tabla 3).

Las tablas 4-6 muestran los resultados de dos ensayos de inhibición de adherencia de levaduras de *H. capsulatum* o de *C. albicans* a células de pulmón, bazo e hígado de ratones.

La cepa EH-53 registró en dos experimentos con β -Gal altos valores de IA, de 82.28 y 97.88 % para células de pulmón (Tabla 4), de 80.47 a 99.33 % en células de bazo (Tabla 5) y de 86.23 a 100 % para células de hígado (Tabla 6). Con respecto a la cepa EH-375 los valores de IA oscilaron fueron de 81.17 y 98.90 % (Tabla 4), de 77.67 a 97.46 % (Tabla 5) y de 75.03 a 100 % (Tabla 6). En contraste, para la cepa 15 de *C. albicans* los valores obtenidos fueron en su mayoría inferior al 75 % de IA (Tablas 4-6), con excepción de un ensayo en células de bazo con 78.86 % de IA (Tabla 5) y otro en células de hígado con 82.92 % de IA (Tabla 6).

Los resultados del porcentaje de inhibición de adherencia con las tres cepas de levaduras estudiadas tratadas con α -Gal no alcanzaron valores inhibitorios importantes, a excepción de dos ensayos con la cepa EH-53 utilizando la concentración de 15 mM, uno que desarrolló un 95.73 % de IA en células de bazo (Tabla 5) y el otro el 100 % de IA en células de hígado (Tabla 6); de un único ensayo con la cepa EH-375 con un IA de 79.46 % en células de bazo (Tabla 5); y de dos ensayos con la cepa de *C. albicans* que registraron un 79.94 % de IA para bazo (Tabla 5) y 76.49 % para hígado de ratón (Tabla 6).

Con respecto a los valores de inhibición con Man, la cepa EH-53 registró para dos ensayos en hígado de ratón, el 83.13 y el 87.19 % de IA (Tabla 6). La cepa EH-375 en un único ensayo en bazo registró para Man 78.61 % de IA (Tabla 5). Mientras que para la cepa 15

de *C. albicans*, los porcentajes de inhibición obtenidos en dos experimentos de cada órgano utilizado, alcanzaron valores altos de IA para células de pulmón con un 97.25 % de IA (Tabla 4), con 87.25 y 90.17 % de IA para células de bazo (Tabla 5) y de 96.91 a 100 % de IA en células de hígado (Tabla 6).

En cuanto al tratamiento de levaduras con α -Metil-Man en ambas concentraciones y probadas con las diferentes células de ratones, se encontró que la cepa EH-53 registró un único valor inhibitorio en células de hígado de 75.90 % de IA (Tabla 6). La cepa EH-375 también sólo registró un valor inhibitorio para células de bazo de 78.61 % de IA (Tabla 5). De nuevo, para la cepa 15 de *C. albicans* los porcentajes de inhibición alcanzados en dos experimentos fueron muy altos, registrándose el 96.64 % en células de pulmón (Tabla 4) y los rangos de 83.93 a 98.14 % de IA en células de bazo (Tabla 5) así como de 85.08 a 100 % en células de hígado (Tabla 6).

Al analizar en conjunto la interacción entre todas las células de los diferentes órganos de murciélagos con las cepas utilizadas y tratadas con los azúcares α -Gal, β -Gal, Man o α -Metil-Man, se comprobó que la mayor inhibición de la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* está asociada al β -anómero de Gal, al comparar los datos de todos los ensayos con células de murciélagos ($p < 0.01$) (Fig. 5). De igual modo, la interacción de las levaduras de *H. capsulatum* con todas las células de los diferentes órganos de ratones fue inhibida por β -Gal, al comparar los datos de todos los ensayos con células de ratón (Fig. 6). En contraste, la mayor inhibición de la adherencia de levaduras de *C. albicans* está asociada a Man y α -Metil-Man, al comparar los datos de todos los ensayos con células de murciélagos (Figs. 5 y 6).

Corroborando lo anterior, el análisis separado de la interacción de las células de todos los murciélagos procesados, discriminándolas por órganos (pulmón, bazo e hígado), con

las cepas fúngicas utilizadas, previo tratamiento con los azúcares antes mencionados, resalta de nuevo que el tratamiento de levaduras de *H. capsulatum* con β -Gal fue el que generó mayores porcentajes inhibición de adherencia en comparación con *C. albicans*, que prácticamente no fue inhibida por este azúcar ($p < 0.05$) (Fig. 7). En contraste, *C. albicans* alcanzó los mayores porcentajes de inhibición de adherencia con Man y α -Metil-Man, mientras que con *H. capsulatum* los valores de inhibición para Man y α -Metil-Man fueron siempre más bajos (Fig. 7). Asimismo, al realizar el análisis conjunto de la interacción de las células de todos los ratones procesados y al separarlas por órganos (pulmón, bazo e hígado), nuevamente por ANOVA-MANOVA destaca que el tratamiento de las cepas de *H. capsulatum* con β -Gal desarrolló los mayores porcentajes de inhibición de adherencia, en comparación con la cepa 15 de *C. albicans* (Fig. 8). En cambio, *C. albicans* alcanzó los mayores porcentajes de inhibición de adherencia con Man y α -Metil-Man, mientras que para las dos cepas de *H. capsulatum* los valores de inhibición con estos azúcares fueron siempre más bajos (Fig. 8).

Por ANOVA-MANOVA se pudo constatar la poca capacidad de α -Gal para inhibir el sistema de interacción células de murciélago:células fúngicas (Figs. 5 y 7) y células de ratón:células fúngicas (Figs. 6 y 8).

Finalmente, trasciende del análisis estadístico que los más altos valores de inhibición por β -Gal se asociaron al tratamiento de levaduras de *H. capsulatum* en los ensayos con células de hígado de murciélago, seguidos por pulmón y bazo; además de los ensayos con células de hígado de ratón, seguidos por bazo y pulmón.

