

INFECCION *IN VITRO* DE *HISTOPLASMA CAPSULATUM* EN MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON

por Maria Lucia Taylor*
Blanca Rico Galindo*
María Teresa Benítez**
Gerardo Díaz Sánchez**
Ana María Castro*
Guadalupe Polito Alarcón* y
Conchita Toriello*

IN VITRO INFECTION WITH *HISTOPLASMA CAPSULATUM* IN MICE PERITONEAL MACROPHAGES

SUMMARY

The importance of the macrophage in the histoplasmal infection, was investigated during an *in vitro* study of the binomial macrophage-fungus. Different techniques were used including optical microscopy, histochemical methods with fluorescein isothiocyanate and finally using electronic microscopy. The optimal resolution dose of the *in vitro* infection by the macrophages was estimated (5×10^5 yeasts/ 10^6 macrophages). With this dose a phagocytic time infection kinetic was obtained in order to determine the resolution of infection at different time intervals. The data observed with these methods suggest that the attachment, the ingestion time and in general the entire phagocytic process of *H. capsulatum*, develops a different kinetic than the microorganism used as control.

RESUMEN

Considerando que el papel del macrófago es fundamental en la evolución de la infección histoplasmosa, se estudió *in vitro* el binomio macrófago-hongo a nivel de microscopía óptica y por métodos histoquímicos. Se utilizó el isotiocianato de fluoresceína y se hicieron observaciones en microscopía electrónica. Se determinó la dosis óptima de resolución de la infección por los macrófagos (5×10^5 levaduras/ 10^6 macrófago), con la

* Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M. 04510 México, D. F.

** Departamento de Histología y Unidad de Microscopía Electrónica, Facultad de Medicina, U.N.A.M. 04510 México, D. F.

cual se realizó una cinética de tiempo de fagocitosis para determinar la resolución de la infección en los distintos períodos de tiempo. Los datos obtenidos con los métodos empleados, sugieren que la adhesión, el tiempo de ingestión y en general todo el proceso fagocítico de *H. capsulatum* desarrolla una cinética diferente a la del control utilizado.

INTRODUCCION

La histoplasmosis constituye uno de los más interesantes prototipos de infección intracelular, en donde el parásito-hongo tiene predilección por las células del sistema retículo endotelial. El agente etiológico de la histoplasmosis, *Histoplasma capsulatum*, es un hongo dimórfico que crece en la naturaleza en forma micelial, el cual presenta dos tipos de esporas esféricas: las macroconidias equinuladas (8-14 μm de diámetro), y las microconidias (2-4 μm de diámetro). Estas conidias constituyen la forma infectante, que al penetrar por vía respiratoria, producen la infección en un huésped susceptible. El hongo crece abundantemente en suelos ricos en nitrógeno y fósforo, proporcionados por el guano de murciélago o excretas de aves, encontrándose principalmente en casas, gallineros y minas abandonadas. (Rippon 1974, Emmons *et al.*, 1977).

Los cambios morfológicos que sufre el hongo en el huésped, al inicio de la infección, son desconocidos; al parecer este hongo se transforma en levadura en los macrófagos alveolares (Kimberlin *et al.*, 1981). Sin embargo, poco se conoce del momento y del sitio en que esta transformación ocurre.

Con frecuencia, la infección cura espontáneamente; los casos en los cuales la infección progresa sugieren que la sobrevida y multiplicación del *Histoplasma* en los macrófagos es un factor importante en el desarrollo del cuadro infeccioso.

Parece ser que los mecanismos del huésped para destruir al hongo presentan alguna alteración, sea porque existan fallas propias del fagocito o en otras ramas de la respuesta inmune, o bien, porque la relación entre el huésped y el parásito produzca un balance favorable al parásito en el momento en que ocurre la infección (dosis elevada del parásito, inmunosupresión ocasional o no del huésped, etc.) (Taylor *et al.*, 1984). Por consiguiente, la sobrevida y multiplicación del hongo dentro del fagocito por largo tiempo, constituye, sin duda alguna, una prueba de estas alteraciones.

Los estudios sobre el fenómeno fagocítico en la histoplasmosis son escasos. Uno de los eventos más conocidos relacionado con la fagocitosis de *Histoplasma*, es la participación de células T inmunes en la activación de macrófagos que favorece el proceso de eliminación del hongo (Howard, 1975; Howard y Otto, 1977; Wu-Hsieh y Howard, 1984). Por otro lado, se han identificado mecanismos fungicidas capaces de destruir al hongo, tanto en macrófagos como en polimorfonucleares (Howard y Dabrowa, 1982). Además, se ha estudiado la influencia de la pared celular del hongo en el fenómeno fagocítico (Sánchez y Carbonell, 1975), así como también se ha detectado que el hongo es capaz de activar la vía alterna del complemento, posiblemente facilitando el evento

fagocítico (Ratnoff *et al.*, 1980). El incremento de la ingestión del hongo por el macrófago del huésped, pero no su destrucción intracelular (digestión) en presencia de anticuerpos específicos ha sido estudiada por Sánchez y Carbonell (1975). Sin embargo, estos conocimientos no explican los casos especiales donde el hongo vence al sistema de defensa fagocitario. En tal situación, dos grandes incógnitas permanecen sin explicación en la relación huésped-parásito establecida en la enfermedad histoplasmosa: ¿cómo agrede el hongo al fagocito? y ¿cómo escapa el hongo a la muerte intramacrofágica?. Puesto que no se ha identificado ningún producto del hongo con actividad sobre el fagocito y siendo la fagocitosis la vía final de eliminación del parásito, es de fundamental importancia entender los eventos que ocurren entre el huésped y el parásito durante este fenómeno.

