

11261  
2ej  
21



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

Facultad de Medicina  
División de Estudios de Postgrado

**Fagocitosis de Histoplasma capsulatum:  
Papel de los receptores membranales  
de macrófagos en el proceso fagocítico.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:  
Maestra en Ciencias Biomédicas  
Area: Inmunología

p r e s e n t a:

**BLANCA RICO GALINDO**

**FALLA DE CR.GEN**

México, D. F.

1987



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.

## I N D I C E

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	15
ESTRATEGIA.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	57
ABSTRACT.....	58
APÉNDICE DE MEDIOS, REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	69

## INDICE DE CUADROS, TABLAS Y FIGURAS

CUADRO 1.	SISTEMA FAGOCITICO MONONUCLEAR.....	4
CUADRO 2.	RECEPTORES DE MACROFAGOS.....	7
CUADRO 3.	MARCAJE DE PROTEINAS DE MEMBRANA CON <sup>125</sup> I.....	16
CUADRO 4.	DETERMINACION DE LA MOVILIZACION DE RECEPTORES POR LA PRUEBA DE ELISA MODIFICADA.....	17
CUADRO 5.	DETERMINACION DE LA MOVILIZACION DE RECEPTORES POR LA PRUEBA DE CELULAS FORMADORAS DE ROSETAS..	18
TABLA 1.	CUANTIFICACION DE ADN Y PROTEINAS EN MACROFAGOS DE LA LINEA CELULAR J774.2.....	31
TABLA 2.	ACTIVIDAD OPSONIZANTE DE LAS IgG ANTI-Histoplasma PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.....	33
FIGURA 1.	MARCAJE DE PROTEINAS DE MEMBRANA DE MACROFAGOS CON <sup>125</sup> I; CUENTAS TOTALES DE <sup>125</sup> I. (cepas de distinta virulencia).....	34
FIGURA 2.	CUENTAS TOTALES DE <sup>125</sup> I. (levaduras opsonizadas y sin opsonizar).....	36
FIGURA 3.	CUENTAS TOTALES DE <sup>125</sup> I. (levaduras vivas y muertas).....	37
FIGURA 4.	AUTORADIOGRAFIA DE LA ELECTROFORESIS CON SDS.....	38
FIGURA 5.	AUTORADIOGRAFIA DE LA ELECTROFORESIS CON SDS.....	39
FIGURA 6.	DETERMINACION DE LA MOVILIZACION DE RECEPTORES Fc POR LA PRUEBA DE ELISA MODIFICADA. (distintas concentraciones de macrófagos).....	41
FIGURA 7.	DETERMINACION DE LA MOVILIZACION DE RECEPTORES Fc POR LA PRUEBA DE ELISA MODIFICADA. (distintas dosis opsonizantes)	42
FIGURA 8.	DETERMINACION DE LA MOVILIZACION DE RECEPTORES Fc POR LA PRUEBA DE CELULAS FORMADORAS DE ROSETAS....	44

## RESUMEN

Los eventos involucrados en la fagocitosis de la fase levaduriforme de Histoplasma capsulatum se conocen poco. En este trabajo fueron estudiadas la cinética y la participación de los receptores Fc en la fagocitosis de este hongo. Las células levaduriformes se incubaron a 37°C durante 30' con anticuerpos de ratón anti-Histoplasma (IgG totales, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>2b</sub>). También se utilizó IgG normal como control. Antes de permitir la ingestión a 37°C, las levaduras opsonizadas fueron lavadas varias veces, ajustadas a una relación de 5:1 con respecto a los macrófagos y colocadas entonces sobre una monocapa de macrófagos de la línea J774.2. Se permitió la adherencia a 4°C durante 1 hora para sincronizar la ingestión del inóculo. La movilización de receptores Fc durante el proceso se observó por tres métodos distintos: la iodínación (<sup>125</sup>I) enzimática de las proteínas de membrana, una prueba de ELISA modificada y por células formadoras de rosetas.

Nuestros resultados mostraron, cuando se emplearon IgGs específicas, una desaparición crítica de receptores Fc de la superficie del macrófago a los 15' de infección.

Se detectaron diferencias en la cinética al emplear levaduras vivas y muertas, siendo más lenta la ingestión de las vivas. Observamos también un aumento de receptores, con los tres métodos, en los tiempos más largos.

Estos hallazgos sugieren una importante participación de los receptores Fc en la fagocitosis de H. capsulatum y establecen diferencias en la interacción de las levaduras con los macrófagos.

## INTRODUCCION

La fagocitosis es el proceso mediante el cual las células eucariotes ingieren partículas o elementos solubles en el medio. Es la forma de alimentación de organismos unicelulares tales como las amibas, capaces de ingerir grandes partículas rodeándolas con la membrana celular y formando vacuolas que se fusionan con los lisosomas. Estos contienen en su interior enzimas líticas capaces de digerir las partículas, pasando los productos del proceso digestivo al citosol para ser utilizados como nutrientes. La mayoría de las células de los organismos pluricelulares son incapaces de ingerir partículas en forma eficiente, dejando esta tarea a dos tipos de células especializadas: los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos. Ambas poblaciones utilizan básicamente el mismo mecanismo de ingestión que las amibas, encargándose de la defensa contra microorganismos invasores y los macrófagos eliminan células dañadas o envejecidas. Durante mucho tiempo se asignaron a los macrófagos exclusivamente estas funciones pues su relación con el aparato inmune se describió más adelante.

La historia del conocimiento de los fagocitos mononucleares se asocia originalmente a histólogos tales como Von Recklinghausen (1863), Ranvier (1900), Marchand (1898), Ziegler (1890) y Gravitz (1890). Sin embargo fue Metchnikoff (1905) quien comprendió plenamente sus capacidades y también quien relacionó, en estudios comparativos, las funciones fagocíticas de los amebocitos de metazoarios con los macrófagos de vertebrados. Asimismo señaló su importante participación frente a los agentes infecciosos y otras formas de estímulos inflamatorios. Posteriormente Goldman (1909), Tschaschin (1913) y Kiyono (1914), empleando métodos con colorantes vitales, ampliaron estas observa

ciones y mostraron la abundancia de estas células, su amplia distribución y su localización tisular, llegando al concepto de un "sistema" de células de localización ubicua, con similitudes funcionales que Aschoff, en 1924 denominó "sistema reticuloendotelial". En la actualidad se acepta en la nomenclatura bajo la designación de "sistema fagocítico mononuclear" (1).

La clasificación y aislamiento de poblaciones homogéneas de fagocitos mononucleares ha sido difícil por lo que sus propiedades metabólicas y funcionales permanecieron oscuras durante largo tiempo. Con técnicas citológicas y bioquímicas actuales, se ha podido avanzar en este campo si bien siguen existiendo incógnitas por resolver.

El origen y destino de estas células se ha podido dilucidar gracias a estudios cinéticos cuidadosos, empleando timidina tritiada, rastreándolas desde que son células estaminales en médula ósea, hasta que se diferencian en macrófagos y se ubican en diferentes sitios donde ejercen sus funciones bajo diversas denominaciones (Cuadro 1).

El término "macrófago" ha sido usado genéricamente para denominar a una amplia variedad de células fagocíticas localizadas en diferentes tejidos, que si bien derivan de un precursor hematopoyético común y presentan algunas características semejantes como abundantes lisosomas, receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas y el componente C<sub>3</sub>b del complemento, funcionan de manera diversa según haya sido su historia individual. En la actualidad existe una cierta tendencia a llamarlas: "células presentadoras de antígeno", "macrófago activado", "macrófago citotóxico", etc. (2, 3).

La capacidad que poseen los macrófagos de ingerir moléculas tanto solu

## CUADRO 1

### SISTEMA FAGOCITICO MONONUCLEAR

Célula estaminal	Médula ósea
Promonocito	
Monocito	Sangre periférica
Macrófago:	
- Célula de Kupffer	Hígado
- Macrófago alveolar	Pulmón
- Histiocito	Tejido conectivo Médula ósea
- Macrófagos fijos y libres	Bazo
- Macrófagos pleurales y peritoneales	Cavidades serosas
- Células de Langerhans	Piel
- Microglia	Sistema Nervioso Central
- Células epitelioides y gigantes	Granulomas

bles como particuladas es tan grande, que ello los diferencia del resto de las células fagocíticas, incluyendo a los PMN, ya que son capaces de ingerir un espectro mayor de moléculas, como partículas menores de  $0.1 \mu$  o moléculas solubles a través de receptores (1).

Aunque se sigue empleando el término fagocitosis para denominar al fenómeno mediante el cual una partícula es ingerida y digerida, actualmente existe el consenso para denominar fagocitosis exclusivamente al proceso de ingestión, llamándose a los eventos posteriores por separado: fusión fagosoma-lisosoma, digestión y exocitosis.

El proceso de ingestión de partículas se divide en dos fases: la primera se denomina adherencia y comprende un grupo de interacciones, específicas o no, de la partícula con la superficie externa del macrófago. Es un proceso pasivo de tipo unión receptor-ligando, que no requiere gasto de energía. La segunda es propiamente la introducción de la partícula e incluye fusión de la membrana a su alrededor con la consecuente formación de una vacuola fagocítica o fagosoma. Esto es ya un fenómeno activo, con dependencia de la temperatura y con un alto gasto energético.

Los mecanismos involucrados en la fase de ingestión requieren de proteínas contráctiles en el citoplasma de macrófagos, sugiriendo un mecanismo por el cual la energía química liberada durante la ingestión puede acoplarse a los procesos mecánicos requeridos para la movilidad de la membrana y la interiorización de una partícula (4, 5). Aunque muchos investigadores han sugerido la participación de los filamentos contráctiles del citoesqueleto, para otros no está clara su participación en la introducción de pequeñas vesículas (6).

Existen dos términos que han se han empleado clásicamente para caracterizar la actividad de ingestión: pinocitosis, cuando se trata de moléculas solubles ( $<0.5 \mu$ ) y fagocitosis cuando son partículas ( $>0.5 \mu$ ). Sin embargo, el tamaño exacto del material que divide ambos procesos no está bien definido (7). El término endocitosis se reserva para la ingestión de moléculas solubles a través de un receptor específico y se le llama "endocitosis mediada por receptores". Se han descrito algunas diferencias en los mecanismos involucrados en estos fenómenos (endocitosis mediada por receptores, pinocitosis y fagocitosis): algunos agentes que interfieren con la respiración y la fosforilación oxidativa deprimen la actividad pinocítica y no la fagocitosis, mientras que ocurre lo contrario con la glicólisis. Asimismo el fluoruro, el iodoacetato y la 2-desoxiglucosa inhiben la fagocitosis y no la pinocitosis (1, 8, 9).

La fagocitosis se realiza a través de receptores y se lleva a cabo mediante un mecanismo semejante al de una cremallera, de manera que los receptores del macrófago se van uniendo a las moléculas complementarias de la partícula hasta rodearla por completo. Este mecanismo fue demostrado por Griffin y Silverstein en un elegante experimento (10): Añadieron anticuerpos anti-linfocito a una población de linfocitos y permitieron que ocurriera la formación de casquete polar (capping); entonces lo pusieron frente a macrófagos, observando que la fagocitosis no se podía llevar a cabo; al estar todas las moléculas reclutadas en un solo sitio, el macrófago no podía ir uniendo sus receptores Fc para rodear al linfocito.

Se han descrito más de 30 receptores específicos en macrófagos (3) y los involucrados en la fagocitosis se citan en el Cuadro 2.

## CUADRO 2

### RECEPTORES DE MACROFAGOS

#### 1) RECEPTORES INMUNOLOGICOS.

Receptores Fc. Se conocen por lo menos tres receptores distintos para la fracción Fc de las moléculas de inmunoglobulina G: FcRI para la subclase IgG<sub>2a</sub>, FcRII para IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2b</sub> y FcRIII para IgG<sub>3</sub> (11, 12, 13).

Receptores para Complemento. En la actualidad existen reportados receptores para los fragmentos C<sub>3b</sub>, C<sub>3b</sub> INA, C<sub>3bi</sub>, C<sub>4b</sub> y C<sub>3d</sub> involucrados en el proceso fagocítico (14, 15, 16, 17).

#### 2) RECEPTORES NO INMUNOLOGICOS.

Receptor para Manosa-Fucosa. Este receptor se une a glicoconjugados con residuos terminales de manosa y/o fucosa (18, 19, 20).

Receptores para Fibronectina, Lactoferrina y  $\alpha$ -2 macroglobulina (21, 22, 23, 24, 25).

#### 3) RECEPTORES NO ESPECIFICOS.

Estos reconocen partículas por sitios hidrofóbicos, y son los que median la ingestión de partículas inertes como por ejemplo latex (26).

La unión de partículas a estos receptores y su desplazamiento posterior produce un rápido reagrupamiento de microfilamentos contráctiles (actina y miosina) por debajo del sitio de contacto (27). Estos receptores generan señales en el macrófago, algunas de las cuales promueven la fagocitosis y disparan los mecanismos oxidativos: "estallido respiratorio" y la secreción de enzimas lisosomales a través de mecanismos de activación de enzimas unidas a la membrana como la NADH-oxidasa y la proteína-quinasa (28). Por otro lado existen señales que no inducen cambios y que no conducen consecuentemente a la fagocitosis. Por ejemplo, los receptores Fc median la adherencia e ingestión de partículas cubiertas con IgG (29), mientras que los receptores para  $C_3$  median la fase de adherencia pero no su ingestión, aunque cuando los macrófagos han sido activados, ingieren activamente eritrocitos cubiertos con  $C_{3b}$  (30, 31).

En la endocitosis mediada por receptores, muchos de los ligandos solubles penetran a la célula unidos a los receptores reclutados en pozos recubiertos de clatrina, que formarán las vesículas recubiertas de clatrina.

Se había descrito que la fagocitosis era el único caso de ingestión por adherencia en que los pozos y vesículas recubiertas de clatrina no jugaban un papel importante (32). Sin embargo, Aggeler y Werb (6) han encontrado que aproximadamente la mitad de los fagosomas observados después de un breve período de fagocitosis (2-5 min) presentan áreas asociadas a la clatrina. La función de la clatrina en la ingestión de moléculas y de partículas mediada por receptores aún no ha sido aclarada, pero se sugiere como posible función la de mediar el reciclaje masivo y rápido de los receptores incluidos en las vesículas a la membrana plasmática, después de un estímulo endocítico o fagocítico.

Los macrófagos pueden recambiar completamente su membrana plasmática cada 30 minutos exclusivamente por pinocitosis (33). La membrana así introducida reaparece en la superficie a los 10 minutos (34) y se ha observado que las proteínas de membrana de los fagosomas también son recicladas muy rápidamente (35, 36). Además algunos receptores específicos regresan tan rápido a la superficie que es difícil disminuir su número efectivo o basal (18).