DISCUSIÓN

La adherencia de levaduras de *H. capsulatum* a posibles fagocitos profesionales de pulmón, bazo e hígado de murciélagos es un hallazgo interesante que permite asociar el curso del proceso infeccioso, de probable evolución favorable en la mayoría de los especímenes infectados, aunque algunos desarrollen enfermedad leve o moderada. La distribución del hongo en la naturaleza y el posible papel de los murciélagos como reservorio de este parásito, hecho que se relaciona con el ciclo biológico del hongo al compartir con el murciélago desde hace cientos de años un hábitat en común, apoya una relación estrecha entre ambos organismos (hospedero:parásito) desarrollada en condiciones naturales. Aunque la información sobre la interacción de *H. capsulatum* con el hospedero murciélago es escasa, se sabe que éste puede infectarse con el hongo como lo demuestra la histopatología de órganos de murciélagos naturalmente infectados y los aislamientos de *H. capsulatum* de diferentes tejidos de estos mamíferos (Kunz, 1988; Taylor *et al.*, 1999). Además, la infección experimental de estos animales mantenidos en cautiverio ha revelado que estos mamíferos cursan el proceso infeccioso con signos propios de la enfermedad (Taylor *et al.*, 2001).

Para el presente trabajo, aunque se procesaron individualmente las células de cada animal, se consideró la necesidad de emplear especímenes con una alta homología genética. Por lo que se utilizaron murciélagos *A. hirsutus* de una colonia homogénea, residente en una cueva en Morelos y monitoreada por más de 8 años en el mismo hábitat, lo que garantiza un entrecruzamiento entre los miembros de la colonia y un grado aceptable de similitud genética. Por lo mismo, se utilizaron como testigo ratones de la cepa singénica BALB/c. Los órganos extraídos de los animales se eligieron con base en dos criterios: la implicación en la vía de

entrada respiratoria (pulmón) y la diseminación más frecuente del patógeno (bazo e hígado), además de la riqueza en células del sistema fagocítico mononuclear, considerando que *Histoplasma* es un parásito intracelular de este tipo de células.

Se desconocen los mecanismos involucrados en esta interacción hospedero:parásito, razón por la cual el presente estudio fue planteado con el fin de identificar los pasos iniciales de reconocimientos entre células del hospedero murciélago y células del parásito hongo. Para esto se realizaron ensayos de adherencia *in vitro* de levaduras de *H. capsulatum* o *C. albicans* (testigo) a monocapas de células de pulmón, bazo e hígado de murciélagos de la especie *A. hirsutus* (Figs. 1 y 2) y de ratones BALB/c (Figs. 3 y 4). Para estos ensayos se utilizaron un método de alta sensibilidad (ELISA), el cual había sido estandarizado previamente en el laboratorio según una modificación recomendada para el procesamiento de células adheridas a placas (Aramaky *et al.*, 1993). Aunque la alta sensibilidad del método crea posibles reacciones falso-positivas, la repetición de los resultados destaca que las levaduras de *H. capsulatum* se adhieren mejor a las monocapas de células de pulmón, lo que apoya la vía respiratoria como la puerta de entrada del parásito y compromete al pulmón como el primer órgano de choque de este proceso infeccioso (Figs. 1 y 3). Asimismo, las levaduras de *H. capsulatum* se adhirieron también a células de bazo e hígado, tanto de murciélagos como de ratones, lo que confirma además la habilidad de este parásito para interactuarse con órganos constitutivamente enriquecidos por células mononucleares (Figs. 1 y 3). Estos resultados no discrepan de los reportados por Suárez-Álvarez *et al.* (2002) con relación a la capacidad y cinética de adherencia *in situ* de levaduras de *H. capsulatum* a criocortes de pulmón, hígado y bazo de murciélagos y ratones.

Cabe destacar que la cepa EH-53 de *H. capsulatum*, que procede de un caso clínico de un paciente naturalmente infectado con guano de murciélago en una cueva de Hidalgo,

presentó una mayor interacción con las distintas células hospederas empleadas en comparación con la cepa EH-375, que es un aislamiento de un murciélago naturalmente infectado y capturado al azar en la cueva “El Salitre” ubicada en Morelos. También en el modelo murino se observó un comportamiento similar para ambas cepas de *H. capsulatum*. Una posible explicación para esto es el pase de la cepa EH-53 por un hospedero mamífero poco usual (humano) generando un posible cambio en la habilidad de interactuarse con hospederos naturales (murciélagos por ejemplo), los cuales han sido planteados como posibles reservorios del hongo. Aunque *C. albicans* fue utilizada como testigo, por su gran versatilidad en sistemas de interacción con células hospederas, destaca su menor capacidad que la de *H. capsulatum* para adherirse a células de murciélagos o de ratones. La posible explicación para este hallazgo puede deberse a la ubicación preferencial u oportunista de *C. albicans* en mucosas de vía oral, en intestino y en superficies de células de humanos, con raros eventos respiratorios y diseminaciones. Se trabajó con *C. albicans* con base en antecedentes de que esta levadura utiliza diferentes mecanismos de reconocimiento dependiendo del estirpe de la célula hospedera con la que interactúa, por ejemplo utiliza una lectina para unirse a residuos de manosa presentes en la superficie de células epiteliales hospederas, o bien, utiliza residuos expuestos de manosa en su pared celular para interactuar con un receptor tipo lectina o receptor manosa/fucosa (MFR) de fagocitos profesionales (Calderone, 1993).

Como se conocían datos previos que comprometían la mediación de carbohidratos en la interacción entre *H. capsulatum* y célula hospedera de murino (Duarte-Escalante *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2003) y humanas (Jiménez-Lucho *et al.*, 1990), se planteó en la presente investigación identificar si este mismo tipo de interacción se daba con células de murciélagos y para alcanzar este objetivo se realizaron ensayos de inhibición de adherencia de levaduras a las células de murciélagos y ratones anteriormente probadas.

Los resultados de los ensayos de inhibición de adherencia de levaduras a células de murciélagos destacan que para las dos cepas de *H. capsulatum*, los más altos porcentajes de inhibición se asociaron al tratamiento de sus levaduras con las dos concentraciones del anómero β de la galactosa (Tablas 1-3). Aunque, las levaduras de las dos cepas de *H. capsulatum* cuando fueron tratadas con Man o α -Metil-Man revelaron pocos valores de inhibición superiores al límite de 75 % en determinados ensayos con células de murciélagos (5 de 18 ensayos con la cepa EH-53 y 4 de 18 ensayos con la cepa EH-375, para ambos Man y α -Metil-Man), sistemáticamente los más altos valores de IA con estos monosacáridos se registraron en todos los ensayos con la cepa 15 de *C. albicans* (18 de 18 ensayos), confirmando la adecuada selección de esta especie fúngica como modelo comparativo de microorganismo capaz de mediar una interacción por reconocimiento a residuos del monosacárido manosa, como demostraron los resultados de las tablas 1-3.

