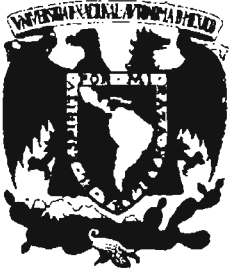


00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

**"Interacción de conidios y fragmentos hifales  
de *Histoplasma capsulatum* con componentes  
de la mucosa nasal y el NALT de ratones"**

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

**ROBERTO OSVALDO SUÁREZ ALVAREZ**

Directora de tesis:

**DRA. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO**

MÉXICO, D.F.



NOVIEMBRE, 2005

COORDINACIÓN

0350923



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



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

NOMBRE: Roberto Suárez A.

FECHA: 21 Noviembre 2005

FIRMA: [Firma]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de septiembre del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **SUÁREZ ÁLVAREZ ROBERTO OSVALDO** con número de cuenta **92238383** con la tesis titulada: **Interacción de conidios y fragmentos hifales de Histoplasma capsulatum con componentes de la mucosa nasal y el NALT de ratones**, bajo la dirección del(a) Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello.

Presidente:	Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser
Vocal:	Dra. Patricia Rivas Manzano
Secretario:	Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello
Suplente:	Dr. Guillermo Laguna Hernández
Suplente:	Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria D.F. a 7 de noviembre del 2005

Dr. Juan Nuñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Comité tutorial

**Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser**  
**Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo**

Financiamiento

Este trabajo fue apoyado económicamente por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** con el No. de registro de becario: **182501**

Tutor principal

**Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello**

Tutor invitado

**Dr. Armando Pérez Torres**

**A él, un especial reconocimiento por toda su colaboración y participación  
el desarrollo de este trabajo**

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de:

**INMUNOLOGÍA COMPARADA DE PIEL Y MUCOSAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y TISULAR  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**INMUNOLOGÍA DE HONGOS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**AGRADECIMIENTOS:**

*A mi amiga Maria Lucia; por mostrarme lo enriquecedor que pueden ser las discusiones acaloradas y por ayudarme a explotar lo mejor de mi coraje*

*A mi amigo Armando Pérez Torres; por el extenso sentido de todo lo compartido...*

**GRACIAS POR TODO AMIGO**

*A los integrantes del Jurado:*

*Dra. Ingeborg Becker*

*Dr. Guillermo Laguna*

*Dra. Paty Rivas*

*Dr. Edgar Zenteno*

*Por su valioso tiempo y dedicación invertidos a este trabajo, por todas sus aportaciones, pero sobre todo por la Gran Calidad Humana que cada uno de ustedes manifiestan, mil gracias!!!*

*A mis confidentes histotecnólogas, Verónica Rodríguez Mata y María Isabel Vega, gracias por su esmero y profesionalismo que las caracteriza y por hacer toda una aventura cada visita al penúltimo laboratorio del piso 3*

*A mi querida casa: la UNAM, quién me lo ha dado TODO. ¡Cómo no te voy a querer...!*

*A Martha Ustarroz por mantenerme bien alimentado y contento*

*A Ivón, Irma y María Elena; por hacer muy agradable la estancia en el laboratorio*

*A mi Cristina.....*

*Por estar en el lugar y en el momento precisos, por hacer con tu amor de mi vida un torbellino, por llenar cada momento con sonrisas y detalles que me mantienen siempre curioso y emocionado....*

*Pero sobre todo... Gracias por coincidir...*

## **DEDICATORIAS:**

*A mi hermano **Mario**; porque el tiempo y la distancia que nos separó, sólo fortaleció nuestro cariño. ¡Que alegría recuperarte hermano!...*

*A mis padres: **Juanita y Fernando**; por darme las herramientas necesarias para escalar la "Gran Montaña", gracias por su amor y su apoyo incondicionales*

*A mis hermanos **Fernando, Anita y Monse**; con quienes disfruté y lloré el mágico sueño de mi infancia... Porque crecieron tan pronto?*

*A mi amigo **Jorge Sahaza**; muestra de que, en el tiempo, la CALIDAD supera a la CANTIDAD. Suerte amigo en tu nuevo empleo de "papá de tiempo completo"*

*A mis amigos: **Gerardo, Toñita y Daniel, Allan, Fabiola y Josué, David, Paty, Elena, Horte, Amelia, Gaby, Esperanza, Rocío Reyes, Aurorita** y a todos los que ahora se me olvidan; gracias por su sincero apoyo y cariño, la vida sería muy aburrida sin cada una de sus sonrisas. Que Dios los cuide a todos...*

*A **Pau y Lupita**; gracias flaquitas por todo su cariño y apoyo*

*A **Sandy**; por la calidad del tiempo compartido, tus sinceras palabras y tu cálida sonrisa...*

*A **Rubén Sandoval**; por toda una experiencia de vida en cada palabra compartida. Gracias por todos tus consejos viejito*

*A **Viviana Ritacco, Bety y Lucy**; por los votos de confianza y cada palabra de aliento, Gracias por su amistad*

*A **Graciela Davel**; por recibirme en tu laboratorio y en tu casa. Hay cosas en la vida que no tienen forma de pagarse. Gracias Gra*

*A todos mis cuates del Laboratorio de Micología del Instituto Carlos G. Malbrán de Argentina: **Nico, Willy, Diego, Eugenia, Walter, Martín, Susana, Roxana, Cristinita, Hernán, Adriana, Alejandra, Belén y Ruben**; por todo su apoyo en mi estancia allá, pero sobre todo, por hacerme sentir como en casa*

*A **Graciela y Tomasito**; su cariño y complicidad son un tesoro inmesurable, Gracias!!!*

*A **Viola y Roberto**; por cuidarme a la más preciada y exótica flor de la Argentina. Gracias por su amistad y hospitalidad*



## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>11</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>12</b>
<b>5. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>12</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>13</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
<b>7.1 Cepas</b>	<b>14</b>
<b>7.2 Obtención de inóculos de la cepa fúngica</b>	<b>15</b>
<b>7.2.1 Fase micelial</b>	<b>15</b>
<b>7.3 Animales</b>	<b>15</b>
<b>7.4 Administración intranasal del inóculo fúngico</b>	<b>16</b>
<b>7.5 Recuperación del hongo mediante sembrado de órganos y tejidos</b>	<b>16</b>
<b>7.6 Descalcificación de la estructura nasal</b>	<b>16</b>
<b>7.7 Procesamiento de órganos y tejidos de ratones infectados, para tinciones con hematoxilina-eosina (H-E), ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS) y Grocott</b>	<b>17</b>
<b>7.8 Búsqueda de estructuras fúngicas de <i>H. capsulatum</i> y de CD en órganos y tejidos de ratones infectados, por inmunohistoquímica (IHQ) específica</b>	<b>17</b>

7.8.1 Método de inmunoperoxidasa simple	18
7.8.2 Método de doble inmunoperoxidasa	19
7.9 Distribución de propágulos de <i>H. capsulatum</i> en la mucosa nasal, por microscopia electrónica de barrido (MEB)	20
7.10 Detección molecular de <i>H. capsulatum</i> en órganos y tejidos de ratones infectados, por PCR-anidada	20
7.10.1 Extracción de DNA	20
7.10.2 Iniciadores para la PCR específica de <i>H. capsulatum</i>	22
7.10.3 Ensayos de PCR	22
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>24</b>
8.1 Observación de células de <i>H. capsulatum</i> en órganos y tejidos de ratones infectados, por tinciones histológicas convencionales	24
8.2 Observación de células de <i>H. capsulatum</i> en órganos y tejidos de ratones infectados, por IHQ simple	25
8.3 Observación de células de <i>H. capsulatum</i> y CD en órganos y tejidos de ratones infectados, por doble IHQ	25
8.4 Distribución de células de <i>H. capsulatum</i> en la mucosa nasal de ratones infectados, observada por MEB	26
8.5 PCR-anidada	27
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>28</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>33</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>35</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1(a-d).</b> Estructura del tejido linfoide asociado a la nariz (NALT) y su asociación con <i>H. capsulatum</i>	<b>40</b>
<b>Figura 2(a-c).</b> Levaduras de <i>H. capsulatum</i> inter e intracelulares	<b>41</b>
<b>Figura 3(a-d).</b> Levaduras de <i>H. capsulatum</i> inter e intracelulares	<b>42</b>
<b>Figura 4(a,b).</b> Levaduras de <i>H. capsulatum</i> en cortes de tráquea	<b>43</b>
<b>Figura 5(a,b).</b> Cortes de tejidos procesados como testigos	<b>44</b>
<b>Figura 6 (a-e).</b> Inmunohistoquímica para <i>H. capsulatum</i> y CD	<b>45</b>
<b>Figura 7.</b> MEB del corte sagital de la cabeza del ratón	<b>46</b>
<b>Figura 8(a,b).</b> MEB de la mucosa nasal expuesta por el corte sagital de la cabeza del ratón infectado	<b>46</b>
<b>Figura 9(a,b).</b> PCR-anidada para detectar la presencia de DNA de <i>H. capsulatum</i> en órganos y tejidos de ratones infectados	<b>47</b>

## RESUMEN

La histoplasmosis, producida por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* (*Hc*), presenta formas clínicas que van de benignas a severas. En México, la enfermedad está asociada a epidemias que refieren altas tasas de letalidad. En su fase micelial (M), *Hc* muestra hifas y diferentes tipos de conidios. Estos propágulos infectivos entran al hospedero por vía respiratoria y en su travesía hacia órganos internos, sufren transición a la fase levaduriforme-parasitaria y virulenta (L). La fase L puede diseminarse por sangre y/o linfa, posiblemente a través de células del sistema fagocítico mononuclear. *Hc* tiene un primer contacto con el hospedero en la mucosa nasal, aunque esta interacción no había sido investigada a la fecha. La importancia de la cavidad nasal en la infección por *Hc*, está relacionada con su extensa superficie mucosa, la cual posee numerosas células epiteliales que pueden funcionar como células permisivas para el hongo y en donde se han descrito cambios fenotípicos de este patógeno. La mucosa nasal posee células dendríticas (CD) epiteliales, subepiteliales e intersticiales con capacidad de fagocitar y procesar antígenos, mientras migran hacia los ganglios linfáticos regionales donde participan en la presentación de antígenos a los linfocitos T. En la mucosa nasal se encuentra el NALT (Tejido Linfoide Asociado a la Nariz), el cual es morfológicamente análogo a las placas de Peyer del íleon, cuyas células epiteliales permiten el paso y transporte de estructuras endocitadas hacia el tejido linfoide subyacente, que también contiene CD. A la fecha, se desconocen: 1) los eventos de interacción entre *Hc* y la mucosa nasal; 2) en qué sitio de ésta y en qué tiempo se realiza la transición M-L del hongo; 3) si *Hc* interactúa con el epitelio nasal y el NALT; y 4) si las CD de la mucosa nasal participan en la interacción *Hc*/hospedero, para facilitar la migración del parásito. Para responder estas incógnitas, se infectaron intranasalmente ratones BALB/c con propágulos infectivos de *Hc* y se sacrificaron a las 1, 2, 3 y 6 h post infección. Se disecaron: la cavidad nasal, los ganglios linfáticos cervicales, la tráquea, los pulmones, el bazo, el hígado y el intestino delgado. Los órganos y tejidos procesados por diferentes tinciones y por inmunohistoquímica, utilizando suero de conejo anti-*Hc*, mostraron levaduras intracelulares en las células ciliadas del epitelio. Mediante microscopía electrónica de barrido de un corte sagital de la cavidad nasal se observó presencia de levaduras en la superficie de la mucosa desde las primeras 3 h post infección con distribución decreciente anteroposterior. Se empleó el método de PCR-anidada, con el que se revelaron bandas de DNA de *Hc*, únicamente en ganglio linfático cervical a las 3 h y en tráquea a las 6 h post infección. En las demás muestras y en los tiempos menores a las 6 h, no se detectó DNA de *Hc*. En conclusión se destaca la importancia de: 1) la mucosa nasal y los ganglios linfáticos cervicales que la drenan, como sitios de inicio de la transición M-L y diseminación de *Hc*; 2) las CD subepiteliales e intersticiales (identificadas por la forma del núcleo, localización en mucosa nasal y marcaje específico con un anticuerpo monoclonal) en la fagocitosis inicial de levaduras; y 3) la presencia de DNA del hongo en ganglios linfáticos cervicales y en tráquea, revelados por ensayos de PCR, confirmando los hallazgos histopatológicos y de MEB.