El receptor Fc unido a la IgG parece tener un destino dual, reciclanse algunos receptores y digiriéndose otros en los fagolisosomas (37). Esto sugiere que el destino de los receptores varía dependiendo de su naturaleza y función, aunque la mayor parte de ellos parecen ser reciclados, liberando al ligando al acidificarse la vacuola fagocítica, reutilizándose así varias veces (7, 38, 39).

Cuando la partícula ha sido englobada en una porción de la membrana plasmática y se ha formado el fagosoma, ocurren una serie de eventos encaminados a digerirla. Inicialmente se presenta la acidificación del fagosoma (40), posteriormente éste es dirigido al centro de la célula donde se fusiona con lisosomas primarios, iniciándose así el proceso de digestión.

Los mecanismos mediante los cuales los macrófagos digieren y eliminan a los microorganismos, operan de dos maneras separadas durante el proceso fagocítico: una dependiente y otra independiente del oxígeno. El parásito es expuesto a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y a otros derivados del oxígeno en la vacuola fagocítica, o incluso en el exterior del macrófago, quedando expuesto a la acción de las enzimas lisosomales. Al activarse el macrófago por linfocinas y otros factores activadores, se le capacita para eliminar al parásito. Todavía no está establecido si los macrófagos

normales y los activados utilizan vías microbicidas similares y la diferencia en efectividad es cuantitativa, o si los macrófagos activados adquieren características cualitativamente diferentes.

El mecanismo microbicida dependiente del oxígeno parece ser el de mayor importancia en los macrófagos (41). La estimulación de la membrana plasmática por la adherencia de un ligando apropiado, estimula la NADPH-oxidasas membranales que cataliza la reducción de  $O_2$  del medio al radical  $O_2^-$ . La formación de  $H_2O_2$  puede entonces ocurrir espontáneamente o ser catalizada por la superóxido-dismutasa. En los granulocitos (PMN, eosinófilos y basófilos) la toxicidad de estas sustancias aumenta considerablemente por la reacción catalítica de la mieloperoxidasa y de iones haluro (42). Los macrófagos carecen de mieloperoxidasa pero se cree que la catalasa puede actuar de manera similar. Además, es posible que los macrófagos utilicen la peroxidasa de los granulocitos para aumentar su capacidad microbicida (43).

Los mecanismos independientes del oxígeno han sido menos estudiados, pero parecen jugar un papel importante en la función microbicida y consisten básicamente en la acción de las enzimas líticas lisosomales (44).

Algunos parásitos, en especial los intracelulares, son capaces de multiplicarse en el interior de los macrófagos. En ellos se han desarrollado ingeniosos mecanismos que les permiten escapar de la destrucción en diferentes etapas del proceso: impidiendo su reconocimiento y adherencia; por inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma; por resistencia a la acción de las enzimas líticas o escapando de la vacuola fagocítica.

## PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS EN LA DEFENSA CONTRA ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

La participación de los macrófagos en la defensa del huésped ha recibido una gran atención desde las contribuciones originales de Metchnikoff. En la reacción inicial de defensa contra microorganismos invasores, se sabe que participan tanto PMN como macrófagos y que el número inicial de ambas poblaciones en el sitio de la infección aumenta durante la respuesta inflamatoria. Sin embargo, a diferencia de los PMN, los macrófagos son capaces de aumentar su resistencia durante las condiciones generadas en el proceso inflamatorio. Metchnikoff había observado que los fagocitos mononucleares de animales resistentes a ciertas infecciones bacterianas mostraban ser más eficientes para ingerir y matar a estos gérmenes. La adquisición de resistencia a nivel celular está influenciada por factores inmunológicos específicos y no específicos y por factores no inmunológicos.

Mackness y cols. en la década de los sesenta fueron los primeros en llamar macrófagos "activados" a aquellos de mayor tamaño y agresividad, responsables de ejercer la función efectora microbicida (45). Posteriormente, en la década de los setenta, Evans, Alexander, Hibbs y Remington encontraron que estos macrófagos también eran capaces de destruir células neoplásicas (46, 47).

Se ha definido la activación de los macrófagos como la "adquisición de competencia para mediar o completar una función compleja", es decir como la manifestación de una habilidad aumentada para realizar una "tarea" (3). Esta definición lleva implícita una distinción entre las "funciones complejas" como la muerte microbiana o tumoral y las "capacidades fisiológicas" con que se realizan, es decir, el número de receptores Fc, el con-

tenido de enzimas líticas, etc.

Se han realizado investigaciones sobre el desarrollo y maduración de los macrófagos, las proteínas de la membrana plasmática, receptores, productos de secreción, constituyentes intracelulares, así como sobre las capacidades fisiológicas y bioquímicas que son reguladas durante el proceso de activación.

La influencia de los linfocitos T inmunes sobre el aumento de la resistencia y la activación de los macrófagos ha sido motivo de atención desde que empezaron a estudiarse los fenómenos de hipersensibilidad tardía y los diferentes efectos de las linfoquinas liberadas por los linfocitos T estimulados sobre los macrófagos. Entre las múltiples funciones de las linfoquinas, cabría destacar algunas como: 1) el aumento en la función de presentación del antígeno, al parecer por reclutamiento de macrófagos Ia<sup>+</sup> (48, 49); 2) el aumento en la función microbicida por activación del recambio de fosfolípidos, con el consiguiente aumento en la capacidad de respuesta oxidativa (50) y 3) la producción de moléculas amplificadoras, como la Interleucina 1 (I1-1) induciendo o influyendo en la actividad de otras células y factores, favoreciéndose el desarrollo de una respuesta inflamatoria en el foco de infección (28).

Los productos de secreción del macrófago, en teoría, permitirían la regulación positiva y/o negativa de numerosos eventos de retroalimentación en la respuesta inflamatoria. Sin embargo, falta todavía confirmar su existencia y significado in vivo (28).

#### ANTECEDENTES DE LA FAGOCITOSIS EN Histoplasma capsulatum.

El Histoplasma capsulatum es un parásito intracelular facultativo con gran afinidad por el sistema fagocítico mononuclear por lo que constituye un excelente modelo de infección intracelular. La sobrevivencia y multiplicación del hongo en los macrófagos es un factor importante en el desarrollo del cuadro infeccioso. Cuando la infección se instala, al parecer los mecanismos del huésped para destruir al hongo presentan alguna alteración, sea por que existan fallas propias del fagocito o de otras ramas de la respuesta inmune, o bien porque la reacción entre el huésped y el parásito produce un balance favorable al parásito en el momento en que se desencadena la infección: (dosis elevada, inmunosupresión ocasional, etc.) (51). Son escasos los estudios sobre el fenómeno fagocítico en la histoplasmosis. Se conoce la participación de células T inmunes en la activación de macrófagos favoreciendo el proceso de eliminación del hongo (52, 53). También se ha estudiado la influencia de la pared del hongo en el fenómeno fagocítico (54) y se ha detectado que el hongo es capaz de activar la vía alterna del complemento facilitando así, posiblemente, el evento fagocítico (55). El destino del hongo en los macrófagos provenientes de animales inmunizados fue inicialmente descrito por Hill y Marcus (56) quienes encontraron inhibición del crecimiento intracelular de Histoplasma, observando que el anticuerpo no ejercía efecto sobre la ingestión y la digestión intracelular del hongo. Sin embargo, ha sido observado un incremento de la ingestión del hongo por el macrófago del huésped, utilizando anticuerpos anti-pared celular (54). Por otro lado, Holland ha observado también que los neutrófilos y monocitos humanos requieren factores séricos para ingerir y matar levaduras de H. capsulatum (57). Estos conocimientos no explican los

casos en que el hongo vence al sistema de defensa fagocitario. Dos grandes incógnitas permanecen sin explicación: ¿cómo agrade el hongo al fagocito? ¿cómo escapa el hongo a la muerte intramacrofágica? Finalmente, la información acerca del tipo de receptores, así como del papel que juegan en la adhesión e ingestión del hongos es desconocida. Siendo la fagocitosis la vía final de eliminación del parásito, es de fundamental importancia entender los eventos iniciales que ocurren entre el huésped y el parásito en este fenómeno.

#### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

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

La histoplasmosis es una infección intracelular en la que estos aspectos se desconocen casi totalmente y creemos que el contacto inicial y la unión del hongo a los receptores de la membrana plasmática, juegan un papel importante en el destino final de las levaduras fagocitadas.

Con el propósito de estudiar cuáles son los receptores que participan en la fagocitosis de H. capsulatum y cuál es el papel de los receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas (RFc) durante la cinética del fenómeno fagocítico realizamos este trabajo.

## HIPOTESIS.

Los receptores Fc participan de manera importante en la fagocitosis de la fase levaduriforme de Histoplasma capsulatum, facilitando su ingestión.

## OBJETIVOS.

- Caracterizar los patrones electroforéticos de las proteínas de membrana externa en los macrófagos, marcadas con <sup>125</sup>I durante la cinética de la infección e identificar los receptores que intervienen en el proceso fagocítico del hongo.
- Determinar el tiempo en que son ingeridas las levaduras cuando participa el receptor Fc (opsonizadas) y cuando no lo hace (sin opsonizar).
- Caracterizar la utilización y reciclaje de receptores durante la fagocitosis del hongo opsonizado y sin opsonizar.
- Identificar si existen diferencias en el fenómeno, utilizando dos cepas de diferente virulencia.

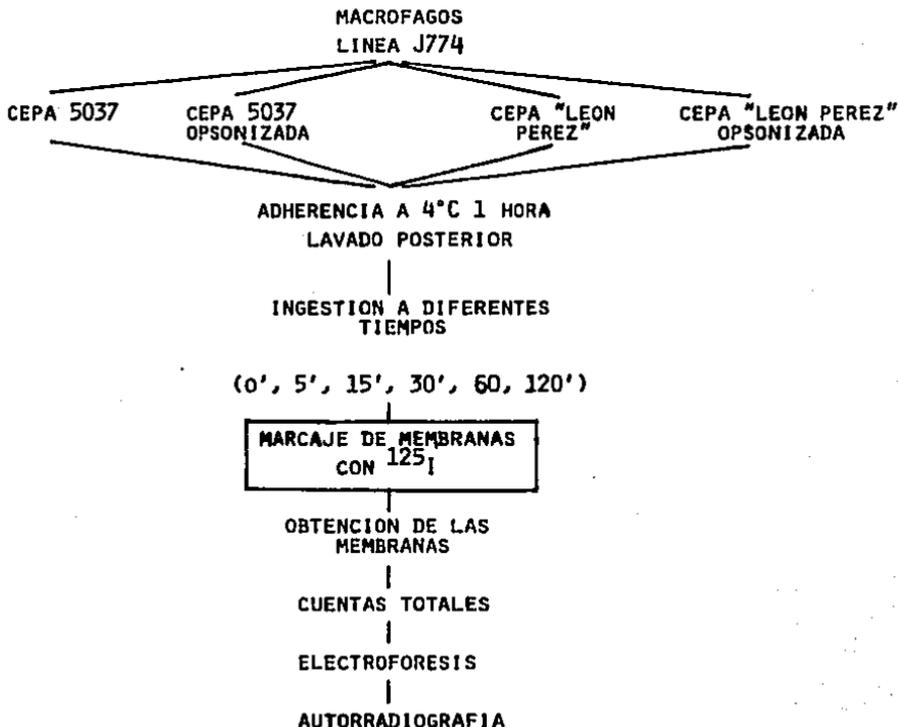
## ESTRATEGIA.

Se realizaron experimentos utilizando tres métodos distintos (Cuadros 3, 4 y 5) bajo el mismo diseño experimental.

CUADRO 3

MARCAJE DE PROTEINAS DE MEMBRANA  
CON  $^{125}\text{I}$

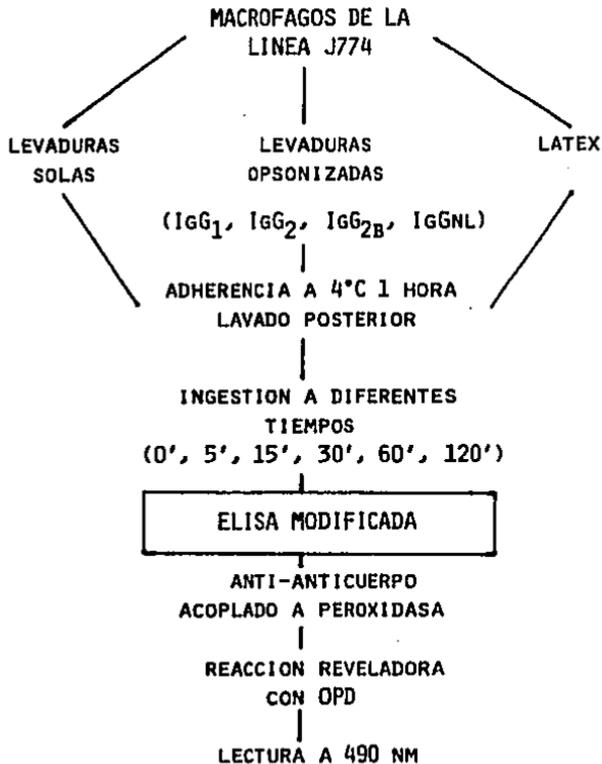
DISEÑO EXPERIMENTAL



#### CUADRO 4

### DETERMINACION DE LA MOVILIZACION DE RECEPTORES POR LA PRUEBA DE ELISA MODIFICADA

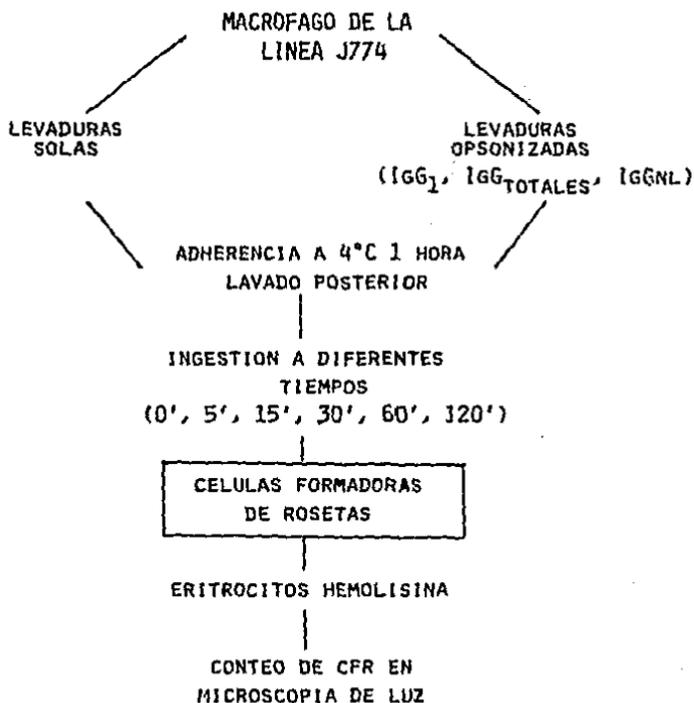
#### DISEÑO EXPERIMENTAL



CUADRO 5

DETERMINACION DE LA MOVILIZACION DE RECEPTORES  
POR LA PRUEBA DE CELULAS FORMADORAS DE ROSETAS

DISEÑO EXPERIMENTAL



## MATERIALES Y METODOS

### MATERIALES

#### MICROORGANISMOS.

Se emplearon dos cepas del hongo Histoplasma capsulatum: la cepa 5037 (de menor virulencia) y la cepa "León Pérez" (de mayor virulencia), registradas en el cepario del Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina de la UNAM, mantenidas en fase levaduriforme a 37°C en medio BHI líquido debidamente suplementado.