Los resultados de dos ensayos de inhibición de adherencia de levaduras a células de pulmón, bazo e hígado de ratones, al igual que en murciélagos, también destacan altos porcentajes de IA relacionados al tratamiento de levaduras de las dos cepas de *H. capsulatum* con las dos concentraciones de β -Gal (Tablas 4-6), aunque los resultados en células de murciélagos fueron más evidentes que en ratones.

Con respecto a los valores de inhibición de adherencia de las levaduras de las dos cepas de *H. capsulatum* tratadas con Man o α -Metil-Man se observaron pocos valores inhibitorios superiores al 75 % en los ensayos con células de ratones (2 de 12 ensayos con la cepa EH-53 y 1 de 12 ensayos con la EH-375 para Man; además 1 de 12 ensayos con ambas cepas para α -Metil-Man), mientras que los valores más altos de IA para estos monosacáridos de nuevo se registraron en los ensayos con la cepa 15 de *C. albicans* (7 de 12 ensayos para

Man y α -Metil-Man) en los diferentes tipos de células de ratones ensayadas (Tablas 4-6).

Es pertinente referir que los ensayos de inhibición con azúcares utilizando células de hígado de murciélago mostraron un comportamiento distinto revelando inhibiciones importantes con Man y α -Metil-Man para las cepas de *H. capsulatum*, hallazgo que pudiera explicarse por poseer estas células posibles sistemas de interacción con otros carbohidratos. Hecho que amerita en un futuro cercano ensayos más meticulosos.

El efecto inhibitorio mediado por azúcares en la interacción de las levaduras estudiadas con todas las células en conjunto o con las diferentes células procedentes de distintos órganos de murciélagos o de ratones, puede ser mejor entendido por la representación de una serie de gráficas (Figs. 5-8) que integran un análisis de varianza simple y multifactorial de los datos experimentales obtenidos, a través del programa ANOVA-MANOVA.

Con base en los resultados reportados en el presente trabajo resalta la interacción entre células del hospedero murciélago y el parásito *H. capsulatum*. La importancia, la trascendencia y el impacto que este hallazgo pudiera tener en el problema de salud de poblaciones humanas expuestas al agente etiológico de la histoplasmosis, crea la necesidad de entender los mecanismos que modulan su interacción con diferentes células hospederas y sus respectivos microambientes celulares, lo que resulta fundamental para incidir en el destino intracelular del parásito. En los últimos años, se han descubierto mecanismos por los cuales diferentes 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 intracelular favorable. Posiblemente nuestros hallazgos ayudarían a entender la relación del hongo con células hospederas que han estado en contacto con este parásito por varias generaciones y además explicar la interacción más aceptable del hongo por hospederos que funcionan como

reservorios naturales. Finalmente, nuestros hallazgos abren la posibilidad de manejar futuras estrategias para determinar con precisión los mecanismos que pueden favorecer al hongo para establecerse en un hospedero natural y estudiar los cambios celulares que suceden después de la interacción entre el binomio hospedero:parásito.

CONCLUSIONES

- Los resultados de la presente investigación demuestran una interacción directa del hongo *H. capsulatum* con moléculas de superficie, que presentan residuos galactosilados, de posibles fagocitos profesionales de hospederos silvestres (murciélagos) y testigos experimentales (ratones).
- Las levaduras de *H. capsulatum* se adhirieron siempre en mayor número que las levaduras de *C. albicans* a las diferentes células (posibles fagocitos profesionales) de pulmón, bazo e hígado tanto de murciélagos como de ratones.
- En el pulmón se presentó siempre un mayor número de adherencia con levaduras de *H. capsulatum* en comparación con el bazo e hígado, lo que compromete a este órgano como la principal puerta de entrada del parásito al hospedero.
- En los ensayos de inhibición de adherencia de levaduras, previo tratamiento con diferentes azúcares, el anómero β -Gal fue el que mejor inhibió la adherencia de levaduras de *H. capsulatum* tanto a células de murciélagos como de ratones, en los diferentes órganos probados.
- Lo anterior apoya una posible interacción de *H. capsulatum* con moléculas glicosiladas que están presentes en la superficie de cada población celular estudiada, tanto de murciélagos como de ratones, y capaces de actuar como ligandos para los componentes tipo lectina presentes en las levaduras del hongo.

- Nuestros resultados permiten además, contar con un modelo de referencia en la interacción de las levaduras de *H. capsulatum* con distintas poblaciones de fagocitos profesionales, lo cual sería de gran utilidad para futuros ensayos con diferentes poblaciones de macrófagos de murciélago, ya que hasta el momento no existe tal información en este hospedero silvestre.

REFERENCIAS

Aguirre-Pequeño E. 1959. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del guano de murciélago en cuevas del noreste de México. Gac Med Mex 89:243-257.

Aramaky Y, M Murai, 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.

Bullock WE, SD 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 RA. 1993. Molecular interactions at the interface of *Candida albicans* and host cells. Arch Med Res 24:275-279.

Darling ST. 1906. A protozoan general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necroses in the liver, spleen and lymph nodes. JAMA 46:1283-1285.

Disalvo AF, L Allejo, JW Palmer, WG Winkler. 1969. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Arizona bats. Amer J Epidemiol 89:606-614.

Duarte-Escalante E, E Zenteno, ML Taylor. 2003. Interaction of *Histoplasma capsulatum* yeasts with galactosylated surface molecules of murine macrophages. Arch Med Res (Enviado a publicación).

Emmons CW. 1949. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. Pub Health Rep 64:892-896.

Emmons CW. 1958. Association of bats with histoplasmosis. Pub Health Rep 73:590-595.

Fernández-Andreu CM. 1988. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en murciélagos en Cuba. Rev Cubana Med Trop 40:36-43.

González-Ochoa A. 1963. Relaciones entre el hábitat del murciélago y el *Histoplasma capsulatum*. Rev Inst Salubr Enf Trop (Méx) 23:81-86.

Jensen DE, T Lipscomb, B Van Bonn, G Miller, JM Frandkin, SH Ridgway. 1998. Disseminated histoplasmosis in Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). J Zoo Wildlife Med 29:456-460.

Jíménez-Lucho V, V Ginsburg, HC 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.

Kunz TH. 1988. In: Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats. London: Smithsonian Institution Press, p. 515-518.

Kwon-Chung KJ, JE Bennett. 1992. In: Medical Mycology. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 464-513.

Medellín RA, HT Arita, OH Sánchez-Herrera. 1997. Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo. Publicación especial No 2. México D. F.: Asociación Mexicana de Mastozoología, A.C.

Newman SL, C Bucher, J Rhodes, WE 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.