## ABSTRACT

Histoplasmosis produced by the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* (*Hc*) displays clinical forms that go from benign to severe. In Mexico, the disease is associated with outbreaks that refer to high lethality rates. In its mycelial-phase (M), *Hc* shows hypha and different types of conidia. These infective propagules enter into the host by the respiratory tract and in their route towards internal organs they carry out a transition to the yeast-parasitic and virulent phase (L). In this phase, the fungus can spread by blood and/or lymph, possibly through cells of the mononuclear phagocytic system. *Hc* has a first contact with the host at the nasal mucosa, although this interaction has not been investigated to date. The importance of the nasal cavity in the *Hc* infection is related to its extensive mucosal surface with numerous epithelial cells that can function as permissive cells for the fungus and where phenotypic shift have been described in this pathogen. The nasal mucosa has epithelial, subepithelial, and interstitial dendritic cells (CD) with ability to phagocytose and process antigens while they migrate towards the regional lymph nodes, where they participate in the antigens presentation to T-cells. In the nasal mucosa the NALT (Nasal Associated Lymphoid Tissue) is found; this tissue is morphologically analogous to the Peyer's patches of the ileum, whose epithelial cells allow the crossing and transportation of endocytosed structures towards the subjacent lymphoid tissue, which also contains CD. Up to this date, it is not known: 1) the interaction events between *Hc* and the nasal mucosa; 2) in which site of the nasal mucosa and in which time of infection the M-L fungal transition occurs; 3) if *Hc* interacts with nasal epithelium and the NALT; and 4) if the CD of the nasal mucosa participates in the *Hc*/host interaction, to facilitate parasite migration. To answer these questions, BALB/c mice were intranasally infected with *Hc* infective propagules and sacrificed at 1, 2, 3, and 6 h post infection. The nasal cavity, the cervical lymph nodes, the trachea, the lungs, the spleen, the liver, and the small intestine were dissected. The organs and tissues processed by using several dyes and immunohistochemistry with a rabbit anti-*Hc* serum, showed intracellular yeasts in the ciliary cells of the epithelium. By scanning electron microscopy, a sagittal section of the nasal cavity showed yeasts on the surface of the mucosa (decreasing amounts from front to back) as early as 3 hours post-infection. The nested-PCR methodology was used, in which DNA bands of *Hc* were revealed, solely in the cervical lymph node at 3 h and in the trachea at 6 h post infection. In the other samples and in lesser time than 6 h, *Hc* DNA was not detected. In conclusion, the most relevant results were: 1) The nasal mucosa and its cervical lymph nodes are important sites of the initial M-L transition and *Hc* dissemination; 2) the participation of subepithelial and interstitial CD (identified by their nucleus form, localization in the nasal mucosa, and by specific marker with a monoclonal antibody) in the initial yeasts phagocytose events; and 3) the presence of fungal DNA in cervical lymph nodes and trachea, revealed by PCR assays, which confirm the histopathological and MEB findings.

## INTRODUCCIÓN

El hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*- Darling 1906, es el agente etiológico de la micosis sistémica conocida actualmente como "histoplasmosis capsulati". La mayoría de los casos de infección por *H. capsulatum* han sido registrados en zonas de climas templados y tropicales, dentro de una área geográfica ubicada a una latitud entre los 45° Norte y los 30° Sur del ecuador (Kwon-Chung & Bennett, 1992). La histoplasmosis capsulatii presenta formas clínicas diversas que varían de benignas a severas (Tewari *et al.*, 1998). La forma clínica Histoplasmosis Pulmonar Primaria afecta principalmente adultos, tiene el más alto porcentaje de letalidad en el mundo y es la más frecuente en México, generalmente asociada a epidemias. El mayor riesgo en la adquisición de esta forma clínica está relacionado con la exposición a aerosoles con propágulos del hongo en altas concentraciones. Esta condición se encuentra con frecuencia en refugios permanentes y/o temporales de murciélagos y de aves, lo que representa un peligro para la salud de todos aquellos individuos que entran o trabajan en estos espacios. En este sentido, espeleólogos, biólogos, geólogos, arqueólogos, antropólogos y, particularmente, trabajadores rurales como mineros, limpiadores de minas y colectores de guano, son la población laboral con más alto riesgo de infección por *H. capsulatum* (Taylor *et al.*, 2000b).

El hábitat natural del hongo lo constituyen los lugares cerrados, húmedos y oscuros, tales como: cuevas, grutas, minas, túneles, puentes, alcantarillas, torres de iglesias, así como construcciones viejas y deshabitadas. El hongo también ha sido aislado de lugares abiertos como parques, patios y plazas públicas, donde se encuentran zanates, golondrinas, palomas y aves de corral (gallinas y pavos). La presencia de altas

concentraciones de nitrógeno y fósforo además de oligoelementos, permite que *H. capsulatum* crezca favorablemente en guano de murciélagos y aves. Las condiciones físicas como, poca luz (que favorece la esporulación), temperaturas óptimas tanto de suelo como del ambiente que fluctúan en un rango de 25-30 °C y una humedad relativa >60 %, son factores abióticos que junto con los bióticos, representados principalmente por la microbiota asociada e insectos y ácaros micófagos, conforman el nicho ecológico ideal para este patógeno fúngico (Taylor *et al.*, 1999a; 2000a). En estos ambientes, *H. capsulatum* desarrolla su fase micelial (M), geofílica y saprobia, la cual es infectiva produciendo propágulos que al ser aerosolizados e inhalados por hospederos susceptibles o inmunodeprimidos pueden desencadenar la infección inicial con curso clínico de moderado a grave en la enfermedad establecida.

La fase M se caracteriza por mostrar hifas delgadas que miden de 1.2 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, con dos tipos de conidios solitarios: los microconidios, redondos o piriformes de 1.4 x 2.6  $\mu\text{m}$ , que pueden estar fijos a la hifa o unidos a ellas por pequeños conidióforos, y los macroconidios de paredes gruesas, por lo general, redondos de 8-14  $\mu\text{m}$  de diámetro, con proyecciones digitiformes de diferentes tamaños, típicas de la especie. Los macroconidios están adheridos a las hifas por conidióforos cortos que, con frecuencia, forman un ángulo aproximado de 90° con la hifa principal. El hongo crece en su fase levaduriforme (L) y virulenta, tanto como parásito intracelular de fagocitos profesionales (macrófagos y polimorfonucleares) y no profesionales (células epiteliales) de hospederos susceptibles como en medios de cultivo sintéticos o complejos a 37 °C.

La micromorfología de las levaduras está representada por células individuales uninucleadas de 2-6  $\mu\text{m}$  de diámetro, generalmente unigemantes con brotamiento de base estrecha (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Taylor *et al.*, 2000c; Tewari *et al.*, 1998). Los hongos no son participantes pasivos en los procesos de infección. Actualmente, se les atribuye un conjunto de factores de virulencia dependiente de la interacción entre el patógeno y el ambiente, que afecta profundamente la variabilidad antigénica, el cambio fenotípico y la transición dimórfica. Se ha argumentado que todos los requerimientos para establecer una enfermedad por estos patógenos podrían ser considerados determinantes de virulencia (Casadevall *et al.*, 1999). La virulencia fúngica es expresada, de preferencia, en hospederos susceptibles y no debe ser considerada como una variable microbiana independiente (complejo multifactorial) (Romani *et al.*, 2002). Odds *et al.* (2001) proponen que sólo los factores que interactúan directamente con células hospederas de mamíferos podrían ser considerados verdaderos factores de virulencia.

Los mecanismos de defensa de un hospedero ante infecciones fúngicas son muy variados, van desde los no específicos, hasta sofisticados sistemas de respuesta adaptativa, los cuales son específicamente inducidos durante la infección o la enfermedad en curso. Así, el delicado balance de la interacción entre el hospedero y el patógeno fúngico, puede ir desde una infección hasta una enfermedad severa, según la condición inmunológica del hospedero (Romani, 2002).

Se conocen muchos de los eventos que median la interacción de *H. capsulatum* con diferentes células parasitadas, los cuales han sido estudiados tanto en células cultivadas de humano como de murino (Allendoerfer *et al.*, 1997; Bullock, 1993; Bullock



& Wright, 1987; Dumond & Robert, 1970; Eissenberg *et al.*, 1988; 1991; 1993; Eissenberg & Goldman, 1991; Howard, 1964; 1965; 1973; Jeréz & Taylor, 1989; Lane *et al.*, 1994; León *et al.*, 1989; Newman *et al.*, 1990; 1992; 1993; 1994; Randall & Hackney, 1953; Randall & McVickar, 1951; Randall & Turner, 1953; Retallack & Woods, 1999; Schaffner *et al.*, 1986; Schunur & Newman, 1990; Taylor *et al.*, 1989; 1995; 1998; Taylor & Duarte-Escalante, 1995; Wolf *et al.*, 1989; 1992).

Las levaduras de *H. capsulatum* tienen afinidad por el sistema fagocítico mononuclear del hospedero. Los macrófagos (M $\phi$ ), en armonía con la respuesta inmune celular, son los efectores más importantes para la eliminación de parásitos intracelulares en el hospedero infectado.

Experimentos *in vivo* indican que la multiplicación del hongo en el estado parasitario ocurre en el ratón a partir de las dos primeras semanas después de la infección (Emmons *et al.*, 1977). Por otro lado, se ha observado en ensayos *in vitro* que los M $\phi$  alveolares de ratón fagocitan microconidios, fragmentos hifales y levaduras entre 4-6 h después de la infección y que la transición M-L *in vitro* inicia entre 6–7 h después de la incubación a 37 °C y se completa a las 72 h (Kimberlin *et al.*, 1981).

Algunos autores (Gildea *et al.*, 2001; Newman, 2005), proponen que la infección del hospedero con *H. capsulatum* ocurre mediante la inhalación de conidios y/o fragmentos hifales que se acumulan en los bronquiolos terminales y alvéolos. Sugieren que después de la inhalación, los conidios se convierten a la fase L dentro de los M $\phi$  alveolares, en los cuales, las levaduras neutralizan el microambiente hostil y son capaces de multiplicarse, iniciando el establecimiento de la infección. Cuando los M $\phi$  alveolares son destruidos por las levaduras, éstas empiezan a ser fagocitadas por M $\phi$

circulantes reclutados al sitio de infección. Estos autores proponen que este ciclo se repite varias veces, lo que facilita la diseminación del parásito hacia órganos linfáticos y otros tejidos del cuerpo, en los cuales se suele resolver la infección si se trata de hospederos inmunocompetentes. Aunque la mayoría de las infecciones por *H. capsulatum* cursan como asintomáticas, este patógeno causa una gran diversidad de formas clínicas incluyendo infección diseminada progresiva y eventualmente la muerte (Gildea *et al.*, 2001).

Entre los principales receptores para levaduras y conidios de *H. capsulatum* en M $\phi$  humanos, están algunas moléculas de adhesión como las integrinas. Se conoce que *H. capsulatum* se une preferentemente a la fracción CD18 de las integrinas de la familia  $\beta$ 2, CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (CR3 ó MAC-1) y CD11c/CD18 (p150,95 ó CR4) para poder ser internalizado por neutrófilos, M $\phi$  cultivados de monocitos y por M $\phi$  alveolares humanos (Bullock & Wright, 1987; Newman *et al.*, 1990).

Las células dendríticas (CD) inmaduras humanas, diferenciadas *in vitro* a partir de monocitos circulantes en sangre periférica, pueden fagocitar estructuras fúngicas de *H. capsulatum* a través de CD18, no obstante, el reconocimiento del hongo por las CD se realiza principalmente por VLA-5 (Very Late Antigen-5). Se propone que las CD degradan y procesan antígenos *Hc*-específicos y los presentan a linfocitos T (Gildea *et al.*, 2001; Newman, 1999). Las CD son consideradas mejores presentadoras de antígenos (CPAs) que los M $\phi$ , y al igual que éstos, pueden desencadenar la respuesta inmune adaptativa conduciendo a la activación de la inmunidad mediada por células, la cuál jugaría un papel preponderante en el mecanismo específico de protección contra la histoplasmosis, al estimular la producción de citocinas que directa o indirectamente

activan a  $M\phi$  que inhiben la proliferación y matan a las levaduras intracelulares (Gildea *et al.*, 2001; Newman, 1999).