#### CELULAS.

Se utilizaron macrófagos de la línea celular J774.2 derivada de un sarcoma de células reticulares de ratones BALB/c (58, 59), que nos fue amablemente proporcionada por el Dr. Federico Goodsaid del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. La línea se cultiva en frascos de plástico (Nunc) en medio MEMD debidamente suplementado, a 37°C y atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%.

#### MEDIOS, REACTIVOS Y SOLUCIONES.

Todos los reactivos empleados, salvo los que se especifican, provienen de los Laboratorios Merck de México, S.A. (ver apéndice).

## MÉTODOS

### DETERMINACION DEL TIEMPO DE GENERACION DE LA LINEA CELULAR J774.

Para tener un control adecuado sobre el número exacto de macrófagos en cultivo, se determinó el tiempo de generación de la línea y el de adaptación a la caja de cultivo, en las condiciones de nuestro laboratorio. Para ello se cuantificó el número de células al momento de sembrarlas y a diferentes tiempos de cultivo: 0', 24, 48, 72 y 96 horas. El cálculo del tiempo de generación se hizo usando la expresión del número de células como función de  $\log_2$ . El número de células se convierte a  $\log_2$  multiplicando el log común de la cuenta celular por el factor 3.3219. Se calcula entonces el  $\log_2$  del tiempo 0' y el de 48 horas; se resta el segundo del primero y se divide 48 entre el resultado (60).

$$(a) = \log_2 0', \quad (b) = \log_2 48, \quad (c) = a - b$$

$$\text{Tiempo de generación} = \frac{48}{c}$$

El tiempo de generación fué corroborado por la relación proteína/ADN.

### DETERMINACION DEL NUMERO DE MACROFAGOS.

Se desprenden los macrófagos de los frascos de cultivo por agitación mecánica, para contarlos y sembrarlos en placas de plástico (Costar y Munc) de 24 ó 96 pozos. El conteo se realiza mediante la técnica de exclusión de azul Tripano en una cámara de Neubauer. Para poder corregir las diferencias que existen en el número de macrófagos entre un pozo y otro, en algunos experimentos se procedió a marcarlos con timidina tritiada ( $^3\text{H-TdR}$ ) - - (4  $\mu\text{Ci}/10^6$  macrófagos). En el momento de sembrarlos y 24 horas después, se

toman alícuotas de 20  $\mu$ l de los sobrenadantes de los cultivos y se colocan sobre papel filtro (Whatman N $^{\circ}$  3) de 1.5 cm de diámetro; se dejan secar, se colocan en viales, se les añaden 5 ml de líquido de centelleo para contarlas en un contador Packard Tri-Carb 300. Del paquete celular que se obtiene en los experimentos de marcaje de receptores con  $^{125}$ I, marcado también con  $^3$ H-TdR, se toma una alícuota para contarla en la misma forma.

#### CUANTIFICACION DE ADN EN LOS MACROFAGOS.

Para la cuantificación de ADN se utilizó el método de la difenilamina (60): se lava la monocapa celular tres veces con PBS y posteriormente se lava una vez con 1 ml de ácido perclórico 0.2 N. Se añade 1 ml de ácido perclórico 0.2 N a 4°C y se deja 10 minutos en hielo. Se elimina el ácido perclórico y se añaden 0.5 ml de NaOH 0.3 N incubando una hora a 37°C. Se transfiere a tubos de centrifuga y se enfría nuevamente. Se añaden 0.5 ml de ácido perclórico a 4°C y se deja 10 minutos en hielo. Este paso es para precipitar el ADN y las proteínas. Se centrifuga a 5000 rpm durante 15 minutos. El paquete se resuspende con 0.5 ml de ácido perclórico 0.2 N y se centrifuga a 5000 rpm durante 15 minutos. Se resuspende el paquete con 0.5 ml de ácido perclórico 0.5 N. Se hierve en baño María a 90°C durante 15 minutos con el objeto de hidrolizar el ADN. Se centrifuga y se conserva el sobrenadante. Se lava el paquete con 0.5 ml de ácido perclórico 0.5 N, se centrifuga y se junta el sobrenadante con anterior. El paquete se disuelve en NaOH 0.3 N y se cuantifican las proteínas. Se preparan estándares por duplicado de 5, 10, 25 y 50  $\mu$ g de ADN por tubo, y se añade ácido perclórico 0.5 N hasta un volumen de 2 ml. Se prepara

el blanco con 2 ml de ácido perclórico 0.5 N. Se colocan 2 ml de las muestras de extracto celular en tubos y a todos se les agrega 4 ml del reactivo de Burton. Se incuban 16-20 horas a temperatura ambiente y se lee la absorbancia a 600 nm.

#### DETERMINACION DE PROTEINAS.

Las proteínas se obtuvieron del paquete como se describe en la sección anterior (Cuantificación de ADN) y se determinaron por el método de Lowry (61).

#### INMUNIZACION DE ANIMALES PARA OBTENCION DE ANTICUERPO ANTI-Histoplasma.

Se infectan ratones BALB/c adultos de 4 meses con la fase levaduriforme de la cepa "León Pérez" por vía intraperitoneal (IP) con la dosis letal 50 (DL50):  $1.7 \times 10^8$  levaduras/ml para las hembras y  $5.6 \times 10^7$ /ml para los machos. Se observa la evolución de 15 a 30 días. Se sangran los ratones cuando presentan signos de enfermedad grave: pelo erizado, pérdida de peso y disminución de actividad. Se separa el suero y se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### OBTENCION Y PURIFICACION DE INMUNOGLOBULINAS G(IgG) ANTI-Histoplasma.

El método para la obtención de subclases de IgG fué similar al descrito por Ey, Prowse y Jenkin (62). Una vez separado el suero se adicionan 2 ml de fosfato de sodio 0.1 M pH 8.0 por cada 2.5-3 ml del suero. Se ajusta a pH 8.1 con tris-HCl 1 M pH 9.0. Se pre-equilibra la columna de sepharosa 4B-proteína A con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8.0. Se aplica la muestra de suero y se deja incubando de 20-30 minutos. Se pasa el suero por

la columna dos veces más. Se lava la columna con amortiguador de fosfatos pH 8.0 (30 ml) hasta obtener una densidad óptica de cero. Se comienza a eluir inicialmente con el amortiguador de citratos 0.1 M pH 6.0 (30 ml) para coleccionar IgG<sub>1</sub>. Se lava la columna con 20-28 ml de amortiguador de citratos 0.1 M pH 5.5. Se eluye la IgG<sub>2a</sub> con 25-30 ml de amortiguador de citratos 0.1 M pH 4.5, y finalmente se eluye IgG<sub>2b</sub> con amortiguador de citratos 0.1 M pH 3.5 (25-30 ml). Se reequilibra la columna a pH 8.0 con tris-HCl pH 9.0.

#### OPSONIZACION.

Una vez lavadas y contadas las levaduras en cámara de Neubauer, se les adiciona el anticuerpo opsonizante (IgG anti-Histoplasma), previamente cuantificada su actividad según Kozel y McGaw (63): Se coloca un número constante de levaduras en una serie de pozos y se añaden cantidades crecientes de la IgG anti-Histoplasma a probar. Se incuba a 37°C durante 30' y se agrega anti-IgG (anti-IgG de ratón obtenida en conejo, de naturaleza IgM de Sigma). Se incuba 30' a 37°C. Se observa en el fondo del pozo la aglutinación.

Según la cantidad de levaduras requerida por experimento, y la inmunoglobulina de que se trate, se adiciona la IgG al paquete de levaduras resuspendido en medio de Eagle modificado por Dulbecco (MEMD), se incuba durante 30' a 37°C. Se centrifuga a 1500 rpm durante 30' para eliminar el anticuerpo libre y se restituye el volumen original con MEMD fresco.

## GENÉTICAS DE FRAGMENTISTAS.

### INFECCIÓN *in vitro* DE MACRÓFAGOS.

Se seleccionan los macrófagos 72 a 24 horas antes de la infección en cajas de cultivo (Costar) (de 24 pozos para los experimentos de inducción y de células formadoras de rosetas, y de 96 pozos para los experimentos de ELISA modificada). Durante este periodo las células se adaptan a las condiciones de cultivo. Se utilizan  $1 \times 10^5$  células por pozo para la inducción de receptores,  $1 \times 10^5$  para ELISA y  $5 \times 10^5$  para rosetas. En los experimentos de inducción se les añade 4  $\mu$ ci de timidina tritiada a cada pozo.

En el momento de la infección, se lavan las células y se agrega el inoculo en una relación de 5 levaduras por macrófago. Se permite la adherencia durante 1 hora a 4°C. Se lavan para eliminar las levaduras no adheridas, se agrega medio de cultivo y se incuban a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante diferentes tiempos: 0', 5', 15', 30', 60' y 120'. Una vez transcurrido el tiempo de fagocitosis se procesan como se indica más adelante para los diferentes métodos.

Para control de la viabilidad de Histoplasma, los inoculos se sembraron por plaqueo en cajas de Petri con BHI-A después de realizada la infección. Se incuban por 2-3 semanas a temperatura ambiente y se observa la conversión a fase miceliana.

### MARCAJE DE PROTEÍNAS MEMBRANALES CON <sup>125</sup>I.

Al término de la cinética de ingestión se lleva a cabo el marcaje radioactivo con <sup>125</sup>I por el método de iodación superficial modificada por Hubbard (64) usando lactoperoxidasa-glucosa oxidasa para marcar los insulina

de tirosina de las proteínas expuestas en la membrana externa. La iodación se lleva a cabo a 4°C, temperatura a la cual no hay fagocitosis, evitando así la marcación de proteínas internas.

Los pasos que se siguen para el marcaje son los siguientes:

1. Se lavan las células con PBS.
2. Se adicionan 15  $\mu$ l de la enzima lactoperoxidasa a pH 7.2.
3. Se añade enseguida el  $^{125}\text{I}$  previamente neutralizado a razón de 50  $\mu\text{Ci}$  por  $1 \times 10^6$  células aproximadamente.
4. Se agregan 8  $\mu$ l de glucosa-oxidasa por  $1 \times 10^6$  macrófagos y 45  $\mu$ l de glucosa.
5. Se dejan los cultivos en hielo de 30 a 45 minutos.
6. Se lavan tres veces con yoduro de potasio (KI) para detener la reacción.
7. Para solubilizar las proteínas marcadas se agregan 25  $\mu$ l de NP-40-PMSF-Metanol.
8. Se dejan en hielo 30 minutos.
9. Se agregan 30  $\mu$ l de coctel de electroforesis.
10. Se depositan en tubos Eppendorf de 1 ml de capacidad.
11. Se hierven durante 4 minutos.
12. Se centrifugan a 10,000 rpm durante 15 minutos.
13. Se guardan en viales de plomo a -70°C.

#### Obtención de Cuentas Totales.

Una vez centrifugadas las muestras, se separa el sobrenadante, donde se encuentran las membranas celulares (en el precipitado quedan las levaduras y los organelos celulares). Se toman alícuotas del sobrenadante y



doble. Toda la corrida se hace con agitación y en refrigeración.

Al terminar la corrida se tiñen los geles con azul de Coomassie dejándolos toda la noche. Se destiñen con ácido acético al 10% durante 12-24 horas, o calentando durante 1-2 horas, hasta que los geles se vuelvan transparentes. Se dejan de 2 a 6 horas en dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.2% para endurecerlos. Para secarlos se colocan entre dos hojas de papel celofán remojadas en carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 5% en un secador de geles Bio-Rad.

#### AUTORRADIOGRAFÍA.

Los geles ya secos, se colocan en un cuarto oscuro en contacto con una placa radiosensible (Kodak) previamente sensibilizada con la luz de un Flash, dentro de un cassette hermético. Se mantiene cerrado a temperatura de  $-70^\circ\text{C}$  durante 5 días aproximadamente. Transcurrido ese tiempo se revela la placa en un cuarto oscuro, colocando la placa en la solución de revelado durante 4.5 minutos; se lava con agua corriente y posteriormente se pasa la placa a la solución fijadora por 9 minutos, dejándose al final 30 minutos en agua corriente con agitación.

#### PRUEBA DE ELISA MODIFICADA.

Para esta prueba se siembran los macrófagos ( $1 \times 10^5$ ) en placas de plástico de 96 pozos. La infección se realiza de manera idéntica a la descrita previamente para la iodación de proteínas de superficie. Una vez transcurrido el tiempo deseado de fagocitosis, los cultivos se lavan y se fijan con metanol durante 10 minutos. Se lavan con PBS y se les añaden 100  $\mu\text{l}$  de albúmina sérica bovina (ASB) al 5%. Se incuban durante 30 minutos a tempe-

ratura ambiente y se lava nuevamente 6 veces con PBS-Tween. Posteriormente se agregan 50  $\mu$ l de anti-IgG conjugada a peroxidasa a cada pozo y se incuban a 37°C durante una hora. Se lavan 6 veces con PBS-Tween. Se añaden 50  $\mu$ l del sustrato (ortofenilendiamina). Se permite que se lleve a cabo la reacción en la oscuridad hasta que se desarrolle el color y se lee en un lector de ELISA a 490 nm.

Como testigos para estos experimentos se usaron macrófagos sin infectar, macrófagos infectados con levaduras sin opsonizar y macrófagos más la tex, añadiendo este último en la misma relación: 5 partículas por macrófago.

#### CELULAS FORMADORAS DE ROSETAS.

La infección se realiza de la misma manera que para los métodos descritos anteriormente. Los macrófagos se siembran en cajas de 24 pozos. Una vez transcurrido el tiempo de fagocitosis, los cultivos se lavan con PBS y se les añaden 250  $\mu$ l de eritrocitos de carnero previamente sensibilizados con hemolisina, con el objeto de opsonizarlos y que se adhieran a los macrófagos a través del receptor Fc.

Los macrófagos se colocan sobre hielo desde el momento que salen de la incubadora, y se mantienen a 4°C hasta el momento de contarlos al microscopio, para evitar la ingestión de eritrocitos por el macrófago. El conteo de las rosetas se hace directamente en la caja de cultivo en un microscopio invertido con el objetivo de 40x, considerando positivas aquellas células con más de 4 eritrocitos adheridos a la membrana.

Se usaron los mismos controles que en los otros experimentos y además

uno con macrófagos más eritrocitos no opsonizados, para descartar la formación de rosetas espontáneas.