Peña-Sandoval GR, CB Chávez-Tapia, G Rodríguez-Arellanes, MR Reyes-Montes, E Duarte-Escalante, ML Taylor. 2003. Primeros registros en México de aislamientos de *Histoplasma capsulatum* en *Desmodus rotundus* (murciélago no migratorio) y *Tadarida brasiliensis* (migratorio de larga distancia). Rev Mex Mic (Enviado a publicación).

Rosas-Rosas A, C Juan-Salles, G Rodríguez-Arellanes, ML Taylor, MM Garner. 2003. Disseminated *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* infection in a captive mara (*Dolichotis patagonum*). Vet Rec (Aceptado).

Suárez-Álvarez RO, ML Taylor, A Pérez, E Duarte-Escalante. 2002. Interacción de levaduras de *Histoplasma capsulatum* con diferentes células fagocíticas de murciélagos, a través de ensayos *in situ*. IV Congreso Latinoamericano de Micología. Xalapa, Veracruz, México 13-17 de mayo, 2002. Resumen pg. 476.

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

Taylor ML, E Duarte-Escalante, A Pérez, E Zenteno. 2003. *Histoplasma capsulatum* yeast-cells are able to attach and agglutinate human erythrocytes. Microbial Path (Enviado a publicación).

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

Taylor ML, J Granados, C Toriello. 1996. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico. Mycoses 39:375-379.

Taylor ML, GR Peña-Sandoval, A Pérez, CB Chávez-Tapia, E Duarte-Escalante, RO Suárez-Álvarez. 2001. Infección experimental con *Histoplasma capsulatum* en murciélagos capturados en la cueva del “Salitre”, Morelos, México. V Congreso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre en Amazonía y Latinoamérica. Cartagena de Indias, Colombia 10-14 de septiembre, 2001. Resumen 100 pg. 100-101.

Taylor ML, A Pérez-Mejía, JK Yamamoto-Furusho, J Granados. 1997. Immunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: Studies in the State of Guerrero, Mexico. *Mycopathologia* 138:137-141.

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

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

Vargas-Yáñez R, GR Peña-Sandoval, CB Chávez-Tapia, ML Taylor. 1998. Infección natural por *Histoplasma capsulatum* en animales silvestres. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 11:192-194.

Villa-R B. 1966. Los murciélagos de México. Su importancia en la economía y en la salubridad. Su clasificación sistemática. México D. F.: Universidad. Nacional Autónoma de México.

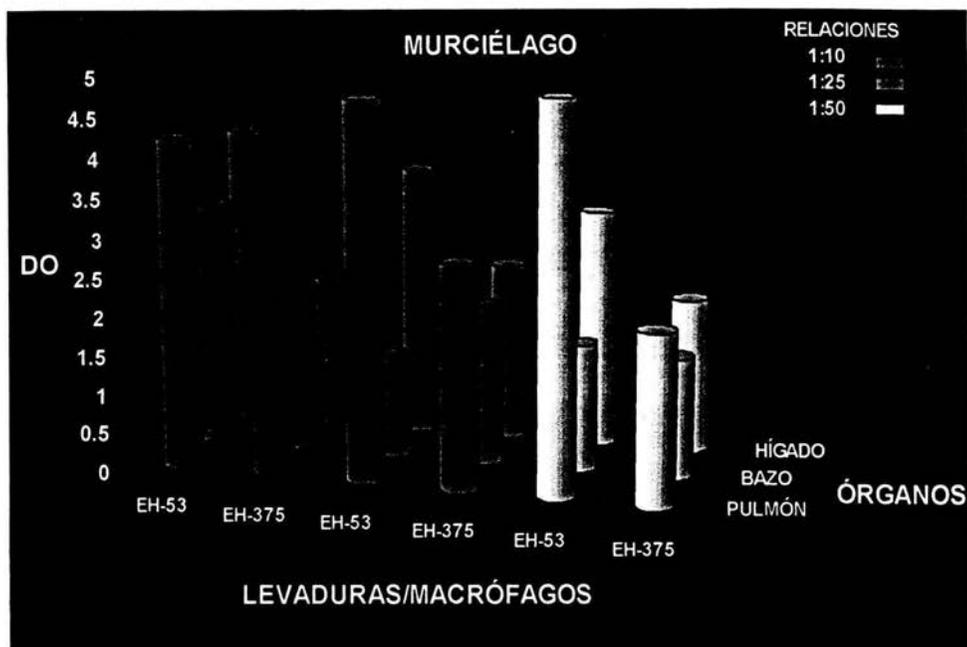


Figura 1. Adherencia de levaduras de *Histoplasma capsulatum* a células de pulmón, bazo e hígado de murciélago. Los ensayos se realizaron según lo referido en materiales y métodos. Los resultados expresan las lecturas corregidas con el suero normal y representan el promedio de tres animales procesados individualmente. Los valores graficados corresponden a tres diferentes relaciones, células adherentes de murciélagos:levaduras.

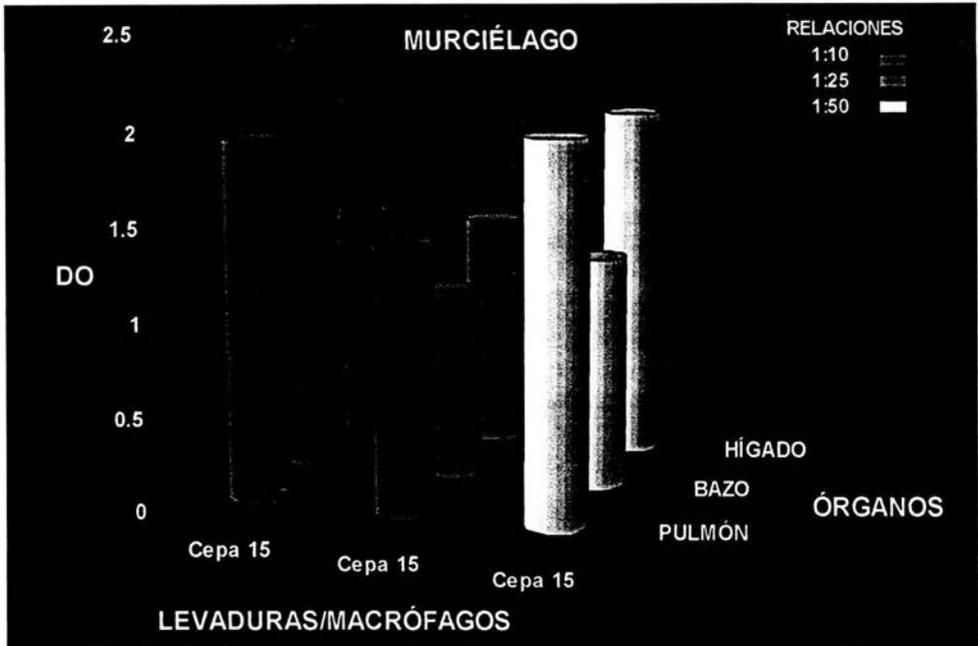


Figura 2. Adherencia de levaduras de *Candida albicans* a células de pulmón, bazo e hígado de murciélago. Los ensayos se realizaron siguiendo las indicaciones de materiales y métodos. Los resultados expresan las lecturas corregidas con el suero normal y representan el promedio de tres animales procesados individualmente. Los valores graficados corresponden a tres diferentes relaciones, células adherentes de murciélagos:levaduras.