Se ha propuesto que la transición de ciertos morfotipos fúngicos es detectada por el sistema inmune del hospedero, en una forma morfotipo-específica. Las CD son capaces de decodificar información asociada a la fase M o L del patógeno, lo que conlleva a diferentes respuestas inmunes dependientes de las células Th (T helper), estudiadas tanto *in vivo* como *in vitro* (Fujita, 2002; Gildea *et al.*, 2001). Un ejemplo ilustrativo de las aseveraciones anteriores, lo constituye la fagocitosis de *Candida albicans*. Se ha encontrado que las CD mieloides inmaduras fagocitan tanto hifas como levaduras de *C. albicans*, involucrando diferentes receptores para el reconocimiento de sus moléculas de superficie (Montagnoli *et al.*, 2002). La internalización de las levaduras de *C. albicans* ocurre principalmente por fagocitosis tipo enrollamiento (coiling), mediada por el receptor de manosa (MR) y parcialmente por CR3; mientras que la internalización de las hifas ocurre por un mecanismo más convencional, la fagocitosis tipo cierre (zipper), e involucra la acción cooperativa de CR3 y los receptores para la fracción Fc de las IgG (Fc $\gamma$ R) (Romani, 2002). Una vez dentro de las CD, las levaduras de *C. albicans* son eventualmente degradadas; en contraste, las hifas con frecuencia permanecen libres en el citoplasma. Sin embargo, algunas levaduras pueden sobrevivir dentro del fagosoma de las CD si son internalizadas por CR3, a través de la llamada vía de las lectinas, una oportuna estrategia para evitar su degradación y permitir así su persistencia. Es así como algunos hongos y bacterias patógenas parecen tener la capacidad de evitar la activación del fagocito, al

internalizarse a la célula hospedera mediante receptores del complemento que no son capaces de estimular la activación de proceso fagocítico (Schorey, 1997; Roney, 2002). Las CD derivan de la médula ósea, tanto de las células madre linfáticas como mieloides y están presentes en todos los órganos linfoides como el timo, el bazo y los ganglios linfáticos, asimismo, en casi todos los órganos y tejidos no linfoides. Las CD inmaduras o células de Langerhans, adquieren antígenos en tejidos periféricos mediante una variedad de mecanismos (Banchereau & Steinman, 1998). Su localización estratégica en los tejidos, en particular, piel y mucosas, facilita que estas células puedan captar y transportar antígenos, procesarlos y presentarlos a linfocitos T de los ganglios linfáticos regionales. En el sistema respiratorio, las CD se localizan en los epitelios de la mucosa, en la lámina propia de las vías de conducción, en el intersticio del parénquima pulmonar y las paredes alveolares, así como alrededor de los vasos sanguíneos (Lotze & Thomson, 2001). Debido a que *H. capsulatum* infecta a humanos por la vía respiratoria, las CD asociadas a la mucosa nasal podrían jugar un papel clave, aún no descrito para el tracto respiratorio superior, en la defensa del hospedero contra este parásito fúngico desde las primeras etapas de la infección.

Las CD participan en los eventos de reconocimiento microbiano, a través de numerosos receptores como los CR, Fc $\gamma$ R, MR y receptores de patrones de reconocimiento (PRRs). El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por PRRs, es considerado un prerrequisito para que el sistema de defensa innato sea capaz de discriminar entre distintos patógenos e inducir diferentes esquemas de respuesta inmune, tanto innata como adaptativa (Medzhitcov & Janeway, 2002). Los hongos poseen una variedad de PAMPs, con los cuales son capaces de inducir la

fagocitosis y activar las rutas proinflamatorias, al ser reconocidos por MR, receptores de  $\beta$ -glucanas, lectinas unidoras de manosa (MBP), CR y receptores tipo Toll, principalmente TLR-2, TLR-4 y TLR-6 (Montagnoli *et al.*, 2002; Romani, 2002; Romani *et al.*, 2002; Schorey, 1997).

En las vías respiratorias superiores que sirven de entrada a ciertos patógenos existe el NALT (Nasal Asociated Lymphoid Tissues) que es un tejido asociado a la nariz. Consiste de un tejido linfoide pareado, localizado en el piso de la cavidad nasal, cubierto por una capa de epitelio cilíndrico ciliado y se ha postulado como un posible equivalente funcional, en el tracto respiratorio superior, a las placas de Peyer en el íleon, cuyas células epiteliales permiten el paso y transporte de estructuras endocitadas hacia el tejido linfoide subyacente que también contiene CD. Esta equivalencia funcional se sustenta, primero, por la semejanza en las densidades poblacionales de células B y T; segundo, porque el epitelio que recubre los folículos linfoides puede servir como sitio de entrada para diferentes patógenos; y tercero, porque funciona como la primer barrera contra antígenos internalizados en éste tejido.

Al igual que en otros tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT), como el de intestino y bronquios, las CD asociadas al NALT podrían jugar un papel inicial en la captación de antígenos durante la respuesta inmune de la mucosa nasal. A la fecha no existen antecedentes que comprometan a las CD de la mucosa nasal y del NALT en el evento de infección de *H. capsulatum*.

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se acepta como única opción que la primoinfección por *H. capsulatum* se realiza al inhalar conidios y/o fragmentos hifales capaces de aprovechar pequeñas rutas de aire que van desde la nariz del hospedero hasta los M $\phi$  de los alvéolos, donde se lleva a cabo la transición M-L. El mecanismo de defensa del hospedero permitiría el establecimiento de la infección y posible diseminación del patógeno hacia los órganos internos, lo que podría derivar en una enfermedad con curso leve o severo dependiendo del estado inmunológico del hospedero (Gildea *et al.*, 2001; Newman, 2005). Sin embargo, se desconoce si existen otras rutas de captación y diseminación del hongo a partir de la primera interacción de las estructuras fúngicas con los tejidos de vías respiratorias superiores, particularmente, con la mucosa nasal y el NALT. Si esto ocurre, podemos proponer que la transición M-L y los primeros eventos de fagocitosis y diseminación *in vivo* de *H. capsulatum* pueden llevarse a cabo en sitios diferentes y tiempos menores a los reportados en la literatura (Emmons *et al.*, 1977; Kimberlin *et al.*, 1981).

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar la interacción de conidios y fragmentos hifales de *H. capsulatum* con la mucosa nasal y el NALT, en el inicio de la captación y diseminación fúngica en el modelo murino BALB/c.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- ⇒ Identificar mediante diferentes técnicas histológicas, la presencia de levaduras de *H. capsulatum* en vías respiratorias superiores y ganglios linfáticos regionales.
- ⇒ Identificar el patrón de distribución de conidios y fragmentos hifales de *H. capsulatum* inoculados en la cavidad nasal de ratones BALB/c, utilizando microscopía electrónica de barrido (MEB).
- ⇒ Identificar el tiempo y el sitio en la mucosa nasal donde se realiza la transición dimórfica de *H. capsulatum*, utilizando MEB y diferentes tinciones.
- ⇒ Examinar la interacción de *H. capsulatum* con la mucosa nasal y el NALT y su posible tránsito transepitelial utilizando técnicas histológicas, inmunohistoquímicas, de microscopía electrónica y PCR.

⇒ Demostrar la posible participación de las CD de la mucosa nasal y, en particular, las del NALT en un evento de infección por *H. capsulatum*.

## **HIPÓTESIS**

El primer contacto de *H. capsulatum* con el hospedero es a nivel de la mucosa nasal y del NALT, donde las células epiteliales y las CD inmaduras interactúan con los propágulos fúngicos para permitirles atravesar la mucosa. Es en este evento donde se realiza tempranamente la transición dimórfica.



⇒ Demostrar la posible participación de las CD de la mucosa nasal y, en particular, las del NALT en un evento de infección por *H. capsulatum*.

## **HIPÓTESIS**

El primer contacto de *H. capsulatum* con el hospedero es a nivel de la mucosa nasal y del NALT, donde las células epiteliales y las CD inmaduras interactúan con los propágulos fúngicos para permitirles atravesar la mucosa. Es en este evento donde se realiza tempranamente la transición dimórfica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CEPAS

Se empleó la cepa EH-53 de *H. capsulatum*, aislada de un paciente infectado en una cueva de Hidalgo-México. La cepa está depositada en la "Colección de Cepas de *Histoplasma capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM". Se puede acceder a la información sobre las cepas de la colección en un catálogo (Taylor *et al.*, 1999b) o en la página web: [www.histoplas-mex.unam.mx](http://www.histoplas-mex.unam.mx). Esta colección se encuentra registrada en la base de datos del Centro Mundial de Datos sobre Microorganismos (World Data Center on Microorganisms, WDCM) de la Federación Mundial para Colecciones de Cultivos (World Federation for Culture Collections, WFCC) bajo el acrónimo LIH-UNAM WDCM817.

En la colección, la fase micelial de la cepa se mantiene a 25-28 °C en agar-micobiótico (Bioxón, Becton-Dickinson, México, DF) y se preserva a 4 °C en el mismo medio adicionado con aceite mineral estéril; mientras que la fase levaduriforme se mantiene a 37 °C en caldo de infusión-cerebro-corazón (BHI-líquido) (Bioxón) suplementado con 0.1 % de L-cisteína y 1 % de glucosa y se preserva con anticongelante a -196 °C.

## OBTENCIÓN DE INÓCULOS DE LA CEPA FÚNGICA

**Fase micelial:** A partir del espécimen fúngico preservado en agar-micobiótico a 25-28 °C, se realizaron resiembras en placas de agar-BHI (Bioxón) no suplementado. Después de tres semanas de crecimiento, se cosecharon los conidios y fragmentos de hifas del micelio vegetativo aéreo por lavado gentil con solución salina estéril (SSE). La suspensión celular fue filtrada en lana de vidrio y posteriormente en papel filtro de poro fino (Wattman 45) para dejar pasar sólo microconidios y fragmentos hifales, con el fin de homogeneizar el inóculo. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad y en una campana de bioseguridad nivel 2. El inóculo se centrifugó a 3000 rpm por 15 min en SSE valorando la presencia de microconidios y fragmentos hifales en el sobrenadante por microscopia óptica. La suspensión de estos propágulos fúngicos fue ajustada a 0.5 de densidad óptica (DO). A partir de esta concentración, la suspensión fue cuantificada en cámara de Neubauer, utilizando azul de tripano (0.05 %) para identificar la viabilidad de las células. Se sembraron las estructuras fúngicas en agar-BHI para confirmar la viabilidad de los propágulos fúngicos.

## ANIMALES

Se emplearon ratones machos de ocho semanas de edad de la cepa singénica BALB/c, mantenidos con purina (Purina de México, México, DF) y agua *ad libitum* en el bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

## **ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DEL INÓCULO FÚNGICO**

Se introdujeron 100  $\mu\text{l}$  de manera espaciada (20  $\mu\text{l}/2$  min) de una suspensión ajustada a  $8 \times 10^7$  propágulos fúngicos/ml en las narinas de cada ratón no anestesiado y se le permitió libre ventilación para que el hongo fuera adecuadamente inhalado. Se inocularon ratones, los cuales se sacrificaron posteriormente por dislocación cervical a los 60, 120, 180 y 360 min, respectivamente. Además, se sacrificaron ratones sin previa inoculación, para utilizarlos como testigos. Cada ensayo se realizó por duplicado.

## **RECUPERACIÓN DEL HONGO MEDIANTE SEMBRADO DE ÓRGANOS Y TEJIDOS**

Un fragmento recién obtenido, de cada una de las muestras disecadas a los diferentes tiempos post infección, se sembró en placas de agar-BHI (Bioxon) y se incubó durante 3 semanas a 28 °C. Al cabo de este tiempo, se identificó el hongo por los métodos de rutina en el laboratorio, según Taylor *et al.* (1999b).