## RESULTADOS

### DETERMINACION DEL TIEMPO DE GENERACION DE LA LINEA CELULAR J774.

La determinación del número de células a diferentes tiempos de cultivo, mostró que el número de células no varía entre el número inicial y el obtenido a las 48 horas de cultivo, por lo que consideramos ese tiempo como el periodo de adaptación que presenta la línea de macrófagos para poder duplicarse. Para el cálculo del tiempo de generación, se tomó como tiempo 0' el número de células existentes al final de la fase de adaptación, o sea las 48 horas de cultivo. Los resultados encontrados empleando la fórmula descrita en Materiales y Métodos expresan que el número de macrófagos al tiempo 0' es de 635,412, y el número de macrófagos a las 48 h de 2,625,000; luego el valor de (a)  $\log_2$  al tiempo 0' (5.8030) (3.3219) es igual a 19.27 y el valor de (b)  $\log_2$  al tiempo 48 h (6.4191) (3.3219) es igual a 21.32. La diferencia (b-a) es de 2.05 que es el valor final para la incógnita (c). Aplicando la fórmula referida, el cociente entre el tiempo 48 h y el valor (c) dió un tiempo de generación de 23.4 h.

### CUANTIFICACION DE ADN Y PROTEINAS EN MACROFAGOS.

La Tabla 1 muestra los datos obtenidos en este experimento donde se puede observar que la relación protefna/ADN por célula varió con los días de cultivo, como ocurre normalmente debido a las diferentes fases del ciclo celular por las que atraviesan las células. La cantidad total en  $\mu\text{g}$  de protefna y ADN, mostró un aumento proporcional al de crecimiento celular.

TABLA 1. CUANTIFICACION DE ADN Y PROTEINAS EN MACROFAGOS DE LA LINEA CELULAR J774.2.

Tiempo	Nº de células	pg proteína por célula	pg ADN por célula	Proteína/ADN	µg de pro- teína total	µg de ADN total
0'	375,000	112	7.1	15.7	$42 \times 10^3$	$2.6 \times 10^3$
24 h	400,000	340	6.7	50.7	$13 \times 10^4$	$2.6 \times 10^3$
48 h	635,412	859	8.2	104.7	$54 \times 10^4$	$5.2 \times 10^3$
96 h	2,625,000	574	6.8	84.4	$14.9 \times 10^5$	$17 \times 10^3$

El número de células se cuantificó por conteo en cámara de Neubauer por la técnica de exclusión de azul tripano. El ADN fue determinado por la técnica de la difenilamina y las proteínas por la técnica de Lowry. Ver detalles en Materiales y Métodos.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD OPSONIZANTE.

La actividad específica de la IgGs anti-Histoplasma totales y sus subclases, fue probada por la técnica de aglutinación indirecta utilizando una anti-IgG de naturaleza IgM. La Tabla 2 muestra los resultados de la prueba de aglutinación, observándose que las diferentes subclases de IgGs presentan reactividad a la prueba. Se seleccionó de cada inmunoglobulina la dosis intermedia opsonizante para la realización de la mayoría de los experimentos. Utilizando un número constante de levaduras ( $2.35 \times 10^6$ ), la dosis opsonizante para las IgGs totales fue de 1.8  $\mu$ g de proteína; para IgG<sub>1</sub> de 1.25  $\mu$ g; para IgG<sub>2a</sub> de 1.25  $\mu$ g y para IgG<sub>2b</sub> de 10  $\mu$ g.

#### ENSAYOS DE MARCAJE DE PROTEINAS DE MEMBRANA DE MACROFAGOS CON <sup>125</sup>I.

##### CUENTAS TOTALES DE <sup>125</sup>I.

Las cuentas totales de <sup>125</sup>I fueron corregidas en función de la cantidad de macrófagos (dada por las cuentas de <sup>3</sup>H-timidina), por el cociente de las cuentas  $\alpha$  (<sup>125</sup>I) entre las  $\beta$  (<sup>3</sup>H-timidina). Se realizaron 7 experimentos de los cuales, los 4 primeros sirvieron para la estandarización del método.

Inicialmente se trató de dilucidar si existían diferencias entre las dos cepas de H. capsulatum de distinta virulencia, opsonizadas. En la Fig. 1, se observa la distribución de las cuentas durante la cinética de tiempo de fagocitosis de las dos cepas empleadas. El análisis de estos resultados nos sirvió para demostrar que no existen diferencias entre ambas cepas, por lo que el resto de los experimentos se realizaron utilizando una sola cepa. Se observa que a los 15 minutos de infección, existe para

**TABLA 2. ACTIVIDAD OPSONIZANTE DE LAS IgGs ANTI-Histoplasma PURIFICADAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.**

Subclases de IgG	Diluciones de las IgG ( $\mu$ g de protefna)							
	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	0.15
IgG <sub>1</sub>	-	-	-	+	+	+	-	-
IgG <sub>2a</sub>	-	-	-	±	+	±	-	-
IgG <sub>2b</sub>	+	+	+	-	-	-	-	-

La actividad fué medida por la técnica de aglutinación de Ko zel y Mc Gaw: se colocan diluciones de la IgG a probar y se agrega un número constante de levaduras ( $2.35 \times 10^6$ ); la aglutinación se realiza añadiendo después una anti IgG de clase IgM.

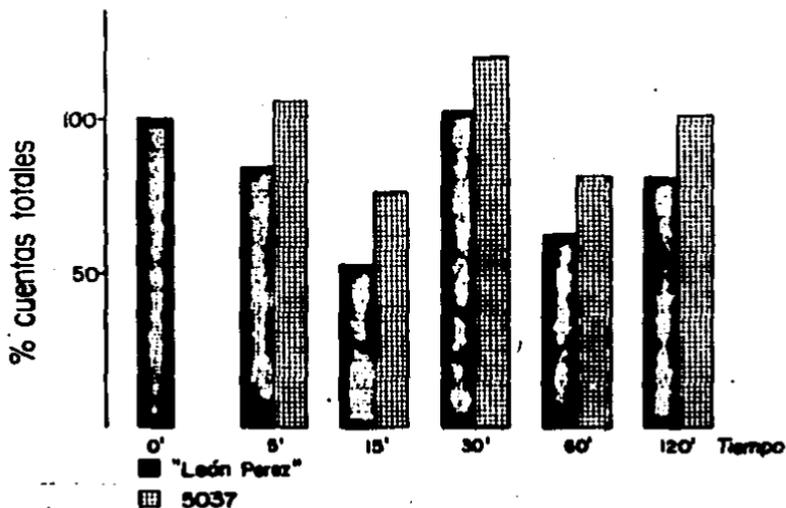


FIGURA 1. MARCAJE DE PROTEINAS DE MEMBRANA DE MACROFAGOS CON  $^{125}\text{I}$ : CUENTAS TOTALES DE  $^{125}\text{I}$ . Se obtuvieron las cuentas totales de las proteínas membranales de los macrófagos marcados por la técnica de la lactoperoxidasa-glucosa oxidasa, durante la infección *in vitro* con levaduras de *H. capsulatum* opsonizadas. Cepa "León Pérez" (> virulencia) cepa 5037 (< virulencia). Las cuentas fueron corregidas en función de la cantidad de macrófagos dada por las cuentas de  $^3\text{H}$ -timidina.

ambas cepas un caída importante de las cuentas, recuperándose éstas a los 30 minutos, con una caída posterior a los 60'. La figura 2 muestra el promedio de los resultados obtenidos con 3 experimentos utilizando la cepa "León Pérez" opsonizada y sin opsonizar. Se observa un comportamiento distinto entre las levaduras opsonizadas y sin opsonizar, ya que para las primeras se repite la caída de las cuentas radioactivas a los 15 minutos, mientras que para las últimas la caída ocurre hasta los 60 minutos. Se realizó un tercer tipo de experimento con levaduras vivas y muertas sin opsonizar. Los resultados se muestran en la figura 3 observándose que para las levaduras vivas, las cuentas disminuyen a los 15 minutos, mientras que para las muertas caen más tempranamente, a los 5 minutos.

En todos los experimentos apreciamos un incremento en las cuentas totales de  $^{125}\text{I}$  (30, 60 y 120 minutos) después del tiempo de caída de las mismas. La magnitud de este aumento en las cuentas totales varió de un experimento a otro debido, probablemente, a problemas en el manejo de la metodología.

#### AUTORRADIOGRAFIAS DE LAS ELECTROFORESIS.

En los experimentos de marcaje de receptores con  $^{125}\text{I}$ , nos interesaba observar cuáles y cuántos receptores participan en el proceso. El análisis autorradiográfico de las membranas marcadas y sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (Figs. 4 y 5) muestra que durante la infección, utilizando las dos cepas de *Histoplasma*, se observan dos bandas localizadas entre 14000 y 20000 Daltons de peso molecular, que en el transcurso de la misma desaparecen a los 15 y 30 minutos, volviendo a observarse en los tiempos finales.

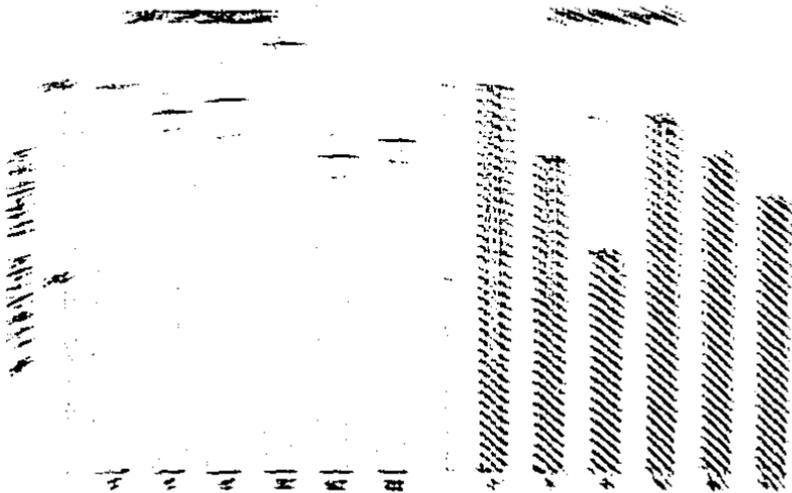
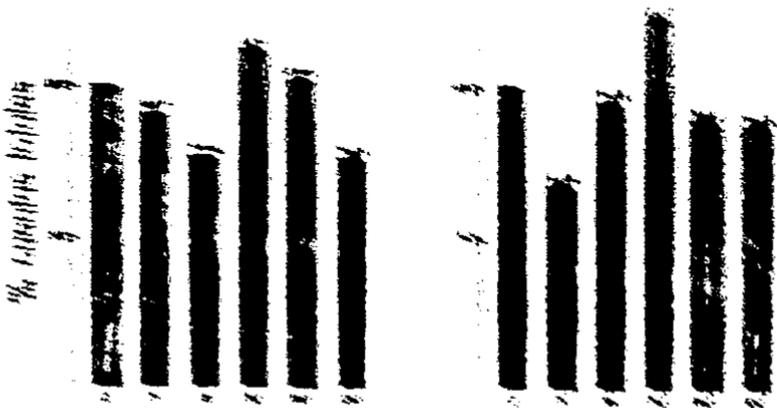


FIGURA 2. CUENTAS TOTALES DE  $^{125}$ I. Se determinaron las cuentas totales de las proteínas membranales de los microorganismos mediante por la actividad de la lactoperoxidasa-glucosacidasa durante la infección con *H. capsulatum*, cepa León Pérez, opsonizadas y sin opsonizar. Las cuentas fueron corregidas en función de la cantidad de  $^3$ H-timidina.



The following table shows the percentage of respondents who answered "Yes" to the question "Do you think the government should...". The data is presented in two columns, corresponding to the two bar charts above.

Response	Percentage (Left Chart)	Percentage (Right Chart)
Yes	85%	85%
No	75%	65%
Don't know	65%	80%
Other	95%	95%
Refuse to answer	80%	75%
Invalid	70%	70%

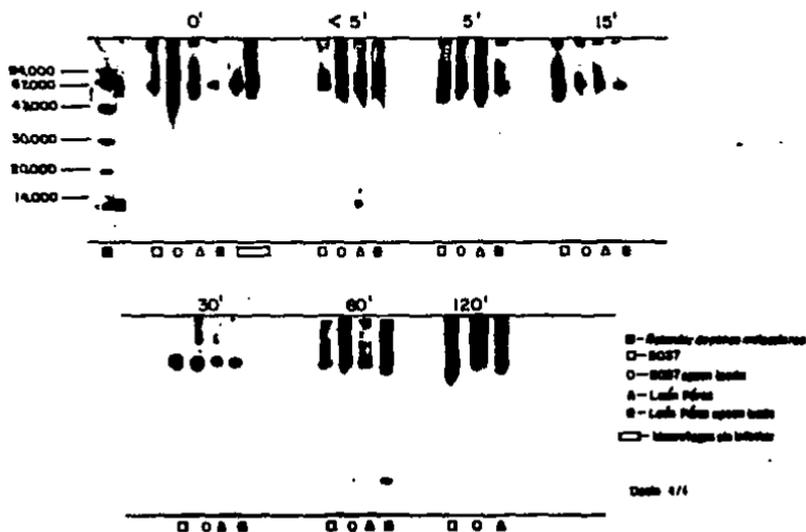


FIGURA 4. AUTORADIOGRAFIA DE LA ELECTROFORESIS CON SDS de las proteínas membranales de macrófagos infectados con levaduras de *H. capsulatum* cepa 5037 (< virulenta) y cepa "León Pérez" (> virulenta) opsonizadas y sin opsonizar.

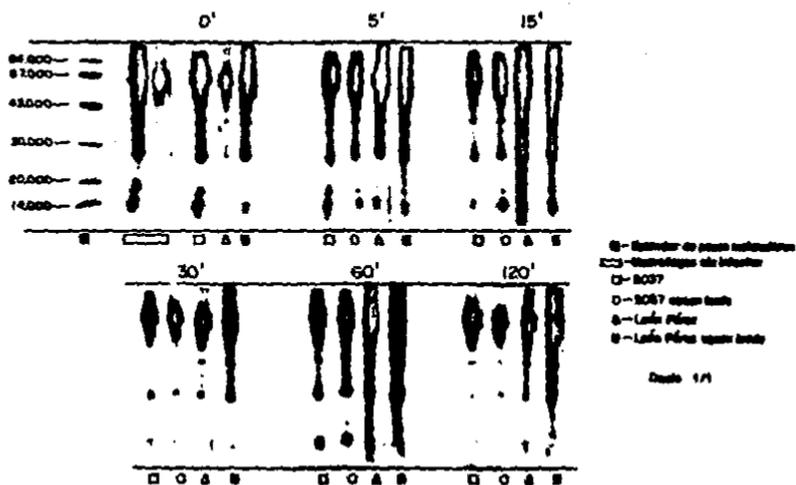


FIGURA 5. AUTORADIOGRAFIA DE LA ELECTROFORESIS CON SDS de las proteínas membranales de macrófagos infectados con levaduras de *H. capsulatum* cepa 5037 (< virulenta) y cepa "León Pérez" (> virulenta) opsonizadas y sin opsonizar.