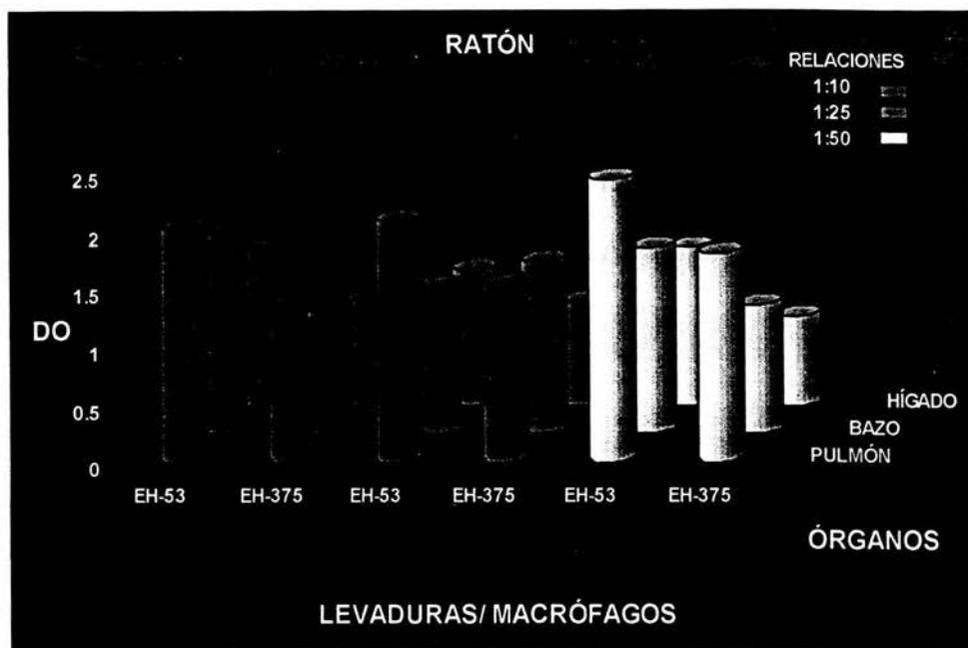


Figura 3. Adherencia de levaduras de *Histoplasma capsulatum* a células de pulmón, bazo e hígado de ratón. Los ensayos se realizaron según lo descrito en la figura 1, siguiendo las indicaciones de materiales y métodos. Los resultados expresan las lecturas corregidas con el suero normal y representan el promedio de dos animales procesados individualmente. Los valores graficados corresponden a tres diferentes relaciones, células adherentes de ratones:levaduras.

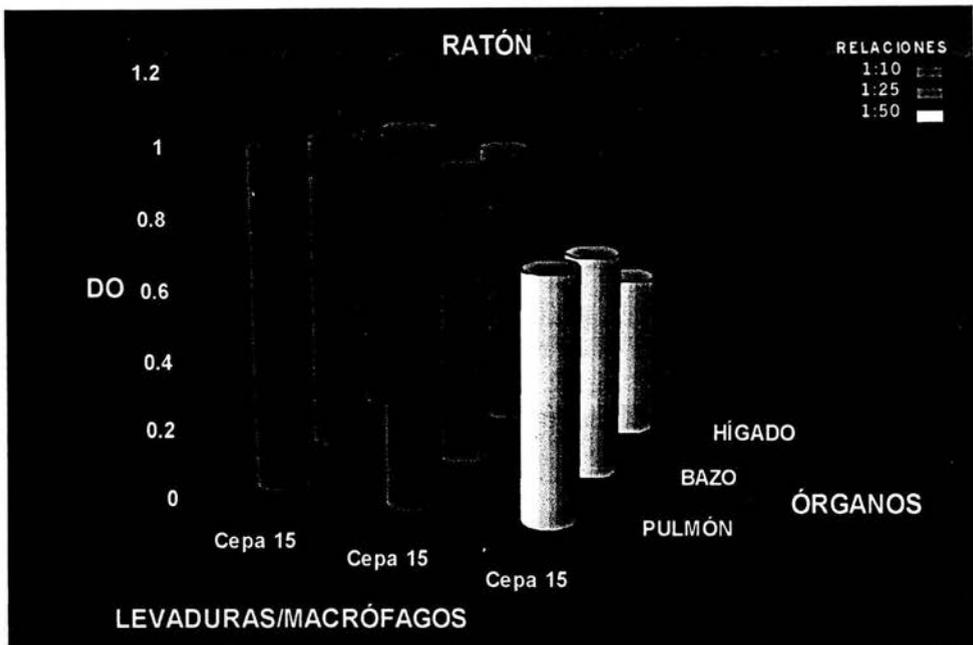


Figura 4. Adherencia de levaduras de *Candida albicans* a células de pulmón, bazo e hígado de ratón. Los ensayos se realizaron según lo descrito en la figura 2. Los resultados expresan las lecturas corregidas con el suero normal y representan el promedio de dos animales procesados individualmente. Los valores graficados corresponden a tres diferentes relaciones, células adherentes de ratones:levaduras.

IZT.