## **DESCALCIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA NASAL**

Para algunos ensayos se realizó la decapitación del ratón, en los cuales, la piel de la cabeza fue retirada junto con la mayor cantidad de músculos y demás tejidos blandos, y asimismo los huesos supraorbitales, el cráneo, el cerebro, el maxilar inferior y la lengua, hasta dejar expuesto el conducto nasofaríngeo completo. Se procedió a fijarlo con

paraformaldehído al 4 % en Tris-HCl 0.1M (pH 7.4) durante 8 h; se lavó el material con Tris-HCl y se incluyó en parafina para seguir con métodos histológicos seleccionados y su posterior utilización en la observación de estructuras celulares tanto del hospedero como del parásito.

### **PROCESAMIENTO DE ÓRGANOS Y TEJIDOS DE RATONES INFECTADOS, PARA TINCIONES CON HEMATOXILINA-EOSINA (H-E), ÁCIDO PERYÓDICO-REACTIVO DE SCHIFF (PAS) Y GROCOTT**

Del tracto nasofaríngeo descalcificado, se realizaron cortes transversales de la cavidad nasal, a partir de la zona media entre los incisivos superiores y los premolares del maxilar superior del ratón, donde se ubica el NALT. Se realizaron disecciones para obtener muestras de los siguientes órganos y tejidos: mucosa nasal (incluyendo el NALT), ganglios cervicales, tráquea, pulmón, bazo, hígado e intestino. Se lavó cada muestra por separado en solución salina estéril (SSE) para posteriormente fijarla con paraformaldehído al 4 % en Tris-HCl durante 8 h; se lavó el material con Tris-HCl y se incluyó en parafina para seguir con los métodos histológicos seleccionados. Se emplearon las tinciones de H-E, PAS Y Grocott para evidenciar estructuras fúngicas de *H. capsulatum* en los órganos y tejidos procesados.

### **BÚSQUEDA DE ESTRUCTURAS FÚNGICAS DE *H. capsulatum* Y DE CD EN ÓRGANOS Y TEJIDOS DE RATONES INFECTADOS, POR INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) ESPECÍFICA**

Se siguieron los mismos procedimientos del inciso anterior para la obtención de las muestras. A continuación se lavó cada muestra por separado en SSE para posteriormente incluirla en resina Ortho Cutting Tissue (OCT) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) y congelar los bloques de cada órgano a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Antes de proceder al corte en congelación, cada bloque fue transferido a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por un corto periodo, para permitir la eliminación manual del exceso de resina. Se trabajó con el criostato en el intervalo  $-16$  a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se obtuvieron criosecciones de  $5\text{ }\mu\text{m}$  de grosor de los tejidos incluidos de cada muestra. Se seleccionaron los mejores cortes y se colocaron en portaobjetos especiales con carga positiva, Superfrost Plus (Shandon Inc. Pittsburgh, PA).

**Método de inmunoperoxidasa simple:** Cada corte se dejó secar al aire por 20 min para estabilizarlo, seguido de fijación en acetona total por 20 min y nuevo secado al aire. Se bloqueó la peroxidasa endógena, en cada preparación, adicionando peróxido de hidrógeno 1 % en metanol (vol/vol), durante 30 min a temperatura ambiente (TA) y en cámara húmeda (CH). Se lavó cada preparación tres veces por 5 min con Tris-HCl. Se bloquearon los sitios no reactivos con Tris-HCl /Triton X 100, 0.1 % /Albúmina Sérica Bovina 1 %, 1 h a TA y en CH. Todas las preparaciones fueron ligeramente lavadas e incubadas, durante toda la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en CH, con un suero hiperinmune de conejo anti-*H. capsulatum* diluido 1:100 en Tris-HCl, el cual fue probado previamente en inmunoensayo enzimático (ELISA) (Voller *et al.*, 1979) dando títulos  $>1:640$ . Al mismo tiempo, cortes duplicados de cavidad nasal y ganglio cervical fueron incubados con el anticuerpo monoclonal anti-CD, NLDC-145 (Serotec, Co. UK) hecho en rata y diluido

1:40 en Tris-HCl, para identificar el receptor tipo lectina de las CD denominado DEC-205, con especificidad para manosa.

Al día siguiente, se lavaron los cortes tres veces por 5 min y se incubaron por separado, durante 1 h a TA en CH, con los anticuerpos secundarios biotinilados apropiados diluidos 1:100 en Tris-HCl: anti-IgG de conejo obtenido en cabra (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) para revelar *H. capsulatum* o anti-IgG de rata hecho en cabra (ICN Biomedicals, Inc.) para revelar las CD. Se lavaron ambas series de preparaciones y se incubaron con el complejo avidina-peroxidasa diluido 1:100 en Tris-HCl durante 30 min a TA. En seguida, se lavaron de nuevo las preparaciones y se incubaron 2-3 min con solución de aminoetilcarbazol (AEC-Histostain, Zymed Laboratories, CA) hasta obtener una coloración rojiza. Posteriormente, se lavaron las series de preparaciones en agua corriente y se contratiñeron con hematoxilina de Mayer durante 30 s para después montarlas con resina hidrosoluble.

Los testigos, fueron cortes incubados con suero normal del animal en el que fue hecho el anticuerpo primario y procesados, en lo sucesivo, de la misma forma en que se describe anteriormente. Para el suero anti-*H. capsulatum* se utilizó como testigo un corte de ganglio peripancreático de una paciente que murió de histoplasmosis diseminada. La actividad del anticuerpo para NLDC-145 (marcador de CD) fue probada en cortes de timo, donde las CD corticomedulares y las células epiteliales son positivas.

**Método de doble inmunoperoxidasa:** De forma separada a la IHQ simple anteriormente descrita, se emplearon algunos cortes de mucosa nasal y ganglio linfático cervical para realizar doble localización en el mismo corte, tanto para *H. capsulatum* como para CD. Para ello, se modificó únicamente el cromógeno de la IHQ:

DAB (diaminobenzidina-Zymed) como cromógeno para *H. capsulatum* que produce un color café claro y AEC (aminoetilcarbazol-Zymed) como cromógeno para CD que produce un color rojo.

### **DISTRIBUCIÓN DE PROPÁGULOS DE *H. capsulatum* EN LA MUCOSA NASAL, POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)**

Una vez sacrificados los ratones, fueron decapitados y se les realizó un corte sagital, en fresco, de la cabeza para exponer la cara lateral del tracto respiratorio superior, incluyendo cavidad nasal, nasofaringe y laringe. Se procedió a fijar las dos mitades de la cabeza por inmersión en paraformaldehído al 4 % en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M (pH 7.4) durante 3 h a 4 °C. Después de lavarlas con el mismo amortiguador, la mitades de la cabeza fueron posfijadas en tetróxido de osmio al 1 % en cacodilato de sodio durante 1 h a 4 °C, para procesarlas por MEB (Bozzola & Russell, 1999) y observar la distribución y ubicación de células de *H. capsulatum* después de los diferentes tiempos de sacrificio post-contacto con la mucosa de la cavidad nasal.

### **DETECCIÓN MOLECULAR DE *H. capsulatum* EN ÓRGANOS Y TEJIDOS DE RATONES INFECTADOS, POR PCR-ANIDADA**

**Extracción de DNA:** De cada órgano extraído, se separó un fragmento de 25 mg para disgregarlo. Cada muestra se colocó en un tubo de centrifuga de 1.5 ml al que se le adicionó 180 µl de amortiguador ATL incluido en el QIAamp tissue kit (Qiagen, Hilden,



Alemania) y 20 µl de proteinasa K (Qiagen) a 1 mg/ml. Las muestras se incubaron a 55 °C durante toda la noche. Al día siguiente, éstas se expusieron a congelación con nitrógeno líquido por tres veces alternando con tres exposiciones de calentamiento en agua a 100 °C, para romper la pared celular de las levaduras de *H. capsulatum* presentes en los tejidos procesados. Se dejaron estabilizar a TA y de nuevo se les adicionó 20 µl de proteinasa K (1 mg/ml) y se incubaron otra vez a 55 °C con agitación, durante 1 h. Posteriormente, se agitaron las muestras en vórtex durante 15 min y se agregó, a cada una, 200 µl de amortiguador AL (Qiagen). Se mezcló bien y se incubó inmediatamente cada muestra a 70 °C para obtener una solución homogénea. En seguida se adicionó, a cada muestra, 200 µl de etanol (96-100%) y se mezcló por agitación con vórtex (para obtener una muestra homogénea, fue importante mezclarla de inmediato con el etanol, para evitar la formación de un precipitado blanco al adicionar éste; en caso de aparición del precipitado, éste fue disuelto con agitación). Las muestras se transfirieron por pipeteo a columnas Dneasy Mini Spin del kit (Qiagen) que fueron colocadas en tubos de colecta de 2 ml (Qiagen). Se centrifugaron a 8000 rpm x 1 min. Se eliminaron los eluidos y los tubos colectores de todas las muestras. Las columnas fueron colocadas en tubos colectores nuevos de 2 ml y se adicionó, a cada una, 500 µl del amortiguador AW1 (Qiagen) y se centrifugaron a 8000 rpm x 1 min. Se eliminaron de nuevo los eluidos y los tubos colectores. Se colocaron de nuevo las columnas en otros tubos colectores y se adicionó, a cada muestra, 500 µl de amortiguador AW2. Se centrifugaron las columnas a 14000 rpm x 3 min para secar la membrana que contenía el DNA y se desecharon los eluidos y los tubos colectores. Finalmente, para eluir el DNA, cada columna se colocó en un tubo Eppendorff de 1.5 o

2 ml y se pipetearon directamente 200 µl de amortiguador AE (Qiagen), previamente calentado a 65 °C, sobre la membrana que contenía el DNA, seguido de incubación a TA por 1 min y de centrifugación a 8000 rpm x 1 min. El DNA obtenido de cada muestra, se guardó a -20 °C hasta su uso.

**Iniciadores para la PCR específica de *H. capsulatum*:** Los iniciadores empleados en la PCR-anidada, propuestos por Bialek *et al.* (2002), delimitan una secuencia nucleotídica (no. de acceso GenBank AJ005963) de un gen que codifica para una proteína de 100 kDa específica de *H. capsulatum* (Hcp100). Los iniciadores para la primera PCR fueron: Hc I (5'-GCG TTC CGA GCC TTC CAC CTC AAC-3') y Hc II (5'-ATG TCC CAT CGG GCG CCG TGT AGT-3') que corresponden a una banda de 391 bp. Los iniciadores para la segunda PCR (anidada) fueron: Hc III (5'-GAG ATC TAG TCG CGG CCA GGT TCA-3') y Hc IV (5'-AGG AGA GAA CTG TAT CGG TGG CTT G-3') que corresponden a una banda de 210 bp.

**Ensayos de PCR:** La mezcla de la primera reacción de PCR consistió en 2 µl de DNA extraído de cada órgano, en un volumen total de 25 µl por tubo. De los cuales fueron: 13.8 µl de agua destilada, 2 µl de Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), 1 µl de MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 1 µl de cada uno de los iniciadores Hc I y Hc II 1 µM (Roth, Karlsruhe, Alemania), 0.2 µl de *ampliTaq* DNA polimerasa a 1 U/ µl (Perkin-Elmer, Foster City, CA) y 1 µl de cada desoxinucleósido trifosfato (DNTPs) a 200 U/ µl (Promega, Madison, WS). La mezcla de la segunda reacción de PCR (anidada) fue idéntica, excepto porque para ésta, se utilizó 1 µl del producto de la primera reacción, 1 µl más de agua destilada para completar los 25 µl del volumen de reacción y los iniciadores Hc III y Hc IV. Ambas reacciones de PCR se corrieron con el siguiente programa: un ciclo de 94 °C por 5 min, 35 ciclos de

94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, con una extensión final de 72 °C por 5 min. Las PCR fueron corridas en un termociclador BIO-RAD (Bio-Rad Laboratories, Inc. CA). Los productos de las PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % con amortiguador TAE 1 X, a 100 V y en un tiempo de corrida de 60 min, teñidos con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio y visualizados con un transiluminador de luz ultravioleta. En todos los ensayos se utilizaron los volúmenes correspondientes de DNA puro de cepas de referencia de *H. capsulatum* para cada PCR como testigo positivo, como negativo se utilizó agua estéril y como marcador de tamaño molecular se utilizó 100 bp DNA Ladder (Invitrogen- Tech-Line Life, USA).

## RESULTADOS

A partir de las siembras de fragmentos de cada órgano estudiado de los ratones sacrificados, se recuperó el hongo en fase micelial, únicamente en ganglio a las 3 h y en tráquea a las 6 h post infección.