#### PRUEBA DE ELISA MODIFICADA.

Con el interés de confirmar la cinética de tiempo de fagocitosis de las levaduras opsonizadas, empleamos una prueba de ELISA modificada, la cual permitiría detectar las levaduras mientras se hallan fuera del macrófago. Utilizamos al macrófago adherido e infectado con las diferentes subclases de IgG, y los respectivos controles, como antígeno fijo a fase sólida. En cada tiempo de infección se añadió la anti-IgG acoplada a peroxidasa para determinar el tiempo en que desaparecen las levaduras opsonizadas, fenómeno que se evidencia por la disminución de la intensidad de la reacción proporcionada por la enzima más su sustrato.

Estos experimentos se realizaron con dos diferentes variables: inicialmente se procedió a realizar la prueba con 3 concentraciones distintas de macrófagos ( $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$ ) manteniendo la relación macrófago/hongo de 1:5. Los resultados se observan en la Figura 6 (A y B). Posteriormente se probó un número constante de macrófagos ( $1 \times 10^5$ ) y diferentes dosis de las subclases de IgG opsonizante (Fig. 7). Los resultados muestran que las IgGs anti-Histoplasma empleadas en las tres concentraciones de macrófagos (Fig. 6A), presentan una cinética similar a la observada en los experimentos con <sup>125</sup>I, destacando que en el tiempo 0 minutos se observan las lecturas de máxima intensidad de reacción (D.O.), mientras que en los tiempos de 15 y 30 minutos se observan las mínimas. La IgG<sub>2a</sub> fue la que presentó lecturas más bajas en el tiempo 0 minutos (tiempo de adherencia). Por lo general, las densidades ópticas menores, en los experimentos utilizando las 3 IgGs, fueron a los 15 minutos de infección. La IgG normal presenta una cinética similar con un tiempo de lectura mínima entre los 30 y

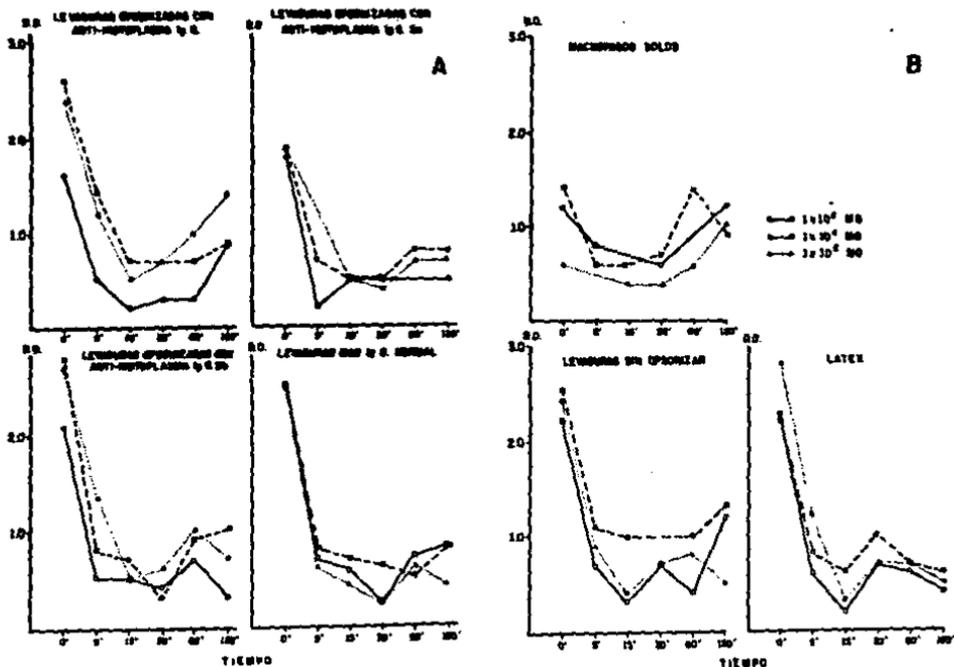


FIGURA 6. DETERMINACION DE LA MOVILIZACION DE RECEPTORES Fc POR LA PRUEBA DE ELISA MODIFICADA. Se emplearon 3 concentraciones distintas de macrófagos ( $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$ ) con una relación macrófago:hongo constante de 1:5.  
 A. Fagocitosis de levaduras opsonizadas con IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> anti-Histoplasma y con IgG normal. B. Controles: macrófagos sin infectar, levaduras sin opsonizar y latex.

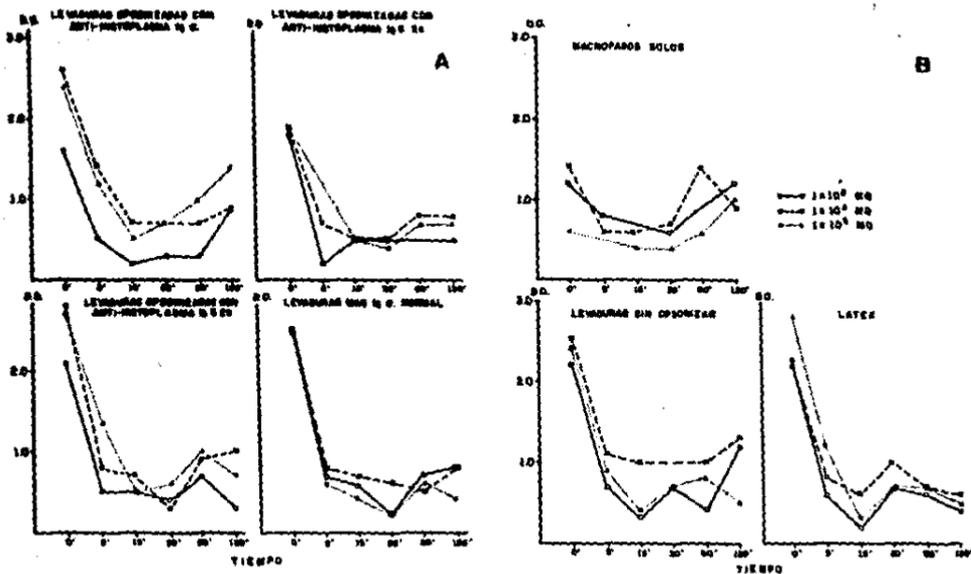


FIGURA 6. DETERMINACION DE LA MOVILIZACION DE RECEPTORES Fc POR LA PRUEBA DE ELISA MODIFICADA. Se emplearon 3 concentraciones distintas de macrófagos ( $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$ ) con una relación macrófago:hongo constante de 1:5.

A. Fagocitosis de levaduras opsonizadas con IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> anti-Histoplasma y con IgG normal. B. Controles: macrófagos sin infectar, Levaduras sin opsonizar y latex.

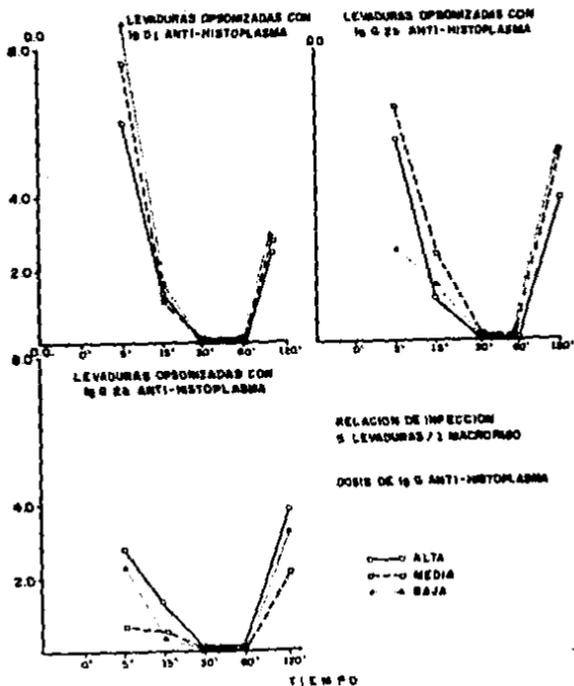


FIGURA 7. DETERMINACION DE LA MOVILIZACION DE RECEPTORES Fc POR LA PRUEBA DE ELISA MODIFICADA. Se emplearon 3 dosis opsonizantes (alta, media y baja) de IgG<sub>2</sub> anti-Histoplasma.

60 minutos. La cinética observada en los controles (Fig. 6B) muestra que los macrófagos sin infectar tienen una distribución de lectura poco variable, con lecturas bajas en el tiempo 0, similares a las finales. Los macrófagos infectados con levaduras sin opsonizar y con latex, muestran una cinética parecida a la observada con las levaduras opsonizadas con las subclases de IgGs.

Al utilizar una sola dosis de macrófagos con diferentes concentraciones de IgGs, los resultados son más uniformes para las 3 dosis de IgG y presentan una cinética más homogénea con disminuciones críticas en la densidad óptica empezando a los 15 y culminando a los 30 y 60 minutos, pero con una recuperación general, en todos los experimentos, a los 120 minutos.

#### CELULAS FORMADORAS DE ROSETAS.

La participación de los receptores Fc fue estudiada por último, por la técnica de formación de rosetas, basada en que los macrófagos tienen la capacidad de formar rosetas con eritrocitos opsonizados empleando al anticuerpo como puente. Para esta prueba se utilizaron para opsonizar las levaduras, IgG<sub>1</sub> e IgG totales anti-Histoplasma.

La figura 8 muestra los resultados de 3 experimentos, donde se observa que los macrófagos infectados con levaduras opsonizadas con IgG<sub>1</sub> anti-Histoplasma, presentan una disminución importante de receptores Fc disponibles a los 15 minutos para formar rosetas con los eritrocitos opsonizados, volviéndose a manifestar estos receptores a partir de los 30 minutos de infección. La misma cinética se observa cuando se usan IgGs totales anti-Histoplasma. Sin embargo, los controles representados por macrófagos

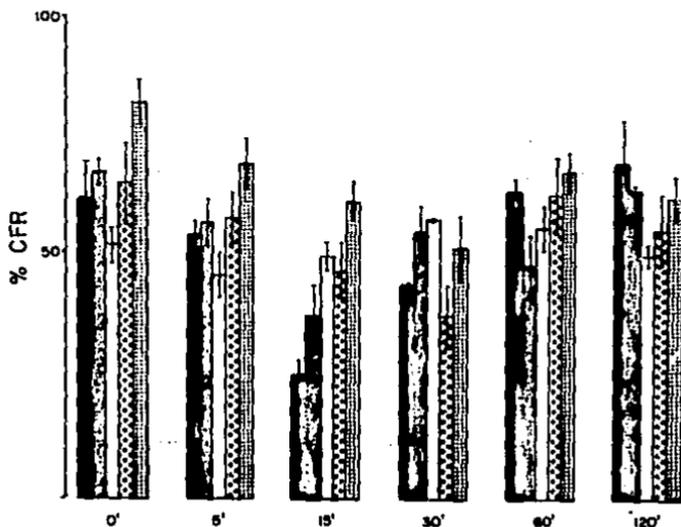


FIGURA 8. DETERMINACION DE LA MOVILIZACION DE RECEPTORES Fc POR CELULAS FORMADAS DE ROSETAS. Se emplearon IgG<sub>1</sub> e IgG totales anti-Histoplasma e IgG normal. Promedio y error estándar de tres experimentos.

-  IgG anti-Histoplasma
-  IgG totales anti-Histoplasma
-  IgG normal
-  Levaduras sin opsonizar
-  Macrófagos sin infectar

no infectados, macrófagos infectados con levaduras sin opsonizar y macrófagos infectados con levaduras más IgG normal, no presentan variaciones críticas en la formación de rosetas a lo largo del tiempo de infección. Cabe mencionar que al parecer, las levaduras solas cointernalizan receptor Fc al ser fagocitadas, ya que existe una disminución en el número de rosetas aunque menor que la observada para las IgGs específicas, a los 15 y 30 minutos de infección.

## DISCUSION

Parece ser que el destino final de las partículas ingeridas por los macrófagos, está relacionado con el tipo de receptor al que se adhirieron (29). El receptor para la fracción Fc de la IgG es uno de los más relevantes en la ingestión de parásitos, particularmente de las bacterias extracelulares encapsuladas como Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis y estreptococo grupos A y B (29).

Sin embargo, se ha visto que en algunos parásitos intracelulares como Toxoplasma gondii, los mecanismos oxidativos solo se disparan si es fagocitado a través del receptor Fc, lo que indica la importancia de determinar la fagocitosis de este tipo de parásitos mediante esta vía (66). Los sitios específicos de unión no solo son importantes por su efecto en la fagocitosis, sino por el papel que juegan en la regulación de la quimiotaxis, generación de productos tóxicos de oxígeno ( $O_2^-$ ,  $OH^+$ ,  $H_2O_2$ ,  $O^-$ ) y secreción de productos celulares como prostaglandinas y leucotrienos como el SRS-A (67, 68, 69). Algunos receptores permiten la adherencia, otros pueden ser importantes para que se lleve a cabo la fusión fagosoma-lisosoma, la acidificación de la vacuola o la degradación intracelular (29).

El presente estudio fue orientado a aclarar la participación de los receptores Fc de los macrófagos en la ingestión del parásito intracelular H. capsulatum.

Nuestros resultados apoyan la participación de los receptores Fc en la fagocitosis de este hongo.

Dada la heterogeneidad que presentan las poblaciones de macrófagos ob

tenidos de cultivos primarios, se planteó la necesidad de trabajar con una línea celular de macrófagos (J774.2), pues presentan la ventaja de contar con una población homogénea y bien caracterizada. Algunas de sus características son: tener una alta capacidad fagocítica, formar rosetas con eritrocitos cubiertos con IgG, poseer cuando menos receptores FcRI y FcRII para IgGs, ser secretora de lisozima, activadora de plasminógeno,  $\beta$ -glucuronidasa, etc. (70a).

En la literatura se encuentra reportado un tiempo de generación de 26.7 h para la línea celular J774.1 (70b), determinado por el método de incorporación de  $^3\text{H}$  timidina. Aunque la línea J774.2 proviene del mismo reticulosarcoma nos vimos en la necesidad de caracterizar, en nuestro laboratorio, su tiempo de generación para establecer las condiciones de cultivo y la adherencia e infección de estas células, ya que para ésta el tiempo de generación reportado era de 16 horas (70a). Se encontró un tiempo de generación de 23.4 h, tiempo muy parecido al reportado para la línea J774.1. Para confirmar el tiempo de generación obtenido, considerando las posibles imprecisiones a que se presta el método de conteo directo de células, se cuantificaron al ADN y las proteínas, encontrando una correlación satisfactoria (ver Tabla 1).