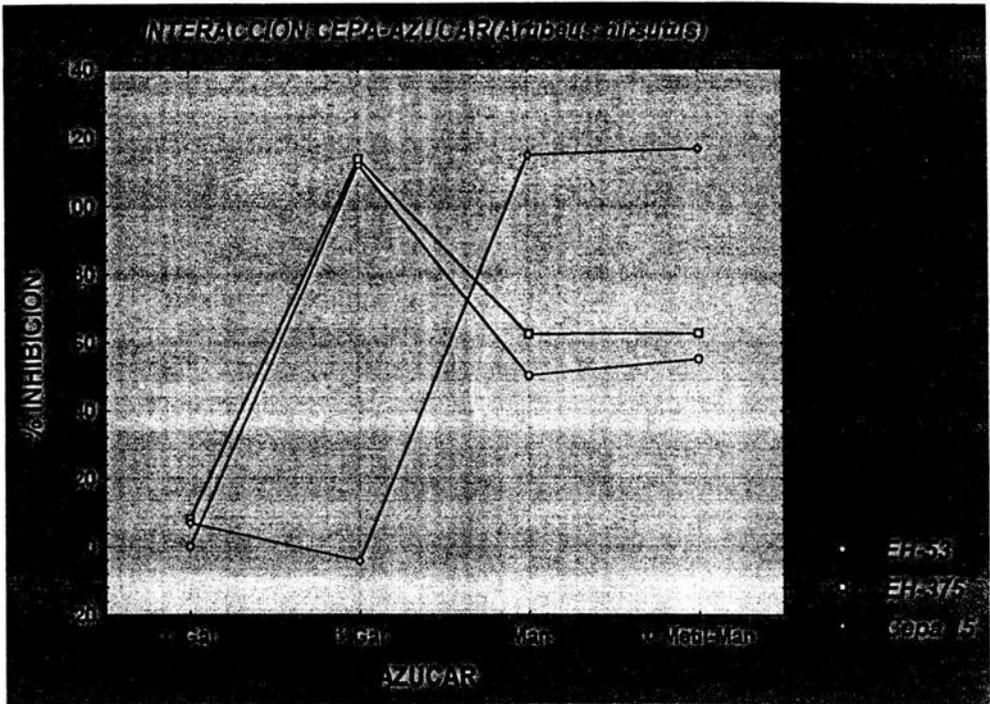


Figura 5. Análisis comparativo de la inhibición de la interacción entre todas las células de los diferentes órganos estudiados de murciélagos y levaduras tratadas con carbohidratos. Se consideraron para este análisis el conjunto de todos los datos referidos en las tablas 1-3. Se aplicó un análisis de varianza simple multifactorial, ANOVA-MANOVA, referida en materiales y métodos.

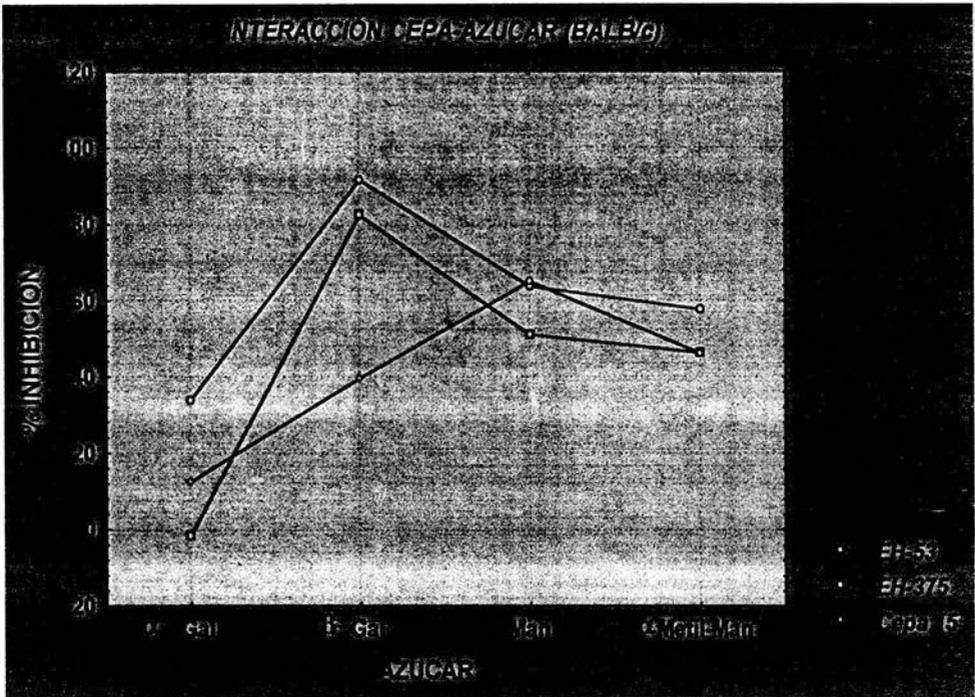


Figura 6. Análisis comparativo de la inhibición de la interacción entre todas las células de los diferentes órganos estudiados de ratones y levaduras tratadas con carbohidratos. Se consideraron para este análisis el conjunto de todos los datos referidos en las tablas 4-6. Se aplicó un análisis de varianza simple multifactorial, ANOVA-MANOVA, referida en materiales y métodos.

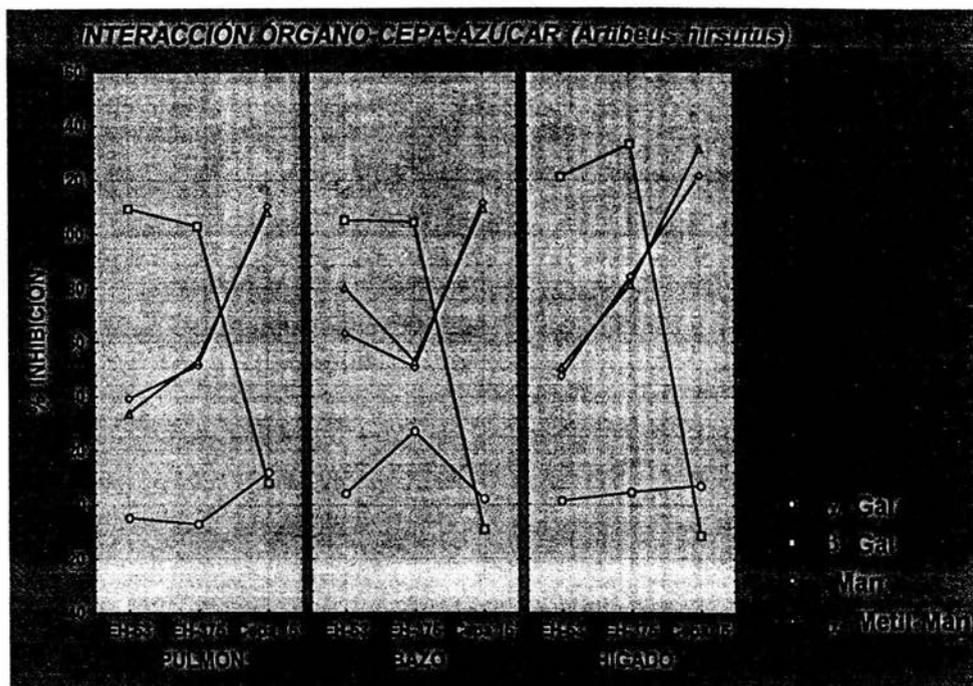


Figura 7. Análisis comparativo de la inhibición de la interacción entre el conjunto de células de pulmón, bazo o hígado procedente de los diferentes murciélagos estudiados, y levaduras tratadas con carbohidratos. Se consideraron para este análisis los datos referidos por separado en las tablas 1, 2 y 3. Se aplicó un análisis de varianza simple multifactorial, ANOVA-MANOVA, referida en materiales y métodos.