### **OBSERVACIÓN DE CÉLULAS DE *H. capsulatum* EN ÓRGANOS Y TEJIDOS DE RATONES INFECTADOS, POR TINCIONES HISTOLÓGICAS CONVENCIONALES**

En los cortes transversales del conducto nasofaríngeo descalcificado, se ubicó el NALT. Este linfoepitelio, en ratones, se encuentra en el tercio medio del piso de la cavidad nasal, en el ángulo formado entre el hueso del paladar y el hueso del cornete inferior, y es bastante evidente con la tinción de H-E (Fig. 1 a y b).

La tinción de H-E, mostró células compatibles con levaduras de *H. capsulatum* intra e intercelulares en el NALT, a partir de las 3 h post infección (Fig. 1 c). Asimismo, se observaron sitios en el epitelio que recubre al NALT por donde, posiblemente, transitaban levaduras de *H. capsulatum* (Fig. 1 d). Por el método de PAS, tanto en el epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado de la mucosa nasal (Fig. 2 a) como en la médula (Fig. 2 b), se observaron levaduras de *H. capsulatum*; por el método de Grocott, en el seno subcapsular de los ganglios linfáticos cervicales, se observaron levaduras dentro de una posible célula dendrítica velada (Fig. 2 c). En ningún otro órgano se encontraron estructuras fúngicas en este tiempo.

## **OBSERVACIÓN DE CÉLULAS DE *H. capsulatum* EN ÓRGANOS Y TEJIDOS DE RATONES INFECTADOS, POR IHQ SIMPLE**

A las 3 h post infección, mediante IHQ, se observaron células compatibles con levaduras de *H. capsulatum* únicamente en mucosa nasal (Fig. 3 a y b), incluyendo al NALT (Fig. 3 c), y en ganglios linfáticos cervicales (Fig. 3 d). A las 6 h en la tráquea, se observó una gran cantidad de levaduras en su mayoría intracelulares, distribuidas heterogéneamente dando la apariencia de tránsito en el epitelio cilíndrico ciliado (Fig. 4 a) y cúmulos de levaduras en la lamina propia (Fig. 4 a). En el resto de los órganos estudiados no se revelaron estructuras fúngicas.

Los testigos de cortes de tejidos murinos procesados con suero normal, resultaron negativos como se observa en el ganglio linfático cervical de ratón (Fig. 5 a), mientras que el ganglio peripancreático de una paciente con diagnóstico *postmortem* de histoplasmosis, utilizado como testigo positivo, presentó numerosas estructuras fúngicas libres y dentro de fagocitos, cuando fueron incubadas con suero específico y reveladas por la tinción de IHQ (Fig. 5 b).

## **OBSERVACIÓN DE CÉLULAS DE *H. capsulatum* Y CD EN ÓRGANOS Y TEJIDOS DE RATONES INFECTADOS, POR DOBLE IHQ**

La doble IHQ en cortes de mucosa nasal y de ganglio linfático cervical, incubados primero con suero hiperinmune anti-*H. capsulatum* y después con anticuerpo anti-NLDC-145, mostró colocalización de *H. capsulatum* y de CD (Fig. 6 a-c). Las figuras 6 a y b, destacan levaduras de *H. capsulatum* intracelulares en CD subepiteliales e

intersticiales de mucosa nasal, aunque también se encontraron levaduras extracelulares. En el ganglio linfático se hallaron levaduras intracelulares en CD (Fig. 6 c). Los testigos positivos para probar la actividad del anticuerpo anti-NLDC-145 revelaron CD, tanto en los cortes de mucosa nasal como en el timo de ratón (Fig. 6 d y e).

### **DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS DE *H. capsulatum*, EN LA MUCOSA NASAL DE RATONES INFECTADOS, OBSERVADA POR MEB**

La figura 7 muestra el corte sagital de la cavidad nasal a las 3 h post infección, observado por MEB. Las imágenes a mayor aumento, permitieron reconocer estructuras fúngicas adheridas a la mucosa que corresponden, morfológicamente, a células de *H. capsulatum* compatibles con la fase levaduriforme del hongo, debido a que presentan gemación (Fig. 8 a). Un hallazgo azaroso, fue la observación de levaduras adheridas a eritrocitos extravasados accidentalmente al tracto nasorespiratorio, algunas de éstas también presentaban gemación (Fig. 8 b). Finalmente, la MEB permitió tener una visión de la dinámica del desplazamiento de las células del hongo en la mucosa nasal a las 3 h post infección, ya que se observó una disminución gradual de la cantidad de estructuras fúngicas en el examen progresivo de la zona anteroposterior del tracto nasorespiratorio.

## PCR-ANIDADA

Los ensayos realizados con este método molecular, detectaron la presencia de DNA de *H. capsulatum* tanto en ganglios linfáticos cervicales a las 3 h como en tráquea a las 6 h post infección. En ambos casos, se obtuvieron bandas muy débiles de 391 bp en la primera PCR, las cuales se amplificaron en la segunda PCR (anidada) revelando bandas nítidas de 210 bp, correspondientes a un fragmento del gen que codifica para la proteína Hcp100 de este hongo (Fig. 9 a). Los demás órganos analizados con la misma metodología no mostraron bandas de DNA de *H. capsulatum*, en ninguno de los tiempos estudiados (Fig. 9 b).

## DISCUSIÓN

Hasta la fecha se siguen considerando tres etapas en el curso inicial de la infección por *H. capsulatum*: 1) la infección en hospederos mamíferos se lleva a cabo a través de la inhalación de propágulos infectivos que llegan directamente a los alvéolos de los bronquiolos terminales; 2) la primoinfección de la histoplasmosis se establece en el pulmón, a partir de la transición dimórfica de *H. capsulatum* (previamente reportada a las 6 h después de la inhalación de los propágulos) y de la consecutiva replicación de levaduras dentro de M $\phi$  alveolares; 3) desde este momento se puede iniciar la diseminación sistémica del hongo vía hemática y/o linfática (Gildea *et al.*, 2001; Tewari *et al.*, 1998). Aunque las etapas anteriores están bien documentadas (Emmons *et al.*, 1977, Kimberlin *et al.*, 1981, Gildea *et al.*, 2001; Newman, 2005), no constituyen las únicas opciones para el establecimiento y diseminación del hongo en el hospedero. El presente trabajo plantea que existe, por lo menos, una vía paralela que puede ser utilizada por *H. capsulatum*, una vez ingresado al hospedero, para seguir su curso infeccioso y desarrollar una posible enfermedad.

En todos los casos de infecciones por patógenos que utilizan las vías respiratorias para entrar y acceder al sitio más vulnerable de su hospedero en turno, la mucosa nasal representa su primer punto de contacto (Heritage *et al.*, 1997). Ésta, puede ser un sistema interactivo en el cual suceden múltiples eventos de la respuesta inmune asociada a mucosas, como adherencia, reconocimiento, fagocitosis, procesamiento y presentación de antígenos. Considerando que para el patógeno en cuestión, el hongo dimórfico *H. capsulatum*, la mucosa nasal cumple con las características de



temperatura y humedad requeridas para que se lleve a cabo su transición M-L y que una vez cambiado al morfotipo L (fase virulenta) puede recurrir a una serie de estrategias que le permitirán sobrepasar a los ambientes hostiles intra- y extracelulares del hospedero (Eissenberg & Goldman, 1991; Retallack & Woods, 1999), la interacción con la mucosa nasal podría representar un papel crucial como primera línea de defensa del hospedero y por ende definir el curso clínico de la enfermedad en hospederos con distintas características inmunológicas.

La importancia de la participación de la mucosa nasal en la infección respiratoria por propágulos de *H. capsulatum* fue cuidadosamente rastreada en un modelo de infección *in vivo*, a partir de la primera hora hasta las 6 h post infección. Las técnicas histológicas, de inmunohistoquímica y de microscopia electrónica, además del apoyo de una metodología molecular (PCR-anidada), permitieron evidenciar al hongo en los ratones infectados y sacrificados a partir de las 3 h post infección, y en particular, constatar e inferir su tránsito hacia órganos y tejidos mas internos. La recuperación del hongo del tejido infectado por siembra de éstos, en medios de cultivos, constituyó una prueba fehaciente de la infección.

La presencia de levaduras de *H. capsulatum* interaccionando con componentes del NALT, sugiere que este linfotejido juega un papel importante en las rutas de infección y el destino de este hongo, ya que está altamente vascularizado hemática y linfáticamente; además compromete la participación de células dendríticas. La presencia de levaduras en CD de los ganglios linfáticos cervicales (evidenciadas con la tinción de Grocott), plantea la posibilidad de que las CD observadas en la mucosa nasal y el NALT transportan al hongo a través de los vasos linfáticos que drenan a estos

tejidos y que, en su momento, llegan a los ganglios regionales más cercanos, donde algunas levaduras son procesadas *in situ* por CPAs locales (CD y M $\phi$ ), disparando desde ahí la respuesta inmune. También es posible que algunas levaduras puedan alcanzar la diseminación sistémica en el hospedero, continuando su viaje vía linfática y/o hemática desde los ganglios linfáticos o utilizando una vía intercelular a través de la unión a componentes de matriz extracelular. Aunque no se observaron levaduras de *H. capsulatum* en los otros órganos estudiados a las 3 h post infección, y que, no obstante a las 6 h post infección se encontraron en tráquea levaduras aisladas en el epitelio y en cúmulos en la lámina propia, quedan en tela de juicio los tiempos de diseminación del hongo en hospederos con diferentes susceptibilidades y su relación con cepas de distinta virulencia.

Las figuras de MEB mostradas en este trabajo, ilustran estructuras fúngicas en proceso de gemación, el cual es un evento de multiplicación típico de levaduras. Además, es de interés destacar que este proceso fue observado sólo en la superficie de la mucosa nasal a partir de las 3 h post infección, lo cual, apoya el hallazgo de la conversión dimórfica *in vivo*, a un menor tiempo que el reportado en la literatura que es de 6 h.

La mayoría de las infecciones por *H. capsulatum* son subclínicas por lo que frecuentemente son eliminadas por la respuesta inmune del hospedero (Canteros, 2005; Newman, 2005). El no mostrar un cuadro clínico que sugiera una infección, no implica que el hospedero no posea al antígeno, por lo que en la actualidad, se emplean técnicas moleculares como, diferentes métodos de PCR, los cuales permiten revelar la presencia de DNA del hongo en los tejidos del hospedero parasitado. En este trabajo, se utilizó un ensayo de PCR-anidada con iniciadores específicos para un fragmento de

un gen que codifica para una proteína de *H. capsulatum*. El fragmento génico amplificado fue acotado en su homología con otros genes similares de distintos organismos, con el fin de alcanzar su especificidad única para *H. capsulatum*. El haber encontrado DNA de este fragmento único del hongo, en ganglio de ratón desde las 3 h y en tráquea a las 6 h post infección, ratifica con precisión los hallazgos observados con las técnicas histológicas antes mencionadas.

Los resultados del presente estudio apoyan la propuesta de tres nuevos planteamientos en la infección inicial por el hongo:

- 1) Que la transición dimórfica del hongo a partir del primer contacto con la mucosa nasal del hospedero, se lleva a cabo en un tiempo menor a 6 h (Emmons *et al.*, 1977; Kimberlin *et al.*, 1981), lo cual es sustentado por la microscopia electrónica del corte sagital de la cabeza del ratón inoculado con *H. capsulatum* y sacrificado 3 h después, en la que se puede apreciar estructuras fúngicas en proceso de gemación.
- 2) Que existe la opción de una ruta de ingreso más corta, a partir del primer sitio de contacto con el hospedero, que es la mucosa nasal. La nariz, como parte de un organismo vivo, posee características morfofisiológicas en sus componentes epiteliales, comunes al resto de las demás mucosas, ya que también posee células que pueden fagocitar microorganismos y partículas pequeñas que ingresan por la vía aérea y pueden ser captadas por CD en curso, las cuales, pueden definir el destino de tales antígenos, ya sea para destruirlos parcial o totalmente, o bien, para procesarlos y transportarlos hacia los ganglios linfáticos regionales más cercanos, donde serán presentados a los linfocitos T para dar inicio a una respuesta inmune adaptativa.