Para garantizar que las IgGs específicas opsonizasen a las levaduras del hongo, se utilizó una prueba de aglutinación indirecta, realizándose ésta con una anti-IgG de clase IgM puesto que las IgGs no son aglutinantes. En el procedimiento de purificación de IgGs la inmunoglobulina que obtuvimos en mayor cantidad fue la IgG<sub>1</sub> y ésta, junto con la IgG<sub>2a</sub>, fueron las que presentaron mayor sensibilidad pues sus dosis opsonizantes fueron de

1.25  $\mu\text{g}$ , mientras que la  $\text{IgG}_{2\text{b}}$  requirió de una dosis de hasta 10  $\mu\text{g}$  de proteína (ver Tabla 2).

Una vez confirmadas y estandarizadas la dosis, homogeneidad de la población celular de macrófagos y la actividad opsonizante de las  $\text{IgG}$ s purificadas, se procedió a la realización de los experimentos con el fin de determinar la participación de los receptores Fc.

Los experimentos de iodización de membrana (Figs. 1 y 2), los de ensayo inmunoenzimático (Figs. 6 y 7) y los de células formadoras de rosetas (Fig. 8), sugieren que los receptores Fc pueden participar pero no son indispensables en la ingestión del hongo. Al parecer cuando participan no la aceleran, ya que si así fuera, la entrada ocurriría en tiempos más cortos.

Con las tres metodologías utilizadas se corroboró que el hongo opsonizado o no, es ingerido a los 15-30 minutos y que posiblemente después ocurra una recuperación de los receptores. Es importante discutir, que de los ensayos utilizados, dos son de alta sensibilidad ( $^{125}\text{I}$  y ELISA) y el tercero (células formadoras de rosetas) es una técnica de menor precisión. Sin embargo por este simple hecho, y dada la uniformidad de los resultados encontrados, aumenta la fidelidad de los mismos.

Debido a problemas con el suministro de material radioactivo, solo pudieron realizarse 7 experimentos de marcaje de proteínas de membrana.

Dada la alta sensibilidad del método de marcaje con  $^{125}\text{I}$ , era importante conocer con exactitud el número de células a fin de evitar interferencias en la interpretación de los resultados. Debido a ello, se procedió a marcar las células con  $^3\text{H}$ -timidina para poder corregir las diferencias en-

tre un pozo y otro, considerando el cociente de las cuentas radiactivas del  $^{125}\text{I}$  entre las cuentas radiactivas  $\beta$  de la  $^3\text{H}$ -timidina.

En la etapa inicial de la investigación se trató de establecer cuál de las cepas de H. capsulatum deberíamos utilizar, basándonos en antecedentes del laboratorio, que cuenta con 2 cepas de Histoplasma de distinta virulencia (determinada por la DL50 en ratones BALB/c y C57) (71). La iodización de macrófagos infectados con las dos cepas empleadas ("León Pérez" y 5037) no mostró un comportamiento distinto entre ambas (Fig. 1), hecho que confirmó lo observado en un trabajo previo sobre fusión fagosoma-lisoma (72). Los experimentos posteriores se realizaron por este motivo con una sola cepa del hongo.

En los experimentos de iodización, observamos también que la ingestión del hongo muere acontece de manera más rápida (Fig. 3).

El hecho de que la movilización de proteínas de membrana sea menor y más lenta cuando el hongo está vivo, sugiere que el hongo vivo presenta algún componente o estructura que interfiere en su fagocitosis (Fig. 3). Los macrófagos son capaces de ingerir partículas en menos de 5 minutos. Al parecer H. capsulatum es ingerido más lentamente si está vivo, pero se comporta como cualquier partícula inerte al morir. Este retraso en su entrada ya se había observado en experimentos realizados en nuestro laboratorio, donde se estudió la cinética de infección en macrófagos peritoneales de ratón con H. capsulatum y Mycobacterium tuberculosis cepa H37Ra; los resultados mostraron el requerimiento de un período de tiempo mayor para H. capsulatum (73).

El análisis de las autorradiografías a lo largo de la cinética de

tiempo, no muestra variaciones aparentes en el conjunto de las bandas localizadas entre los 43,000 y 94,000 Daltons, donde deberían encontrarse los receptores Fc, cuyo peso molecular se encuentra entre 47,000 y 70,000 Daltons dependiendo del tipo (FcRI o FcRII) y del animal o línea celular de que provenga (13). Considerando que la mayoría de las proteínas de membrana, principalmente receptores, se encuentra en este rango de peso molecular, este tipo de autorradiografías no es muy útil para visualizar la participación de estos receptores, ya que su aparición y desaparición se ve enmascarada por el resto. Cabe aclarar, además, que debido a problemas en el manejo de la metodología no logramos montar una microtécnica de determinación de proteínas que nos permitiera conocer la cantidad exacta de proteína de cada muestra para poder comparar con precisión las variaciones de un carril a otro. Aún salvado este obstáculo se necesitaría hacer una electroforesis en doble dimensión, para observar los cambios individuales de cada proteína a lo largo del fenómeno. Sin embargo, se observan dos bandas ubicadas entre 14,000 y 20,000 Daltons que desaparecen entre los 15 y 30 minutos para reaparecer en los tiempos finales, y a cuya presencia no logramos otorgar una interpretación satisfactoria, considerando siempre, los errores metodológicos señalados anteriormente.

Los resultados a que llegamos con la técnica de ELISA, utilizando macrófagos como fase sólida y levaduras opsonizadas con las diferentes subclases de IgGs, muestran una cinética global igual a la encontrada con el método de iodización de receptores (Figs. 6 y 7), aunque, como se mencionó anteriormente, por ser de alta sensibilidad, presenta algunas interferencias. La utilización de macrófagos como fase sólida en la prueba de

ELISA no es novedosa; ya se ha empleado para una modificación de la prueba de NIF, con anticuerpos anti-macrófago acoplados a la peroxidasa (74). Ahora bien, nuestra modificación consiste en usar como revelador un conjugado anti-IgG-enzima para evidenciar las levaduras opsonizadas con IgG anti-Histoplasma en la superficie de los macrófagos adheridos al plástico; considerando que los macrófagos presentan alrededor de  $1 \times 10^5$  receptores Fc por célula (75), la realización de la prueba se hacía numéricamente factible.

En vista de que los resultados utilizando diferentes concentraciones de macrófagos no mostraron diferencias, se eligió la concentración de  $1 \times 10^5$  para los siguientes experimentos (Figs. 6A y 6B). Las diferentes concentraciones de IgGs opsonizantes anti-Histoplasma mostraron también resultados similares eligiéndose las dosis intermedias. El objetivo de usar diferentes subclases de IgGs era determinar la participación de los receptores FcRI y FcRII. Los resultados no mostraron diferencias importantes; al parecer, ambos receptores participan en nuestro sistema, aunque con la IgG1 se obtuvieron datos más homogéneos. Se ha reportado en varios modelos, que el FcRII específico para IgG1 e IgG2b, es el de mayor relevancia en la adherencia de microorganismos, así como para la ingestión y puesta en marcha del estallido respiratorio. Se sabe además, que los organismos que interactúan con él promueven la fusión fago-lisosomal, observándose un aumento de lisosomas secundarios (29). El FcRI se encuentra en mayor número entre los macrófagos activados, cuya capacidad pinocítica y fagocítica disminuye, como ha sido reportado para zimosan solo, zimosan cubierto con C<sub>3b</sub> y latex (76, 77, 80) lo que apoya la idea de algunos autores de que la activación de macrófagos es un proceso secuencial, represen-

tando la actividad tumoricida de los macrófagos la última etapa de su diferenciación (78).

La figura 6B muestra la cinética obtenida en los experimentos de ELISA de los macrófagos solos. Este control presenta una curva casi plana con leves fluctuaciones, lo cual era lógico esperar de células en estado de reposo. Los otros dos controles empleados, los macrófagos más latex o levaduras sin opsonizar, presentan curvas similares a las de los macrófagos infectados por levaduras opsonizadas con las distintas subclases. Al parecer, la fagocitosis debe estar disparándose por la vía de otros receptores y asimismo debe existir una cointernalización de receptores Fc, por lo que se observa una interferencia debida al pegado de la anti-IgG acoplada a peroxidasa a los receptores Fc restantes. Conociendo el antecedente de que la afinidad de la IgG monomérica para los receptores de la línea celular J774 es muy baja en comparación con la afinidad que tienen los complejos Ag-Ac (58), consideramos que no era necesario emplear una anti-IgG de naturaleza IgM acoplada a peroxidasa.

Finalmente, para descartar la posibilidad de que los fenómenos observados se debieran a interferencias propias de la alta sensibilidad de las dos pruebas empleadas, y en vista de la imposibilidad de repetir los mismos experimentos con las modificaciones ya planteadas para confirmar nuestros resultados, decidimos implementar una técnica menos fina que apoyara la ocurrencia de ellos. Utilizamos así la técnica de células formadoras de rosetas (Fig. 8) empleando solamente IgG<sub>1</sub> e IgG totales anti-Histoplasma para opsonizar las levaduras.

Los resultados efectivamente apoyan que el fenómeno de desaparición

de receptores encontrado es real, puesto que solo las IgG específicas presentan una disminución en el número de rosetas a los 15 y 30 minutos, mientras que ninguno de los controles muestra variaciones importantes en la cantidad de receptores libres para captar los eritrocitos opsonizados. Esto indica que las levaduras opsonizadas con IgG anti-Histoplasma se introducen junto con los receptores Fc disminuyendo considerablemente la cantidad de éstos en la superficie de los macrófagos, mientras que en los controles, aunque un cierto número de receptores debe ser cointernalizado en la vacuola fagocítica, quedan expuestos la mayoría, por lo que se observa un mayor número de rosetas.

Se desconoce cuáles pueden ser los receptores que participan en la ingestión de Histoplasma capsulatum no opsonizado. Sin embargo, puesto que es ingerido, debe existir por lo menos un receptor que medie en su ingestión y éste podría actuar sinérgicamente con el Fc durante la fagocitosis de las levaduras opsonizadas. Ellenberger y Nussenzweig (79) han descrito el fenómeno de "sinergia de receptores" al observar que si opsonizaban eritrocitos con IgG para promover su fagocitosis, se requerían alrededor de  $6 \times 10^4$  moléculas por glóbulo rojo, mientras que sólo necesitaban  $2 \times 10^3$  moléculas si los eritrocitos estaban cubiertos con 1000 moléculas de C3b. Sung y cols. (80) han reportado las diferencias que establecen al actuar más de dos receptores en un modelo en el que usaron zimosan y zimosan opsonizado.

Aunque los experimentos no fueron diseñados para observar el fenómeno de sinergismo, nuestros resultados sugieren que no existe tal fenómeno, puesto que en ese caso habría encontrar una entrada más rápida del hongo opsonizado. Esto nos sugiere que el receptor Fc funciona de manera indepen

diente y ello ha sido ya reportado en otro modelo infeccioso, el de la Leishmania donovani con macrófagos peritoneales de ratón, caso en el cual el receptor Fc funciona de manera independiente (81). Es importante aclarar que nuestros experimentos fueron realizados sincronizando el inicio de la fase de ingestión, permitiendo la adherencia del hongo a 4°C durante 1 hora. Se ha descrito que la adherencia en frío reduce la migración molecular en el plano de la membrana impidiendo la interacción de múltiples puntos de unión con el parásito (29). Por este motivo podríamos cuestionar asimismo el fenómeno de independencia en nuestro modelo.

Una observación común en todos los experimentos es que después de 30 minutos se presenta una recuperación de los receptores en la membrana plasmática. Las interpretaciones más razonables para explicar el fenómeno serían: 1ª que exista un reciclaje de los receptores como respuesta del macrófago al evento fagocítico, ó 2ª que por el proceso de activación del macrófago generado al iniciarse el fenómeno fagocítico, se estimule la síntesis de nuevos receptores. Mellman y cols. (37) han observado que la cantidad de receptor FcRII permanece en niveles muy bajos por más de 24 horas, sugiriendo que son degradados. En ausencia de ligando encuentran que el receptor se degrada en un  $t_{\frac{1}{2}}$  de 10 horas, mientras que en su presencia un 50% se degrada más rápidamente ( $t_{\frac{1}{2}}$  menor a 2 horas); se reciclan otros peptídeos de la membrana plasmática en tiempos de 18 a 22 horas, independientemente de si fueron fagocitados o no. Sin embargo, existen evidencias de que la membrana de vacuolas endocíticas puede empezar a reciclarse entre 5 y 10 minutos después de penetrar en la célula, antes de unirse a los lisosomas y aunque estas evidencias se han obtenido en endocitosis mediada por receptores, faltan estudios más completos que permitan conocer el tiem

po requerido para el reciclaje en el fenómeno "fagocitosis" y para cada receptor en particular.

En este modelo es mucho lo que queda por conocer, pero existen datos muy interesantes en otros modelos que apuntan hacia dónde deben ser dirigidos los trabajos que le den continuidad. Existen en la actualidad diversos grupos de investigación trabajando con otros parásitos intracelulares, que han señalado la importancia de otros receptores en el fenómeno fagocítico de estos parásitos, como por ejemplo los receptores para los distintos fragmentos de  $C_3$ , principalmente  $C_{3b1}$  ( $CR_3$ ), el receptor para glicoconjugados con residuos de manosa y/o fucosa (RMF) y para algunos componentes séricos como fibronectina y lactoferrina. Los resultados de estos grupos indican que el receptor para  $C_{3b1}$  y el RMF, además de los Fc, son los de mayor importancia. Aunque los modelos más estudiados en este sentido son los de los protozoarios intracelulares Toxoplasma, Leishmania y Trypanosoma, que desde el punto de vista filogenético se encuentran muy distantes de Histoplasma, presentan una serie de características en común como ser intracelulares, activadores de la vía alterna del complemento e inductores de una respuesta inmune predominantemente celular; además Histoplasma tiene galactomananas en su superficie. Esto nos induce a pensar que también deben compartir similitudes en cuanto al tipo de receptores que utilizan para infectar a los macrófagos. Por ello queremos responder en nuestros próximos trabajos a las siguientes preguntas: ¿cuántos y cuáles receptores intervienen en la fagocitosis de Histoplasma? ¿en qué circunstancias actúa cada uno, cómo lo hace y qué relación guardan entre sí? ¿existen otras células, además del macrófago, que presenten receptores para el parásito y qué papel juegan éstas en la infección in vivo? ¿qué diferencias hay entre

Los macrófagos activados y no activados con respecto al papel que juega cada uno de los receptores? ¿qué relación guardan los receptores con el desarrollo del estallido respiratorio? ¿qué implicaciones biológicas tiene cada uno en la infección in vivo?

Aunque existe un buen número de evidencias, directas e indirectas, que indican que la inmunidad del huésped en las micosis profundas depende principalmente de la inmunidad celular (82, 83) se conocen algunas que señalan a los anticuerpos como moléculas que ejercen un efecto positivo sobre la respuesta inmune en la histoplasmosis (57, 84, 85). Los anticuerpos específicos promueven la fagocitosis del hongo en algunas células; sin embargo, la ingestión y digestión de levaduras por macrófagos "inmunes" de ratón parecen ser independientes de los anticuerpos anti-Histoplasma circulantes (56).