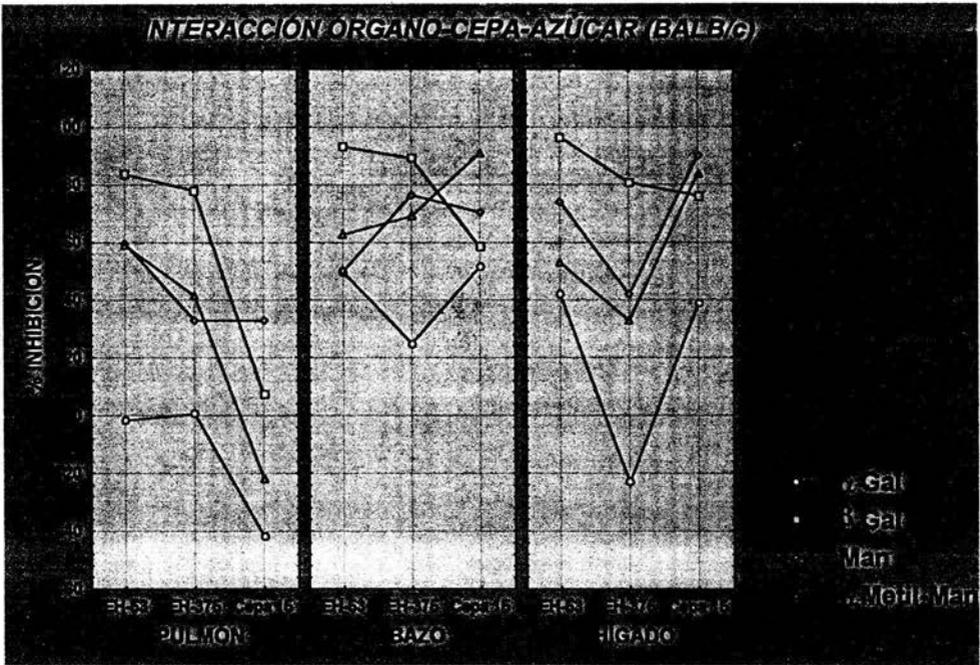


Figura 8. Análisis comparativo de la inhibición de la interacción entre el conjunto de células de pulmón, bazo o hígado procedente de los diferentes ratones estudiados, y levaduras tratadas con carbohidratos. Se consideraron para este análisis los datos referidos por separado en las tablas 4, 5 y 6. Se aplicó un análisis de varianza simple multifactorial, ANOVA-MANOVA, referida en materiales y métodos.

Tabla 1. Resultados de la inhibición de adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos, a células de pulmón de murciélagos

CEPA	AZÚCAR	[mM]	% IA		
			EXP. 1	EXP. 2	EXP. 3
<i>Hc EH-53</i>					
	α-Gal	1.5	-8.02	-32.68	2.46
		15	-14.90	25.69	-2.15
	β-Gal	1.5	107.01	103.27	109.87
		15	105.68	104.18	127.95
	Man	1.5	39.87	-10.65	38.83
		15	20.58	70.11	76.55
	α-Metil-Man	1.5	24.44	-3.27	24.19
		15	19.60	70.11	67.09
<i>Hc EH-375</i>					
	α-Gal	1.5	-1.04	-2.88	-2.53
		15	-3.09	-2.43	-2.20
	β-Gal	1.5	104.69	102.05	98.98
		15	99.81	109.26	104.21
	Man	1.5	55.71	37.44	33.67
		15	82.18	49.75	51.40
	α-Metil-Man	1.5	59.13	55.96	37.97
		15	77.45	45.36	45.18
<i>Ca cepa 15</i>					
	α-Gal	1.5	-14.70	ND	-9.03
		15	93.10	-7.90	-2.27
	β-Gal	1.5	-8.82	1.40	0.0
		15	-11.40	11.73	47.72
	Man	1.5	121.56	107.04	106.92
		15	105.83	101.02	120.45
	α-Metil-Man	1.5	120.58	101.97	115.96
		15	105.57	102.55	103.630

Para detectar la interacción de levaduras con células de murciélagos, se utilizó un método de ELISA de acuerdo con Aramaky *et al.* (1993). La adherencia de las levaduras se realizó a 4 °C para prevenir su internalización por las células adherentes del órgano utilizado. Para los cálculos de inhibición de adherencia (% IA) ver detalles en materiales y métodos. Se consideró los valores \geq al 75 %, como inhibiciones importantes. ND- No determinado; *Hc-Histoplasma capsulatum*; *Ca-Candida albicans*.

Tabla 2. Resultados de la inhibición de adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos, a células de bazo de murciélagos

CEPA	AZÚCAR	[mM]	% IA		
			EXP. 1	EXP. 2	EXP. 3
<i>Hc EH-53</i>					
	α-Gal	1.5	-0.15	-3.38	-7.87
		15	-1.84	35.89	1.68
	β-Gal	1.5	101.39	102.82	127.55
		15	100.37	100.85	99.43
	Man	1.5	ND	ND	ND
		15	86.33	ND	40.44
	α-Metil-Man	1.5	89.49	ND	ND
		15	84.96	61.53	86.23
<i>Hc EH-375</i>					
	α-Gal	1.5	2.70	-21.18	82.69
		15	1.41	96.93	-0.20
	β-Gal	1.5	100.90	100.49	114.74
		15	108.70	103.06	99.79
	Man	1.5	85.75	ND	ND
		15	68.62	20.40	29.23
	α-Metil-Man	1.5	84.53	ND	ND
		15	65.38	34.69	27.82
<i>Ca cepa 15</i>					
	α-Gal	1.5	ND	12.32	-0.20
		15	ND	-4.31	6.54
	β-Gal	1.5	-3.68	-22.60	-2.61
		15	-9.11	-18.96	2.54
	Man	1.5	105.99	101.36	114.65
		15	110.88	128.44	108.36
	α-Metil-Man	1.5	100.92	108.21	111.04
		15	102.94	131.03	104.0

Se siguieron las mismas indicaciones referidas en la tabla 1. ND- No determinado; *Hc*- *Histoplasma capsulatum*; *Ca*- *Candida albicans*.