**3)** Que el proceso de diseminación de *H. capsulatum* en el hospedero puede iniciarse a partir de su internalización en la mucosa nasal desde las 3 h post infección, posiblemente ayudado por las células epiteliales y las CD subepiteliales e intersticiales, ya que encontramos, en este tiempo, levaduras de *H. capsulatum* en CD que ingresan a los senos subcapsulares y en la paracorteza de los ganglios linfáticos cervicales (ver Fig. 2 c), mediante los vasos linfáticos eferentes que provienen desde los tejidos circunvecinos de la mucosa nasal, incluyendo al NALT.

## CONCLUSIONES

- Los resultados destacan la importancia de la mucosa nasal y de los ganglios linfáticos cervicales que la drenan, como sitios de inicio de la infección por *H. capsulatum*.
- La morfología de las estructuras fúngicas observadas por MEB sugiere que la transición M-L puede ocurrir desde la mucosa nasal a partir de las primeras 3 h post infección y no estrictamente a las 6 h en M $\phi$  alveolares, como lo cita la literatura.
- Las células epiteliales asociadas al NALT participan en el tránsito de células de *H. capsulatum* desde la superficie de la mucosa hacia el tejido linfoide subepitelial, donde el hongo entra en contacto con CD y M $\phi$ , además de vasos linfáticos y sanguíneos para, eventualmente, ser diseminado a otros órganos.
- La presencia de *H. capsulatum* en los ganglios linfáticos cervicales permite inferir que las CD epiteliales e intersticiales actúan en la captación, transporte y destino del hongo a partir de la mucosa nasal.
- Los ensayos de PCR-anidada demostraron la presencia de DNA del patógeno a las 3 h post infección, únicamente en mucosa nasal y ganglios linfáticos regionales. También revelaron el patógeno en tráquea a las 6 h post infección. Lo anterior confirmó los hallazgos histológicos.

- Tanto el estudio histológico como el molecular (PCR-anidada), no demostraron compromiso de los demás órganos estudiados en los diferentes tiempos.

## BIBLIOGRAFÍA

**Allendoerfer R**, Biovin GP, Deepe GS Jr. 1997. Modulation of immune responses in murine pulmonary histoplasmosis. *J Infect Dis* 175: 905-914.

**Banchereau J**, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.

**Bialek R**, Feucht A, Aepinus C, Just-Nübling, Robertson V, Knobloch J, Hohle R. 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol* 40: 1644-1647.

**Bozzola J**, Russell L. 1999. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. 2<sup>a</sup> ed. Massachusetts: Jones & Bartlett Publishers.

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

**Bullock WE**, Wright SD. 1987. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95 in binding of *Histoplasma capsulatum* by human macrophages. *J Exp Med* 165: 195-210.

**Canteros C**. 2005. Caracterización de cepas de *Histoplasma capsulatum* asociadas a histoplasmosis en

pacientes con inmunocompromiso severo. Tesis de Doctorado. México, DF: UNAM.

**Casadevall A**, Pirofski LA. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* 67: 3703-3713.

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

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

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

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

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

**Emmons** C, Binford C, Utz, Kwon-Chung K. 1977. Histoplasmosis. *In* Medical Mycology. 3<sup>rd</sup> ed., pp. 305-341. Philadelphia: Lea & Febiger.

**Fujita** T. 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2: 346-356.

**Gildea** LA, Morris RE, Newman SL. 2001. *Histoplasma capsulatum* yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *J Immunol* 166: 1049-1056.

**Heritage** P, Underdown B, Arsenault A, Snider D, Dermott M. 1997. Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 1256-1262.

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

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

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

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

**Kimberlin** C, Harri A, Hempel H, Goodman N. 1981. Interactions between *Histoplasma capsulatum* and macrophages from normal and treated mice. Comparison of the mycelial and yeast phases in alveolar and peritoneal macrophages. *Infect Immun* 34: 6-10.

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

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

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

**Lotze** M, Thomson A. 2001. Dendritic cells. 2<sup>a</sup> ed. London: Academic Press.



**Medzhitcov R, Janeway CA Jr.** 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296: 298-300.

**Montagnoli C, Bacci A, Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Romani L.** 2002. The interaction of fungi with dendritic cells: Implications for Th immunity and vaccination. *Curr Mol Med* 2: 485-505.

**Newman SL.** 1999. Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum*. *Trends Microbiol* 7: 67-71.

**Newman SL.** 2005. Interaction of *Histoplasma capsulatum* with human macrophages, dendritic cells, and neutrophils. *Methods Mol Med* 118:181-191.

**Newman SL, Bucher C, Rhodes J, Bullock WE.** 1990. Phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* yeasts and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages. Cellular cytoskeleton requirement for attachment and ingestion. *J Clin Invest* 85: 223-230.

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

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

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

**Odds FC, Gow NAR, Brown AJP.** 2001. Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol* 2:1009.

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

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

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

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

**Romani L.** 2002. Innate immunity against fungal pathogens. *In* Fungal pathogenesis: Principles and Clinical Applications. Calderone RA, Chilar RL (eds.), pp. 401-432. Marcel Dekker.

**Romani L, Bistoni F, Puccetti P.** 2002. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol* 10: 508-514.

**Roney PJ.** 2002. Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol* 4: 127-137.

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

**Schorey JS.** 1997. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* 277: 1091-1093.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Tewari R, Wheat LJ, Ajello L.** 1998. Agents of Histoplasmosis. In Topley & Wilson's. Microbiology and Microbial Infections. Medical Mycology. Volume 4.

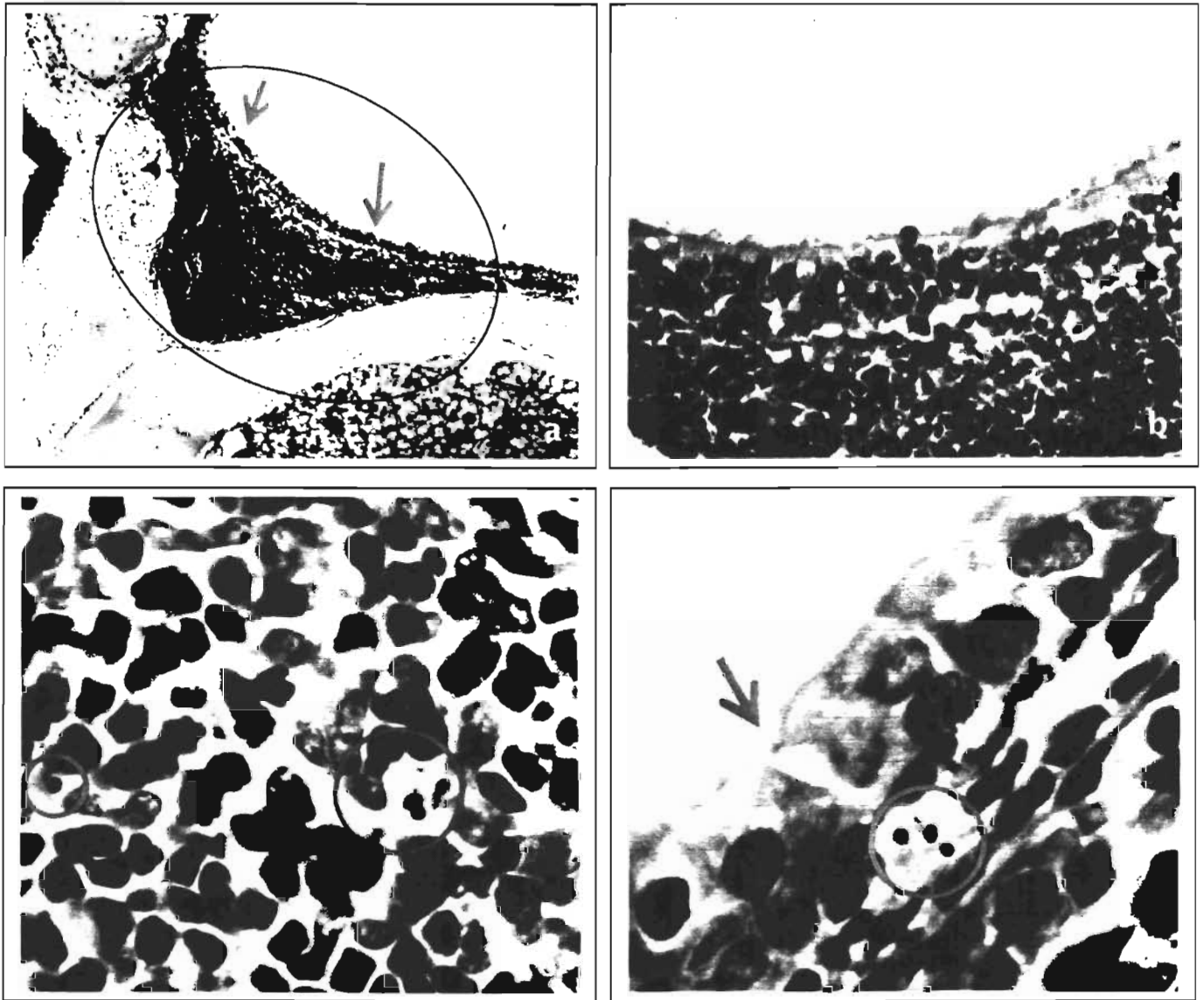
Ajello L, Hay RJ (eds.), pp. 373-393. New York: Arnold and Oxford University Press, Inc.

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

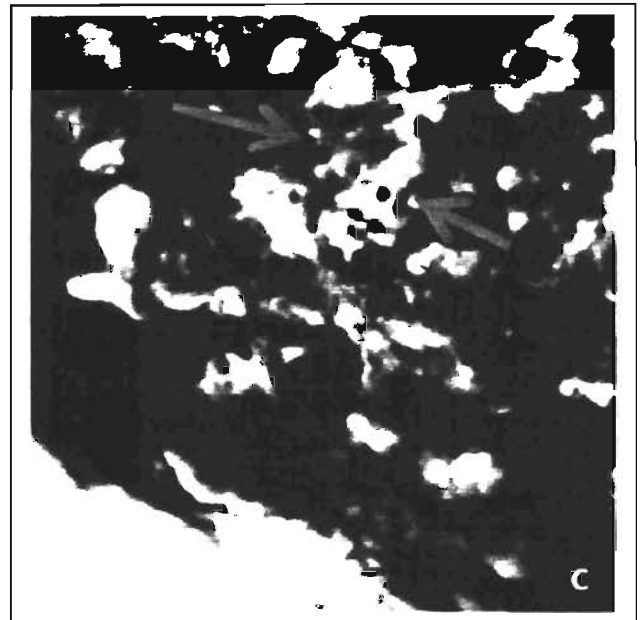
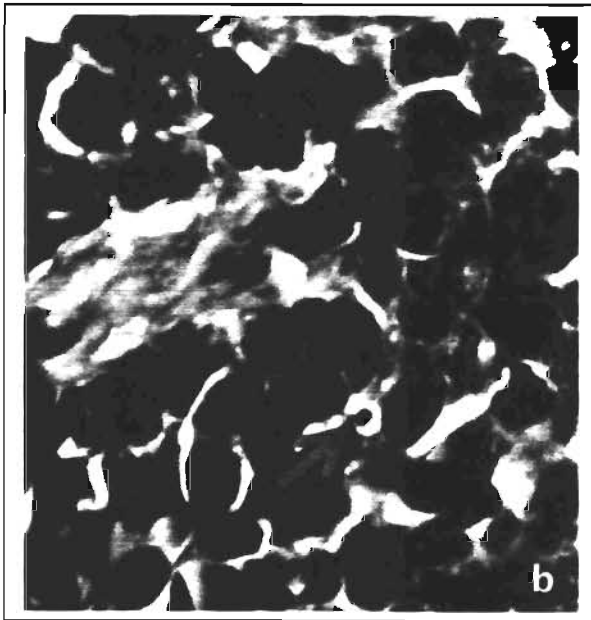
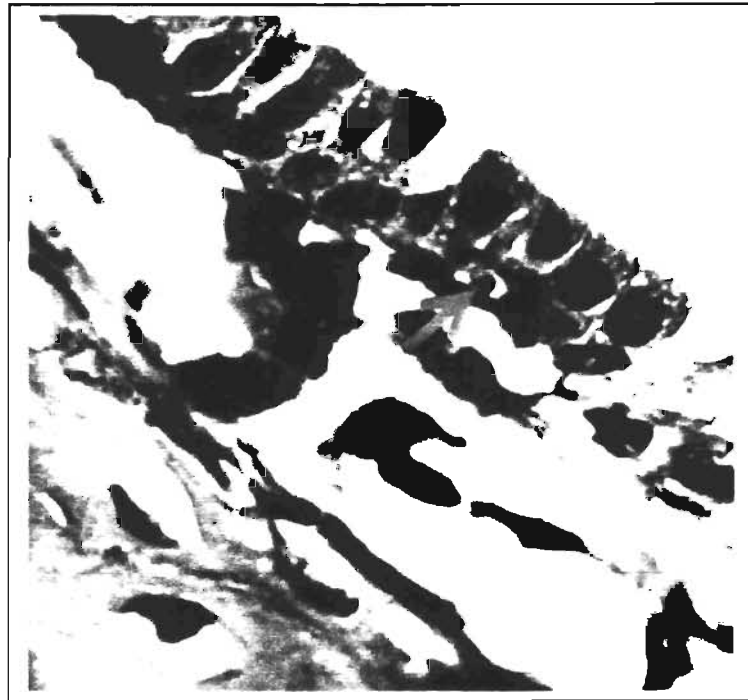
**Wolf JE, Abegg AL, Travis SJ, Kobayashi GS, Little JR.** 1989. Effects of *Histoplasma capsulatum* on murine macrophage functions: inhibition of macrophage priming, oxidative burst, and antifungal activities. Infect Immun 57: 513-519.