Este trabajo es tan solo el inicio del estudio del papel de los receptores que participan en la fagocitosis de H. capsulatum. Consideramos de gran relevancia encontrar respuesta a las preguntas aquí planteadas para lograr una mejor comprensión de la relación inicial que establecen los macrófagos y las levaduras del hongo y sus implicaciones en la patogenia de la enfermedad.

## CONCLUSIONES

1. Los receptores Fc de macrófagos participan en la fagocitosis de Histoplasma capsulatum pero no aceleran su entrada.
2. El tiempo que requieren los macrófagos de la línea J774 para ingerir al hongo opsonizado es de 15 minutos.
3. No existen diferencias, con la metodología utilizada, entre las dos cepas de distinta virulencia ("León Pérez" > virulencia y 5037 < virulencia).
4. El hongo muerto se comporta como una partícula inerte por lo que su tiempo de entrada es más breve (5 minutos).
5. Además de los receptores Fc, deben estar participando otros receptores en el fenómeno fagocítico.
6. Una vez ingerido el hongo, aumenta el número de receptores en la membrana del macrófago, sugiriendo un fenómeno de reciclaje o bien de síntesis de novo de los receptores.

## ABSTRACT

Events involved in the phagocytosis of the yeast-phase of Histoplasma capsulatum are poorly understood. The kinetics of phagocytosis of this fungus and the participation of the macrophage Fc receptors were studied.

The yeast cells were incubated 30' at 37°C with anti-Histoplasma mouse antibodies (total IgGs, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub>). Normal IgG was used as control. Prior to internalization at 37°C the opsonized yeasts were washed several times, adjusted to  $5 \times 10^6$  and then dispensed on a macrophage monolayer ( $1 \times 10^6$  MØ) of a J774-2 cell line. Adherence was realized at 4°C, 1 h to synchronize the internalization of the inocula. The possible role of Fc receptors in this process was observed by different methods: an enzymatic iodination ( $^{125}\text{I}$ ) of membrane proteins, an enzyme immunoassay and rosette forming cells.

Our results showed a critical disappearance of the Fc receptors on the macrophage surface at 15' of infection when specific IgGs were used. Differences in the kinetic of phagocytosis were detected by processing live and dead yeast cells, since viable cells internalization was slower.

These findings suggest the importance of Fc receptors in the phagocytosis of Histoplasma and establishes differences in the interaction of the yeast cells with macrophages.

## **A P E N D I C E**

**APENDICE**  
**MEDIOS, REACTIVOS Y SOLUCIONES**

**BHI (Infusión Cerebro-Corazón)**

BHI (Bioxon)-----	37 g
Agua destilada -----	1 l
Suplemento: L-cistefna hidrociorada -----	1 g
Glucosa -----	10 g
Gentamicina (Lab. Sheramex) -----	100 µg/ml

El medio BHI se hidrata y se esteriliza en autoclave a 15 libras de presión durante 25 minutos y posteriormente se añade el suplemento esterilizado por filtración con membrana Millipore de 0.22 µm.

**BHI-A (Infusión Cerebro-Corazón-Agar)**

BHI-Agar (Bioxon) -----	52 g
Agua destilada -----	1 l

Se suplementa igual que el anterior y el suplemento se agrega después de esterilizar en autoclave. Antes de que gelifique se distribuye en cajas de Petri estériles.

**MEND (Medio de Eagle mínimo, modificado por Dulbecco)**

MEND (Microlab) -----	13.4 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> ) -----	3.7 g
Agua tridestilada y desionizada -----	1 l
Suplemento: Suero fetal de ternera (Lab. <u>In Vitro</u> ) -----	100 ml
L-glutamina -----	10 g

Penicilina (Lakeside) -----	100 U/ml
Estreptomicina (Lakeside) -----	100 U/ml
Fungizona (Gibco) -----	50 µg/ml

El medio MEMD se hidrata, se le añade el bicarbonato de sodio, la L-glutamina, los antibióticos y se esteriliza por filtración con membrana Millipore de 0.22 µm. Antes de usarlo, se le añade el suero fetal de ternera estérilmente.

Amortiguador de Fosfatos (PBS)

Cloruro de sodio (NaCl) -----	8 g
Cloruro de potasio (KCl) -----	0.2 g
Fosfato de sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) -----	0.95 g
Fosfato de ácido de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) -----	0.2 g
Agua destilada, c.b.p. -----	1 1

Solución de Azul de Tripano

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

Marcaje de Células con Timidina Tritiada

<sup>3</sup>H-metil-timidina (New England Nuclear) actividad específica  
 6.7 µCi/mmol, lote Nr. 1258.042 ----- 4 µCi/ml

La timidina viene en agua estéril (5 mCi en 5 ml); se disuelve en MEMD para obtener una concentración de 4 µCi/ml.

### Líquido de Centelleo

POPOP (1,4 bis 2-(5-feniloxazolil) -benceno; fenil-oxazolifenil-oxazolilfenil)(Sigma) -----	1.2 g
PPO (2,5 difeniloxazolil) (Sigma) -----	12 g
Tolueno -----	3 l

### Cuantificación de ADN

#### Acido Perclórico IN

Acido perclórico (70-72%) -----	8.62 ml
NaOH 0.3 N (1.2 g/100 ml) c.b.p. -----	100 ml

#### Difenilamina

Difenilamina -----	1.5 g
Acido acético glacial -----	100 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado -----	1.5 ml

Se prepara al momento de usarlo y se guarda en la oscuridad.

#### Acetaldehído

Acetaldehído (99% de pureza) -----	0.5 ml
Agua destilada -----	25 ml

Se guarda a 4°C.

#### Reactivo de Burton

Reactivo de Difenilamina -----	20 ml
Solución de acetaldehído -----	0.1 ml

Se prepara al momento de usarlo.

#### Estandares

Desoxinucleato de Na -----	0.2 mg
----------------------------	--------

NaOH 5 mM (0.02 g/100 ml) ----- 1 ml

Se guarda a 4°C. Se mezcla V/V con ácido perclórico 0.5 N para obtener una concentración final de 100 µg/ml.

### Anticuerpos Anti-Histoplasma

#### Amortiguador de Fosfato de Sodio pH: 8.0 0.1 M

Solución A: (0.2 M)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O ----- 27.6 g

Agua destilada c.b.p. ----- 1 l

Solución B: (0.2 M)

NaHPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ----- 53.6 g

Agua destilada c.b.p. ----- 1 l

Solución A ----- 26.5 ml

Solución B ----- 473.5 ml

Agua destilada ----- 500 ml

#### Amortiguador de Citratos 0.1 M

Acido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O) ----- 21 g

Agua destilada c.b.p. ----- 1 l

Se ajusta a diferente pH con la solución de:

Fosfato dibásico de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) ----- 17.8 g

Agua destilada ----- 1 l

#### Tris-HCl pH: 9.0

Trizma base (Sigma) ----- 6.055 g

Agua destilada c.b.p. ----- 1 l

Acido clorhídrico (HCl) (1 N) ----- 5 ml

### Marcaje de Proteínas de Membrana con $^{125}\text{I}$ .

Lactoperoxidasa (Sigma) -----	2 mg/ml (PBS 0.01 M)
Glucosa-oxidasa (Sigma) -----	15 U/ml (PBS)
Glucosa -----	0.9 mg/ml (PBS)
$^{125}\text{I}$ (Amersham) -----	10 mCi/10 $\mu\text{l}$
Ioduro de potasio (KI) -----	5 mM (PBS)
Nonidet P-40 (NP 40) (Sigma) -----	0.5 % (PBS)
Fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) (Sigma) -----	0.017 g
Metanol -----	1 ml

A 1 ml de metanol, se agregan 0.017 g de PMSF. De esta solución se colocan 100  $\mu\text{l}$  por cada 10 ml del NP-40 al 0.5%.

### Electroforesis

#### Solución de Acrilamida

Acrilamida -----	30 g
Bisacrilamida -----	0.8 g
Agua destilada c.b.p. -----	100 ml

#### Gel inferior (Volumen aproximado 29 ml)

Solución de acrilamida -----	9.66 ml
Tris-base 2M pH: 8.8 -----	5.5 ml
SDS (dodecilsulfato de sodio) al 10% -----	0.3 ml
Agua destilada -----	12.5 ml
Persulfato de amonio 10 mg/ml) -----	0.5 ml

Se desgasifica 2 minutos con agitación al vacío.

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) ----- 0.01 ml

Se desgasifica 2 minutos con agitación al vacío.

Se vacía a la cámara previamente montada y se deja gelificar.

Se coloca el "peine" formador de carriles y se prepara el gel superior.

Gel superior (Volumen aproximado 7.5 ml)

Solución de acrilamida ----- 0.8 ml

Tris-HCl 2M pH: 6.8 ----- 0.25 ml

SDS (dodecilsulfato de sodio) al 10% ----- 0.08 ml

Agua destilada ----- 6.46 ml

Persulfato de amonio (10 mg/ml) ----- 0.4 ml

Se desgasifica 2 minutos con agitación al vacío.

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) ----- 0.003 ml

Se vierte en la cámara y se deja gelificar.

Se retira el peine y se elimina el agua que resta.

Se llena la cámara con el amortiguador de trabajo Tris-glicina-SDS hasta las dos terceras partes; se colocan las muestras en los carriles y se termina de llenar la cámara.

En el primer carril se corren patrones electroforéticos de peso molecular conocido (Pharmacia Fine Chemicals A.B.)

Fosforilasa b -----	94,000 Daltons
Albúmina sérica bovina -----	67,000 Daltons
Ovalbúmina -----	43,000 Daltons
Anhidrasa carbónica -----	30,000 Daltons
Inhibidor de tripsina de soya -----	20,000 Daltons
$\alpha$ -lactoalbúmina -----	14,000 Daltons

### Amortiguador Tris-glicina (5x)

Tris base -----	12 g
Glicina -----	57.6 g
Agua destilada c.b.p. -----	1 l

### Solución de Trabajo

Amortiguador Tris-glicina 5x -----	200 ml
SDS al 10% -----	8 ml
Agua destilada c.b.p. -----	1 l

### Muestra Coctel

SDS -----	0.1 g
$\beta$ -mercaptoetanol* -----	100 $\mu$ l
EDTA (Acido etilendiaminotetra-acético) -----	0.0074 g
Glicerol -----	1 ml
Azul de bromofenol -----	una pizca
Tris HCl pH: 6.8 2M -----	0.256 ml
Agua destilada c.b.p. -----	10 ml

\*El  $\beta$ -mercaptoetanol se agrega en el momento de usarlo

### Tinción de Azul de Coomassie

Azul de Coomassie -----	0.3 g
Metanol -----	150 ml
Acido acético -----	50 ml

Preparación de las soluciones

Agua destilada	100 ml
Agua destilada	100 ml

Preparación de las soluciones

Agua destilada (100 ml)	100 ml
Agua destilada (100 ml)	100 ml

Preparación de las soluciones

Las soluciones para el experimento, deben de ser preparadas como se muestra en el siguiente cuadro.

Elige modificación

Amortiguador de fosfato salino pH: 7.2

Solución A	NaCl	100 g
	KCl	4 g
	CaCl <sub>2</sub>	1 g
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1 g
	Agua destilada	1 l
Solución B	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.6 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
	Agua destilada	1 l

Se mezclan 100 ml de la solución A con 100 ml de la Solución B y se añaden a 1 litro con agua destilada.

Solución de albúmina sérica bovina al 5%.

A 100 ml de amortiguador de fosfato salino pH: 7.2 se agregan 5 g de albúmina sérica bovina (Sigma).

Solución de PBS/Tween al 0.5%

A 1000 ml de amortiguador de fosfato salino pH: 7.2 se agregan 5 ml de Tween 20 (Sigma).

Solución de PBS/Tween/BSA al 0.5%

A 100 ml de la solución de PBS/Tween se agregan 0.5 g de albúmina sérica bovina (Sigma).

Amortiguador de citratos 0.1 M pH: 4.5

Solución A. Acido cítrico 0.1 M (21.01 g en 1000 ml de H<sub>2</sub>O)

Solución B. Citrato de sodio·2H<sub>2</sub>O 0.1 M (29.41 g en 1000 ml de H<sub>2</sub>O)

Se mezclan 28 ml de la Solución A con 22 ml de la Solución B y se afora a 100 ml.

Solución de sustrato

Amortiguador de citratos pH: 4.5 ----- 10 ml

O-fenilendiamina (Sigma) ----- 10 mg

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% ----- 4 µl

Se mezcla perfectamente y se protege de la luz.

Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M

Se agregan 5.55 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado a 100 ml de agua destilada.

Anti-IgG de ratón acoplada a peroxidasa (Sigma)

Se diluye según las indicaciones del preparado comercial.

Latex (Gibco)

Se usaron partículas de latex de 2  $\mu$  de diámetro.

Rosetas

Sangre de camero -----	90 ml
Citrato de sodio al 10% -----	10 ml

Se dejan reposar a 4°C durante 7 días

Día de uso:

Se lavan 2 ml de la suspensión de eritrocitos con amortiguador veronal-barbital-gelatina (G.V.B.) 3 veces a 1800 rpm durante 10 minutos.

Se prepara una suspensión al 2% con G.V.B. (0.25 ml del paquete lavado en 12.5 ml de G.V.B.

Hemolisina (Microlab; preparada en conejo y suspendida en glicerol, título 1:1200=1U). Se prepara una solución con 2U de hemolisina por mililitro. (0.05 ml de la hemolisina más 29.95 ml de G.V.B. = 2U hemolíticas).

Se mezcla V/V la suspensión de glóbulos rojos al 2% con la hemolisina preparada a 2U.

Se incuba a 37°C durante 30 minutos, agitando cada 10 minutos.

BIBLIOGRAFIA

1. Steinman R.M., Cohn Z.A. 1974. The metabolism and physiology of the mononuclear phagocytes. En: The Inflammatory Process. Zweifach G. W., Grant L., Mc Cluskey, R.T. (Eds.) N.Y. Academic Press 2ª Edición. Vol. 1, Cap. 8, pp. 449-510.
2. Sato V.L., Geffer M.L. 1981. Macrophages and the issue of antigen presentation. En: Cellular Immunology. Selected Readings and Critical Commentary. Addison-Wesley Publishing Co. Massachusetts. Cap. VI, pp. 301-307.
3. Adams D.O., Hamilton T.A. 1984. The cell biology of macrophage activation. Ann. Rev. Immunol. 2: 283-318.
4. Allison A.C., Davies P., de Petris S. 1971. Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis. Nat. New. Biol. 232: 153-157.
5. Stosel T.P., Pincus S.H. 1975. A new actin-binding protein: evidence for its role in endocytosis. Clin. Res. 23: 407 (Resumen).
6. Aggeler J., Werb Z. 1984. Ultrastructural aspects of phagocytosis by macrophages. En: Advances in Inflammation Research. Weissmann G. (Ed.) Raven Press, New York. Vol. 8, pp. 35-54.
7. Steinman R.M., Hellman I.S., Muller W.A., Cohn Z.A. 1983. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. J. Cell. Biol. 96: 1-27.
8. Michl J., Ohlbaum D.J., Silverstein S.C. 1976. 2-deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor-mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. I. Description of the inhibitory effect. J. Exp. Med. 144: 1465-1483.
9. Michl J., Ohlbaum D.J., Silverstein S.C. 1976. 2-deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor-mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. II. Dissociation of the inhibitory effects of 2-deoxyglucose on phagocytosis and ATP generation. J. Exp. Med. 144: 1484-1493.
10. Griffin F.M. Jr., Griffin J.A., Silverstein S.C. 1976. Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes. J. Exp. Med. 144: 788-809.
11. Unkeless J.C. 1977. The presence of two Fc receptors on mouse macrophages: evidence from a variant cell line and differential trypsin sensitivity. J. Exp. Med. 145: 931-947.