Tabla 3. Resultados de la inhibición de adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos, a células de hígado de murciélagos

CEPA	AZÚCAR	[mM]	% IA		
			EXP. 1	EXP. 2	EXP. 3
<i>Hc</i> EH-53					
	α-Gal	1.5	-8.02	-2.20	-0.24
		15	7.04	8.99	0.48
	β-Gal	1.5	103.71	152.48	117.89
		15	103.04	134.94	112.50
	Man	1.5	100.44	61.87	91.91
		15	108.96	-0.69	-32.21
	α-Metil-Man	1.5	98.95	62.43	94.11
		15	104.16	7.20	-18.26
<i>Hc</i> EH-375					
	α-Gal	1.5	-0.33	10.57	2.67
		15	36.84	-21.23	-2.97
	β-Gal	1.5	98.13	184.61	114.43
		15	100.54	176.99	106.63
	Man	1.5	99.15	64.42	59.89
		15	102.50	ND	71.39
	α-Metil-Man	1.5	98.13	64.42	51.60
		15	102.50	ND	60.64
<i>Ca</i> cepa 15					
	α-Gal	1.5	-4.29	16.46	16.76
		15	-5.39	5.52	22.58
	β-Gal	1.5	-1.68	-36.21	-38.92
		15	-8.88	1.65	-11.82
	Man	1.5	102.99	102.46	151.48
		15	126.98	131.49	145.16
	α-Metil-Man	1.5	105.04	144.03	142.51
		15	135.23	132.59	141.93

Se siguieron las mismas indicaciones referidas en la tabla 1. ND- No determinado; *Hc*- *Histoplasma capsulatum*; *Ca*- *Candida albicans*.

Tabla 4. Resultados de la inhibición de adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos, a células de pulmón de ratones

CEPA	AZÚCAR	[mM]	% IA	
			EXP. 1	EXP. 2
<i>Hc</i> EH-53				
	α -Gal	1.5	0.57	10.87
		15	-16.48	ND
	β -Gal	1.5	82.28	97.88
		15	70.74	ND
	Man	1.5	70.28	52.96
		15	56.38	ND
	α -Metil-Man	1.5	64.28	51.83
		15	60.63	ND
<i>Hc</i> EH-375				
	α -Gal	1.5	22.45	-18.75
		15	-1.85	ND
	β -Gal	1.5	53.81	98.90
		15	81.17	ND
	Man	1.5	42.79	23.38
		15	ND	ND
	α -Metil-Man	1.5	42.62	13.18
		15	69.13	ND
<i>Ca</i> cepa 15				
	α -Gal	1.5	3.93	51.06
		15	-18.0	ND
	β -Gal	1.5	13.38	73.50
		15	-65.0	ND
	Man	1.5	31.49	97.25
		15	-30.0	ND
	α -Metil-Man	1.5	53.54	96.64
		15	-21.5	ND

Para detectar la interacción de levaduras con células de ratones, se utilizó un método de ELISA de acuerdo con Aramaky *et al.* (1993). La adherencia de las levaduras se realizó a 4 °C para prevenir su internalización por las células adherentes del órgano utilizado. Para los cálculos de inhibición de adherencia (% IA) ver detalles en materiales y métodos. Se consideró los valores \geq al 75 %, como inhibiciones importantes. ND- No determinado; *Hc*- *Histoplasma capsulatum*; *Ca*- *Candida albicans*.

Tabla 5. Resultados de la inhibición de adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos, a células de bazo de ratones

CEPA	AZÚCAR	[mM]	% IA	
			EXP. 1	EXP. 2
<i>Hc</i> EH-53				
	α-Gal	1.5	17.33	40.52
		15	44.97	95.73
	β-Gal	1.5	99.33	97.96
		15	80.47	94.58
	Man	1.5	61.66	20.44
		15	ND	68.44
	α-Metil-Man	1.5	65.33	72.11
		15	51.77	61.74
<i>Hc</i> EH-375				
	α-Gal	1.5	-12.02	ND
		15	7.23	79.46
	β-Gal	1.5	97.46	ND
		15	77.67	92.29
	Man	1.5	74.05	ND
		15	78.61	ND
	α-Metil-Man	1.5	65.82	ND
		15	63.52	77.82
<i>Ca</i> cepa 15				
	α-Gal	1.5	9.25	79.94
		15	ND	65.37
	β-Gal	1.5	29.62	78.86
		15	ND	66.75
	Man	1.5	33.33	90.17
		15	ND	87.25
	α-Metil-Man	1.5	98.14	90.98
		15	ND	83.93

Se siguieron las mismas indicaciones referidas en la tabla 4. ND- No determinado; *Hc*- *Histoplasma capsulatum*; *Ca*- *Candida albicans*.

Tabla 6. Resultados de la inhibición de adherencia de levaduras tratadas con carbohidratos, a células de hígado de ratones

CEPA	AZÚCAR	[mM]	% IA	
			EXP. 1	EXP. 2
<i>Hc</i> EH-53				
	α -Gal	1.5	62.99	4.08
		15	0.53	100
	β -Gal	1.5	86.23	100
		15	100	100
	Man	1.5	83.13	51.86
		15	ND	87.19
	α -Metil-Man	1.5	75.90	47.70
		15	31.55	57.11
<i>Hc</i> EH-375				
	α -Gal	1.5	6.22	-53.39
		15	-6.57	-38.58
	β -Gal	1.5	61.53	100
		15	75.03	100
	Man	1.5	ND	12.60
		15	50.70	62.50
	α -Metil-Man	1.5	36.26	-5.63
		15	20.65	79.92
<i>Ca</i> cepa 15				
	α -Gal	1.5	34.44	72.39
		15	-28.43	76.49
	β -Gal	1.5	ND	82.92
		15	ND	69.24
	Man	1.5	96.91	100
		15	63.95	100
	α -Metil-Man	1.5	85.08	100
		15	50.25	100

Se siguieron las mismas indicaciones referidas en la tabla 4. ND- No determinado; *Hc*- *Histoplasma capsulatum*; *Ca*- *Candida albicans*.