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

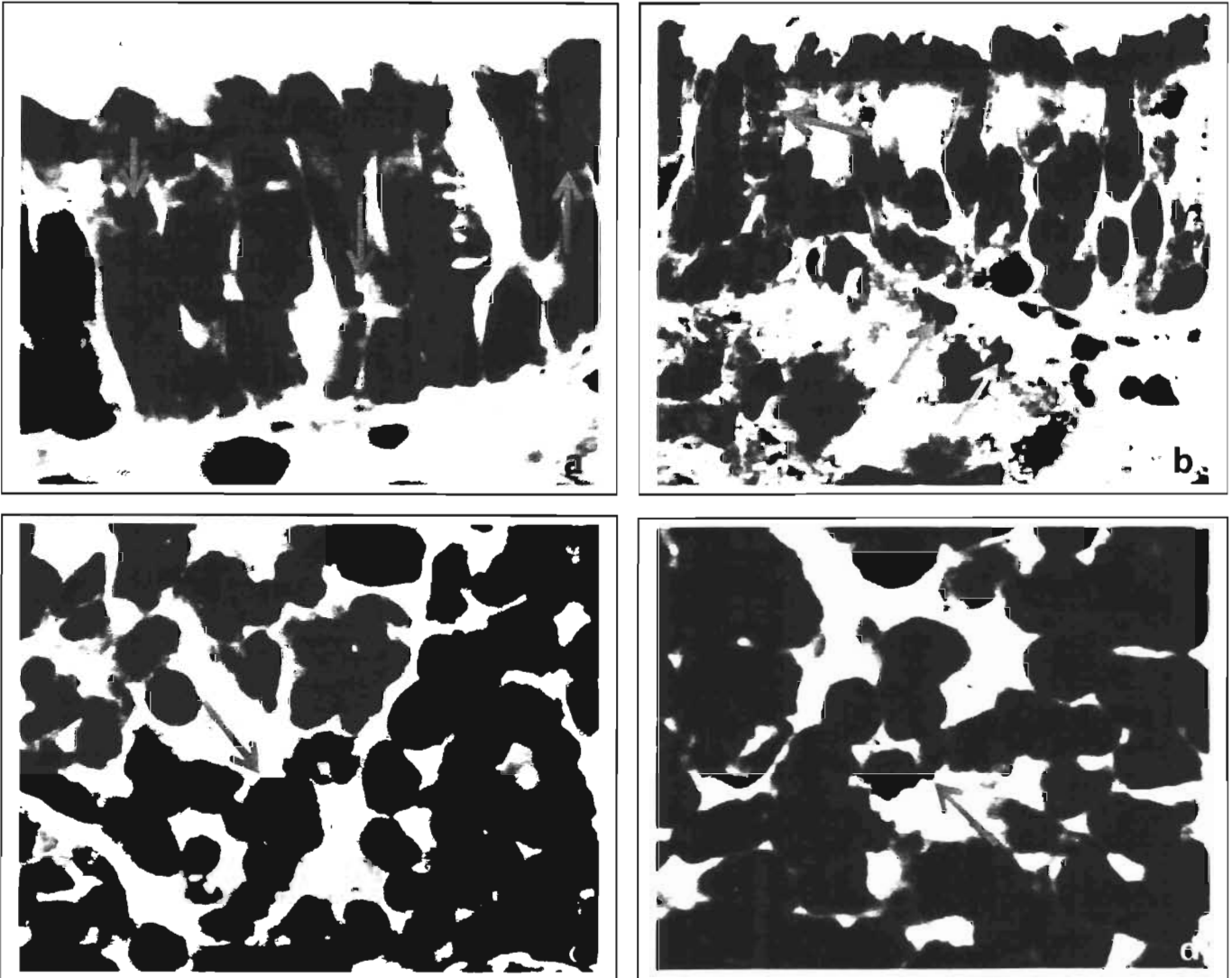
**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**



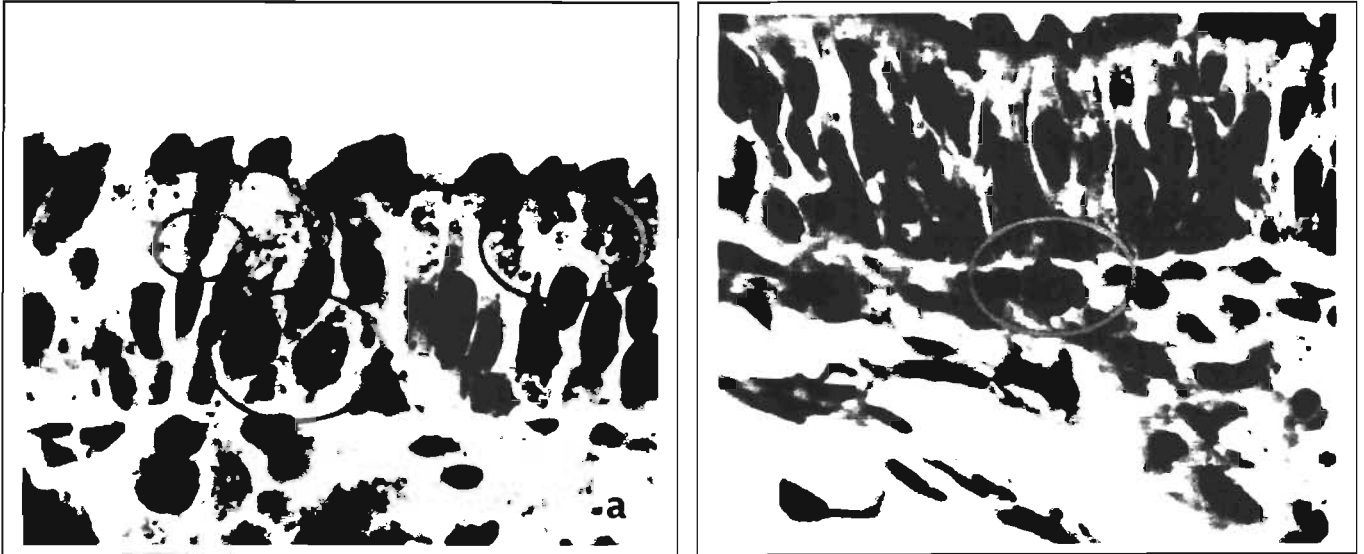
**Figura 1 (a-d). Estructura del tejido linfoide asociado a la nariz (NALT) y su asociación con *H. capsulatum*.** Se utilizó la tinción H-E. a) El óvalo encierra al NALT y las flechas indican el epitelio que lo recubre, 100x; b) Imagen ampliada del NALT, 400x; c) Los círculos encierran levaduras de *H. capsulatum* en la zona linfoide del NALT, 1000x; d) La flecha señala el sitio por donde, posiblemente, entraron las células de *H. capsulatum* (encerradas en el círculo), 1000x. Los tejidos con células fúngicas proceden de ratones sacrificados 3 h post infección (ver detalles en Materiales y Métodos).



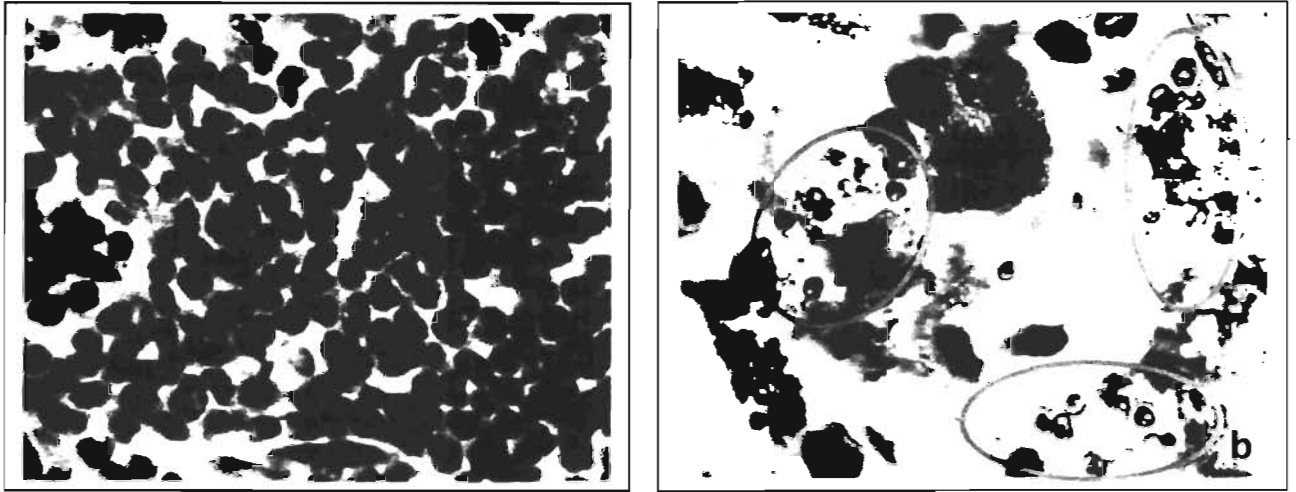
**Figura 2(a-c). Levaduras de *H. capsulatum* inter e intracelulares.** a) En la base del epitelio de la mucosa nasal, PAS; b) En la médula ganglionar, PAS; y c) Dentro de una CD en el seno subcapsular de los ganglios linfáticos cervicales, Grocott. Las flechas indican levaduras de *H. capsulatum*. Las imágenes fueron amplificadas 1000x. Los tejidos con células fúngicas proceden de ratones sacrificados 3 h post infección.



**Figura 3(a-d). Levaduras de *H. capsulatum* inter e intracelulares.** Se utilizó la técnica específica de IHQ (ver detalles en Materiales y Métodos). a y b) Epitelio de la mucosa nasal del ratón; c) En el NALT; d) En los ganglios linfáticos cervicales. Las flechas destacan levaduras de *H. capsulatum*. Las imágenes fueron amplificadas 1000x. Todos los tejidos con células fúngicas proceden de ratones sacrificados 3 h post infección.