12. Diamond B., Yelton D.E. 1981. A new Fc receptor on mouse macrophages binding IgG<sub>3</sub>. J. Exp. Med. **153**: 514-519.
13. Leslie R.G.Q. 1982. The characterization of cell receptors for IgG. Immunol. Today, **3**(10): 265-267.
14. Bianco C., Nussenzweig V. 1977. Complement receptors. En: Contemporary Topics in Molecular Immunology. Porter R., Ada G. (Eds.). Plenum Press, N.Y. Vol. 6, pp. 145-176.
15. Ross G., Rabeellino E. 1979. Identification of a neutrophil and monocyte complement receptor (CR3) that is distinct from lymphocyte CR1 and CR2 and specific for a site contained within C3b1. Fed. Proc. **38**: 1467-1471.
16. Fearon D. 1980. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte and monocyte. J. Exp. Med. **152**: 20-25.
17. Wright S.D., Griffin F.M. Jr. 1985. Activation of phagocytic cells' C3 receptors for phagocytosis. J. Leukocyte, Biol. **38**: 327-339.
18. Stahl P., Schlesinger P.H., Sigardson E., Rodman J.S., Lee Y.C. 1980. Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: characterization and evidence for receptor recycling. Cell, **19**: 207-215.
19. Sung S-S.J., Nelson R.S., Silverstein S.C. 1981. Role of mouse peritoneal macrophage mannose receptor in the binding and phagocytosis of yeast cell walls. J. Cell. Biol. **91**: 112a.
20. Twonsend R., Stahl P. 1981. Isolation and characterization of a mannose/N-acetyl-glucosamine/fucose binding protein from rat liver. Biochem. J. **194**: 209-315.
21. Gudewicz P.W., Molnar J., Lai M.Z., Beezhold D.W., Siefing G.E. Jr., Credo R.B., Lorand L. 1980. Fibronectin-mediated uptake of gelatin-coated latex particles by peritoneal macrophages. J. Cell. Biol. **87**: 427-433.
22. Villiger B., Kelley D.G., Engleman W., Kuhn C., Mc Donald J.A. 1981. Human alveolar macrophage fibronectin: synthesis, secretion, and ultrastructural localization during gelatin-coated latex particle binding. J. Cell. Biol. **90**: 711-720.
23. Czop J., Fearon D. 1982. Augmentation of phagocytosis by a specific fibronectin fragment that links particulate activators to the fibronectin adherence receptor of human monocytes. J. Immunol. **129**: 2678-2684.

24. Broxmeyer H. 1979. Lactoferrin acts on Ia-like antigen positive subpopulations of human monocytes to inhibit production of colony stimulatory activity in vitro. J. Clin. Invest. 64: 1717-1723.
25. Kaplan J., Nielsen M. 1979. Analysis of macrophage surface receptors. I. Binding of  $\alpha$ -macroglobulin protease complexes to rabbit alveolar macrophages. J. Biol. Chem. 254: 7323-7329.
26. Karnovsky M.L., Lazdins J., Simmons S.R. 1975. Metabolism of activated mononuclear phagocytes at rest and during phagocytosis. En: Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection and Pathology. Van Furth R. (Ed.). Blackwell, Oxford. pp. 423-438.
27. Silverstein S.C., Steinman R.A., Cohn Z.A. 1977. Endocytosis. Ann. Rev. Biochem. 46: 669-722.
28. Skamene E., Gros P. 1983. Role of macrophage in resistance against infectious diseases. Clin. Immunol. Allergy. 3: 539-560.
29. Mosser D.M., Edelson P.J. 1984. Mechanisms of microbial entry and endocytosis by mononuclear phagocytes. Contemp. Top. Immunobiol. 13: 71-96.
30. Bianco C., Griffin F., Silverstein S. 1975. Studies of the macrophage complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. J. Exp. Med. 141: 1278-1285.
31. Griffin F.M. Jr., Bianco C., Silverstein S.C. 1975. Characterization of the macrophage receptor for complement and demonstration of its functional independence from the receptor for the Fc portion of immunoglobulin G. J. Exp. Med. 141: 1269-1276.
32. Pearse B.M.F., Bretscher M.S. 1981. Membrane recycling by coated vesicles. Ann. Rev. Biochem. 50: 85-101.
33. Steinman R.M., Brodie S.E., Cohn Z.A. 1976. Membrane flow during pinocytosis: a stereologic analysis. J. Cell. Biol. 68: 665-687.
34. Storrie B., Dreesen T.D., Maurey KM. 1981. Rapid cell surface appearance of endocytic membrane proteins in Chinese hamster ovary cells. Mol. Cell Biol. 1: 261-268.
35. Muller W.A., Steinman R.M., Cohn Z.A. 1980. The membrane proteins of the vacuolar system. I. Analysis by a novel method of intralysosomal iodination. J. Cell. Biol. 86: 292-303.
36. Muller W.A., Steinman R.M., Cohn Z.A. 1980. The membrane proteins of the vacuolar system. II. Bidirectional flow between secondary lysosomes and plasma membrane. J. Cell. Biol. 86: 304-314.

37. Mellman I.S., Plutner H., Steinman R.M., Unkeless J.C., Cohn Z.A. 1983. Internalization and degradation of macrophage Fc receptors during receptor-mediated phagocytosis. J. Cell. Biol. 96: 887-895.
38. Helenius A., Mellman I., Wall D., Hubbard A. 1983. Endosomes. TIBS. 8: 245-250.
39. Pastan I., Willingham M.C. 1983. Receptor-mediated endocytosis: coated pits, rezeptosomes and the Golgi. TIBS. 8: 250-254.
40. McNeil P.L., Tanasugarn L., Meigs J.B., Taylor D.L. 1983. Acidification of phagosomes is initiated before lysosomal enzyme activity is detected. J. Cell. Biol. 97: 692-702.
41. Nathan C.F. 1982. Secretion of oxygen intermediates: role in effector functions of activated macrophages. Fed. Proc. 41: 2206-2211.
42. Johnston R.B. Jr. 1978. Oxygen metabolism and the microbicidal activity of macrophage. Fed. Proc. 37: 2759-2768.
43. Locksley R.M., Wilson C.B., Klebanoff S.J. 1982. Role for endogenous and acquired peroxidase in the toxoplasmaicidal activity of murine and human mononuclear phagocytes. J. Clin. Invest. 69: 1099-1111.
44. Klebanoff S.J. 1980. Cytocidal mechanisms of phagocytic cells. En: Fourth International Congress of Immunology 80. Progress in Immunology IV. Fougereau M., Dausset J. (Eds.) Academic Press, London, N.Y. pp. 720-736.
45. Mackness G.B. 1964. The immunological basis of acquired cellular resistance. J. Exp. Med. 120: 105-120.
46. Hibbs J.B., Taintor R.R., Chapman H.A., Weinberg J.B. 1977. Macrophage tumor killing: influence of the local environment. Science 197: 279-282.
47. Adams D.O., Marino P. 1983. Activation of mononuclear phagocytes for destruction of tumor cells as a model for study of macrophage development. En: Contemporary Topics in Hematology-Oncology. Gordon A.S., Silber R., Lo Bue J. (Eds.). Plenum Press N.Y. Vol. III.
48. Beller D.I., Unanue E.R. 1982. Reciprocal regulation of macrophage and T cell function by way of soluble mediators. En: Lymphokines. Mizel S. (Ed.) N.Y. Academic Press Vol. 6. pp. 25-45
49. Beller D.I., Unane E.R. 1982. Regulation of macrophage Ia expression in vivo and in vitro. Adv. Exp. Med. Biol. 155: 591-599.

50. Pick E., Bromberg Y., Freund M. 1982. Extrinsic regulation of macrophage function by lymphokines-effect of lymphokines on the stimulated oxidative metabolism of macrophages. Adv. Exp. Med. Biol. 155: 471-485.
51. Taylor M.L., Díaz S., González P.A., Sosa C.A., Toriello C. 1984. Relationship between pathogenesis and immune regulation mechanism in histoplasmosis: A hypothetical approach. Rev. Infect. Dis. 6: 775-782.
52. Howard D.H., Otto V. 1977. Experiments on lymphocyte mediated cellular immunity in murine histoplasmosis. Infect. Immun. 16: 226-231.
53. Wu-Hsieh B., Howard D.H. 1984. Inhibition of growth of *Histoplasma capsulatum* by lymphokine-stimulated macrophages. J. Immunol. 132: 2539-2597.
54. Sánchez S.B.D., Carbonell L.M. 1975. Immunological studies on *Histoplasma capsulatum*. Infect. Immun. 11: 387-394.
55. Ratonoff W.D., Pepple J.M., Winkelstein J.A. 1980. Activation of the alternative complement pathway by *Histoplasma capsulatum*. Infect. Immun. 30: 147-149.
56. Hill G.A., Marcus S. 1960. Study of cellular mechanisms in resistance to systemic *histoplasma capsulatum* infection. J. Immunol. 85: 6-13.
57. Holland P. 1971. Circulating human phagocytes and *Histoplasma capsulatum*: ultrastructural observations. En: *Histoplasmosis*. Ajello L., Chick E.W., Furcolow M.L. (Eds.), Proceedings of the Second National Conference, Thomas, Springfield, Ill., pp. 580-583.
58. Ralph P., Prichard J., Cohn M. 1975. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. J. Immunol. 114: 898-905.
59. Ralph P., Nakoinis I. 1975. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. Nature. 257: 393-394.
60. Patterson M.K. Jr. 1979. Measurement of growth and viability of cells in culture. Math. Enz. LVIII: 141-152.
61. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.S. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
62. Ey P.L., Prowse S.J., Jenkin C.R. 1978. Isolation of pure IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub> immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. Immunochemistry. 429-436.

63. Kozel T.R., Mc Gam T.G. 1979. Oponization of Cryptococcus neoformans by human immunoglobulin G: role of immunoglobulin G in phagocytosis by macrophages. Infect. Immun. **25**: 255-261.
64. Hubbard A.L., Cohn Z.A. 1972. The enzymatic iodination of the red cell membrane. J. Cell. Biol. **55**: 390-405.
65. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**: 680-685.
66. Wilson C.B., Tsai V., Remington J.S. 1980. Failure to trigger the oxidative burst by normal macrophages. Possible mechanism for survival of intracellular pathogens. J. Exp. Med. **151**: 328-346.
67. Snyderman R., Goetze E. 1981. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. Science. **213**: 830-832.
68. Johnstone R., Chadwick D., Pabst M. 1980. Release of superoxide anion by macrophages. Effect of *in vivo* or *in vitro* priming. In: Mononuclear Phagocytes. Van Furth R. (Ed.) Martinus Nijhoff, La Haya. pp. 1143-1159.
69. Scott W., Zrike J., Hamill A., Kempe J., Cohn Z.A. 1980. Regulation of arachidonic acid metabolites in macrophages. J. Exp. Med. **152**: 324-329.
- 70a. Bloom B.R., Diamond B., Muschel R., Rosen N., Schneck J., Damiani G., Rosen O., Scharff M. 1978. Genetic approaches to the mechanism of macrophage functions. Fed. Proc. **37**: 2765-2771.
- 70b. Van Furth R., VanSchadewijk-Nieuwstad H., Elzenga-Claasen I., Cornelisse C., Nibbering P. 1985. Morphological, cytochemical, functional and proliferative characteristics of four murine macrophage-like cell lines. Cell. Immunol. **90**: 339-357.
71. Taylor M.L., Reyes Montes M.R., Gonzalez G.R., Casasola J., Hernández-Ramírez A. 1982. Immune response changes with age and sex as factors variation in resistance to Histoplasma infection. Proc. of the VIII Congress International Society for Human and Animal Mycology. Baxter M. (Ed.). Massey University. New Zealand. pp. 260-264.
72. Espinosa M.E. 1985. Fagocitosis de Histoplasma capsulatum: detección de fusión fagosoma-lisosoma. Tesis Facultad de Ciencias, UNAM.
73. Taylor M.L., Rico B., Benítez M.T., Díaz G., Castro A.M., Polito G., Toriello C. 1984. Infección *in vitro* de Histoplasma capsulatum en macrófagos peritoneales de ratón. Bolet. Soc. Mex. Mic. **19**: 327-342.
74. Peck R. 1983. An ELISA method for quantitation of macrophage migration from agarose microdroplets. J. Immunol. Meth. **64**: 179-187.

75. Unkeless J. 1980. Mouse macrophage Fc receptors. J. Reticuloendothel. Soc. 28: 11-19.
76. Ezekowitz R.A.B., Bampton M., Gordon S. 1983. Macrophage activation selectively enhances expression of Fc receptors for IgG2a. J. Exp. Med. 157: 807-812.
77. Paulowski N.A., Scott W.A., Andreach M., Cohn Z.A. 1982. Uptake and metabolism of monohydroxy-eicosatetraenoic acids by macrophages. J. Exp. Med. 135: 1653-1664.
78. Ezekowitz R.A.B., Gordon S. 1984. Alterations of surface properties by macrophage activation: expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens. Contemp. Top. Immunobiol. 13: 33-56.
79. Ellenberger A., Nussenzweig V. 1977. The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. J. Exp. Med. 145: 357-364.
80. Sung S., Nelson R., Silverstein S. 1983. Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages. J. Cell. Biol. 96: 160-167.
81. Blackwell J.M., Ezekowitz R.A.B., Roberts M.B., Channon J.Y., Sim R.B., Gordon S. 1985. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. J. Exp. Med. 162: 324-331.
82. Howard D.H. 1977. Experiments on lymphocyte mediated cellular immunity in murine histoplasmosis. Infect. Immun. 16: 226-231.
83. Williams D.M., Graybill J.R., Drutz D.J. 1981. Adoptive transfer of immunity to *Histoplasma capsulatum* in athymic nude mice. Sabouraudia. 19: 39-48.
84. Howard D.H. 1973. Fate of *Histoplasma capsulatum* in guinea pig polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 8: 412-419.
85. Diamond R.D. 1985. Humoral responses of the host. En: Fungi Pathogenic for Humans and Animals. Parte B: 1 Howard D.H. (Ed.) Marcel Dekker, Inc. N.Y. pp. 99-120.