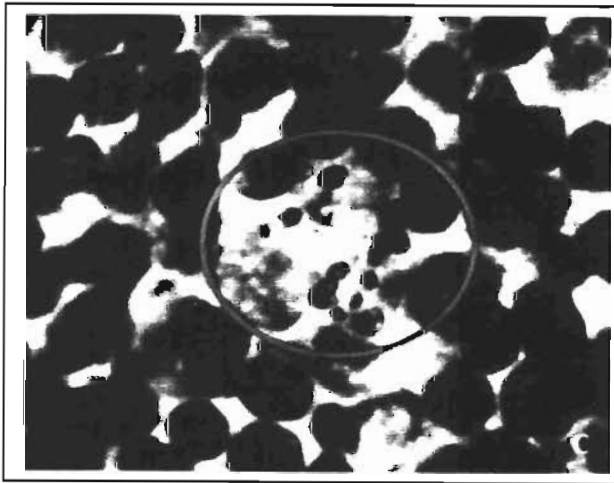
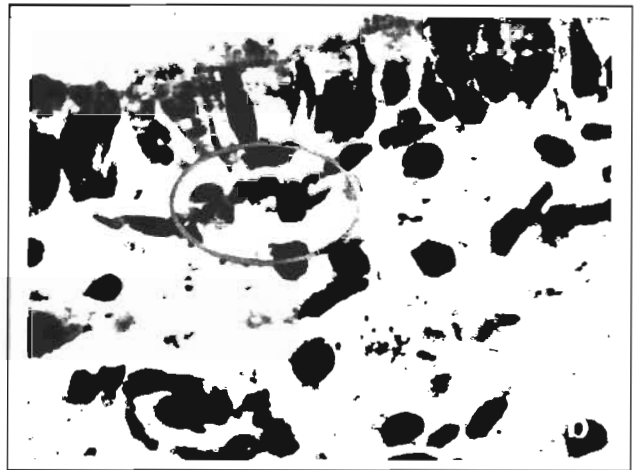


**Figura 4(a,b).** Levaduras de *H. capsulatum* en cortes de tráquea. Se utilizó la técnica específica de IHQ (ver detalles en Materiales y Métodos). a) Epitelio cilíndrico ciliado; b) Lámina propia con cúmulos de levaduras. Los óvalos encierran algunas levaduras de *H. capsulatum*. Las imágenes fueron amplificadas 1000x. Los tejidos con células fúngicas proceden de ratones sacrificados 6 h post infección.

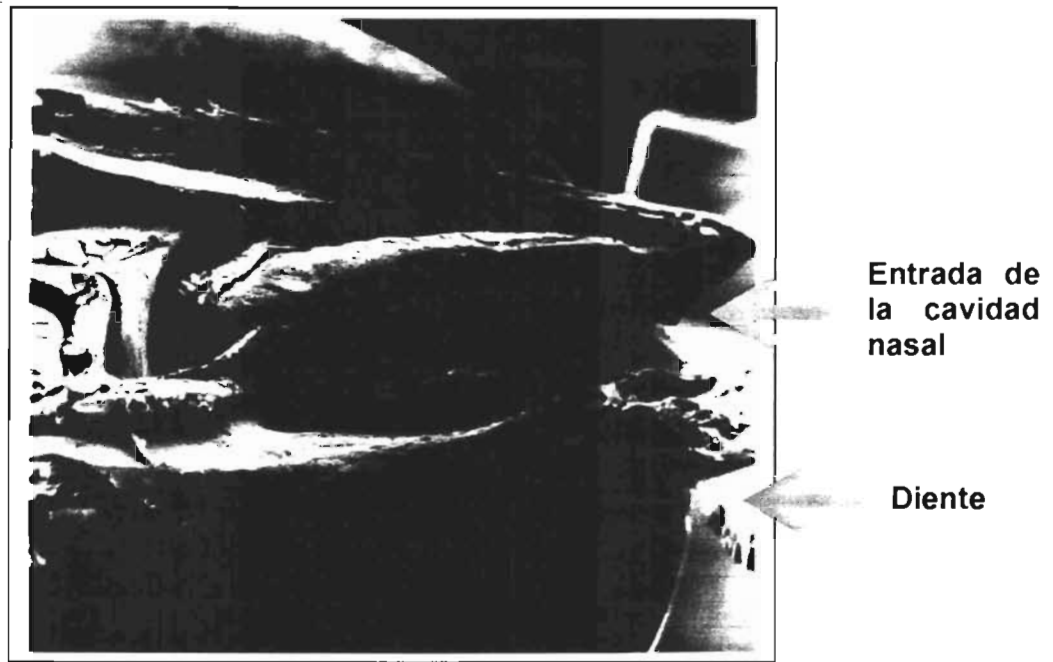


**Figura 5(a,b).** Cortes de tejidos procesados como testigos. Se utilizó la técnica específica de IHQ (ver detalles en Materiales y Métodos); los cortes fueron contrateñidos con Hematoxilina de Mayer. a) Ganglio murino procesado con suero normal como testigo negativo; 400x b) Ganglio peripancreático de una paciente con histoplasmosis como testigo positivo, 1000x. Los óvalos encierran levaduras de *H. capsulatum*.

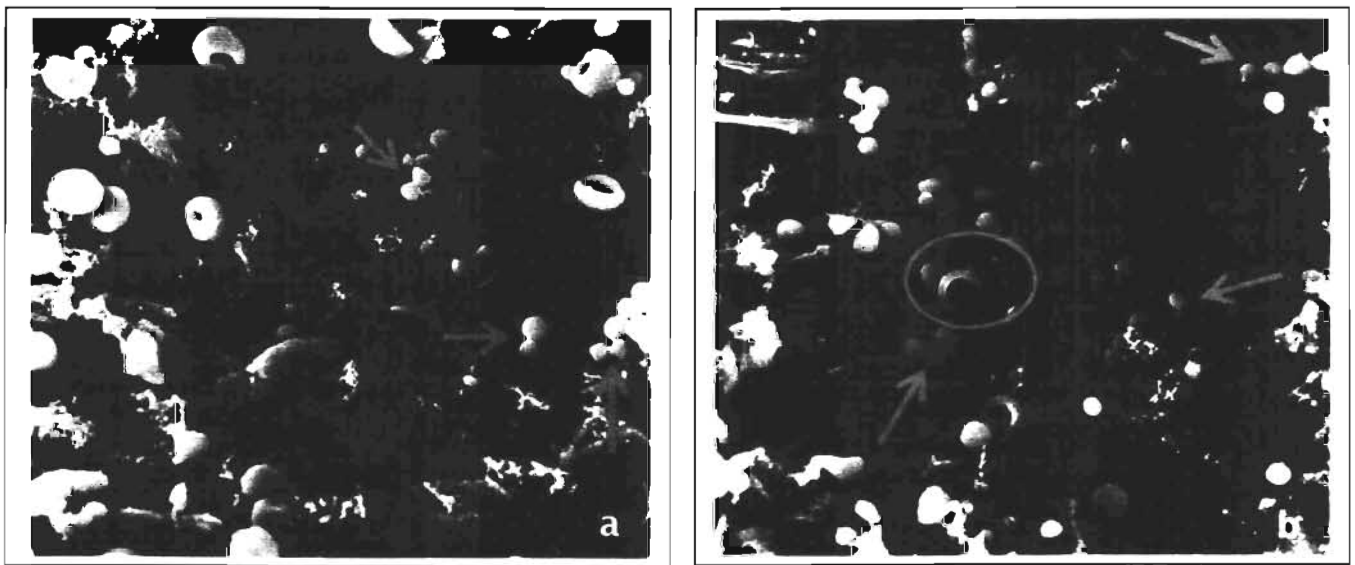




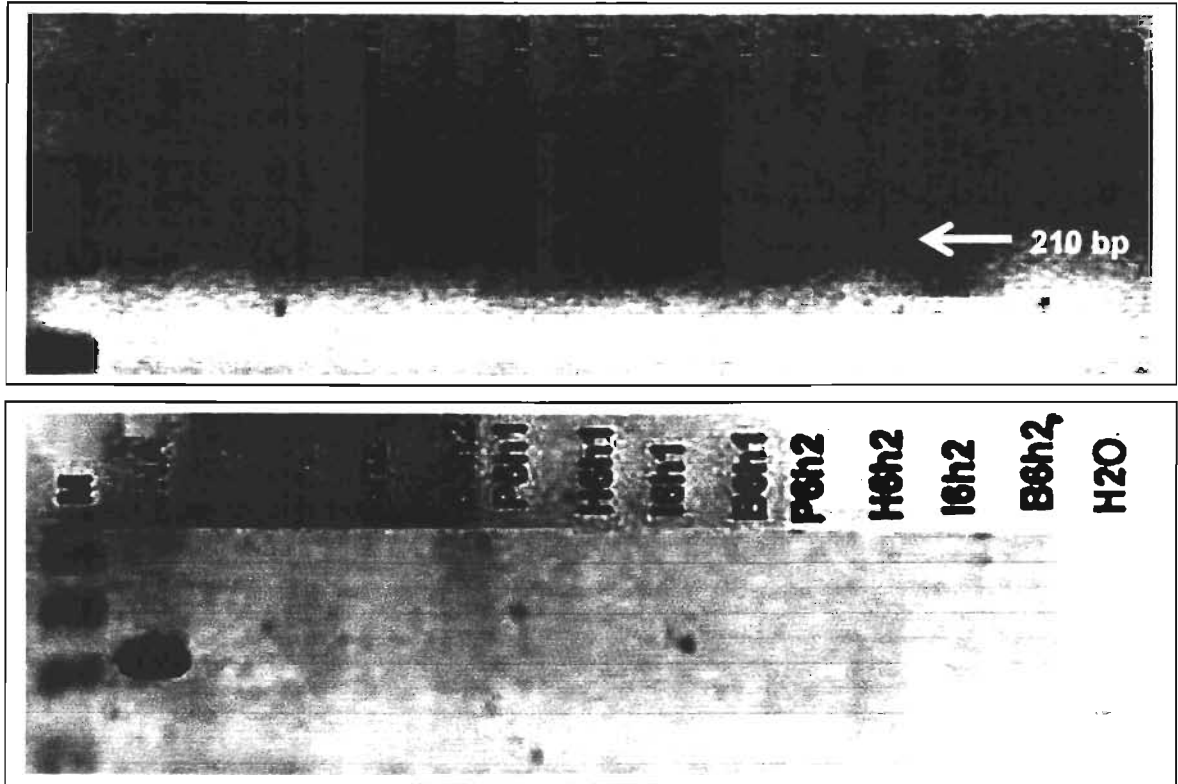
**Figura 6(a-e).** Inmunohistoquímica para *H. capsulatum* y CD. a y b) Mucosa nasal de ratón infectado; c) Ganglio linfático cervical. Estos tejidos fueron procesados por una IHQ doble, con anticuerpos anti-*H. capsulatum* y anti-NLDC-145, utilizando como cromógenos AEC (aminoetilcarbazol) para *H. capsulatum* (color rojo) y DAB (diaminobenzidina) para CD (color café claro). Como testigos positivos para la detección específica de CD se utilizaron: d) Mucosa nasal de ratón infectado y e) Timo de ratón sano; ambos procesados en una IHQ simple con el anticuerpo anti-NLDC-145 y teñidos con AEC. Los tejidos con células fúngicas proceden de ratones sacrificados 3 h post infección. Las imágenes a, c y e fueron amplificadas 1000x; b y d 400x. Las flechas indican células dendríticas y los óvalos encierran CD con levaduras de *H. capsulatum*.



**Figura 7. MEB del corte sagital de la cabeza del ratón.** El corte se realizó con una navaja de costilla, previo al procesamiento para MEB. La imagen fue ampliada 1500x.



**Figura 8(a,b). MEB de la mucosa nasal expuesta por el corte sagital de la cabeza del ratón infectado.** a) Las flechas indican células de *H. capsulatum*, compatibles con la fase levaduriforme del hongo, en proceso de gemación; b) Levaduras adheridas a eritrocitos, algunas en gemación (óvalo). Los cortes con células fúngicas proceden de ratones sacrificados 3 h post infección (ver detalles en Materiales y Métodos). Las imágenes fueron amplificadas 1500x.



**Figura 9(a,b). PCR-anidada para detectar la presencia de DNA de *H. capsulatum* en órganos y tejidos de ratones infectados.** a) Amplificación en la segunda PCR de la banda de 210 bp específica de *H. capsulatum*; b) Ausencia de DNA fúngico amplificado en los demás órganos. Los ensayos de PCR se realizaron con órganos de ratones sacrificados a las 3 y 6 h post infección (ver detalles en Materiales y Métodos). Abreviaciones: G= ganglio linfático cervical; T= tráquea; P= pulmón; H= hígado; I= intestino; B= bazo; M= marcador molecular 100 bp DNA Ladder; H<sub>2</sub>O= control negativo; DNA= control positivo de DNA obtenido de la fase micelial de *H. capsulatum*.