Este fenómeno no es aislado y depende directamente del funcionamiento óptimo e integral de la respuesta inmune. Tomando en consideración lo anterior, se presenta el estudio *in vitro* de la fagocitosis de *Histoplasma* en el modelo murino, a través de la relación que se establece entre el macrófago y el hongo. Por el momento, el trabajo se orientó hacia el estudio de la evolución de la infección en el tiempo, buscando poner en evidencia los cambios que ocurren en el parásito y en el huésped, dados por la relación establecida entre ambos. La dinámica y las diferentes etapas del proceso fagocítico en el tiempo, se estudiaron por observaciones en microscopía común, en microscopía electrónica y a través del marcado del hongo con un compuesto fluorescente (isotiocianato de fluoresceína).

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos: Se utilizó la cepa 5037 de *Histoplasma capsulatum*, mantenida en fase levaduriforme a 37°C, con agitación constante (150 rpm) en medio BHI (infusión de cerebro-corazón) (Bioxon), suplementado con glucosa (Merck) al 1%, L-cisteína monohidratada (Merck) al 0.1% y gentamicina (Lab. Scheramex) 25 µg/ml. Como testigo de infección relacionada se utilizó la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v.

Animales: Se emplearon ratones hembras normales, de 6 meses de edad, de la cepa singénica BALB/c mantenida con purina y agua acidulada (Purina de México) *ad libitum*, en la estación de animales del Departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina, U.N.A.M.

Obtención de Macrófagos. Los macrófagos se obtuvieron por lavado peritoneal de las hembras normales, BALB/c. Los animales fueron sacrificados por descerebración y fijados en un soporte en posición dorsal, de manera que la parte podálica quedara frente al operador. Previa asepsia de la región abdominal, se expuso la cavidad peritoneal y con una jeringa hipodérmica de 10 ml, se hicieron varios lavados con solución balanceada de sales (SBS) adicionada de gentamicina (25 µg/ml), a pH 7.0. Las células obtenidas se centrifugaron y se incubaron durante 10 minutos con TRIS-cloruro de amonio al 0.85% a 37°C y posteriormente se lavaron 2 veces con SBS. Finalmente se contaron

en cámara de Neubauer, utilizando la técnica de exclusión de azul de tripano y se resuspendieron en medio RPMI-1640 (Gibco) en amortiguador HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N-2 ácido etanolsulfónico) (Gibco), suplementado con piruvato y glutamina (Gibco) y 20% de suero fetal de ternera (Difco) descomplementarizado a pH 7.0. Las células se ajustaron a una concentración de 1×10^6 células/ml. Todo el procedimiento se realizó en estrictas condiciones de esterilidad, a 4°C.

Preparación del Inóculo. Las levaduras mantenida en el medio de cultivo, se lavaron de cinco a seis veces con solución salina estéril, se contaron en la región W de la cámara de Neubauer, de modo idéntico a la cuenta de células blancas. Los agregados de 5 células se tomaron arbitrariamente como una sola célula. Se ajustaron a una concentración de 2×10^7 levaduras/ml en SBS con gentamicina.

Cinética de Infección por Dosis. En tubos de vidrio de fondo plano de 7 cm de altura x 1 cm de diámetro, que contenían en el fondo, una lenteja de vidrio de aproximadamente 0.8 cm de diámetro por 0.2 mm de espesor, se colocó 1 ml de la suspensión de macrófagos. Se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO² durante 3 hrs, luego se lavaron 3 veces en SBS y se procedió a la infección. Esta se hizo diluyendo las levaduras ajustadas a 2×10^7 /ml para obtener las diferentes dosis, cada una en un volúmen de 20 µl, conteniendo 3.5×10^4 , 7×10^4 , 1×10^5 , 1.35×10^5 , 1.7×10^5 , 2×10^5 , 2.4×10^5 , 3.2×10^5 , 4×10^5 y 5×10^5 células. Se distribuyeron las distintas dosis en cada tubo con cultivo de macrófago y se incubaron nuevamente durante 3 horas. Se lavaron 3 veces con SBS y se tiñeron con la técnica de Giemsa. Como controles se utilizaron tubos con macrófagos no infectados y tubos con macrófagos conteniendo 1×10^7 eritrocitos de carnero estériles, suspendidos y cuantificados en SBS. Todos los experimentos se hicieron por duplicado.

Cinética de Infección por Tiempo. Se siguió el mismo procedimiento que en la cinética de infección por dosis, utilizando también tubos por duplicado, los cuales después de la incubación de 3 hrs a 37°C en estufa al 5% de CO², se lavaron y se infectaron con 5×10^5 levaduras, incubando nuevamente. El primer par de tubos, a los 3 minutos de incubación, se lavó inmediatamente, el segundo a los 5 minutos y así sucesivamente a los 10 min, 30 min y 3, 12, 24 y 48 horas, procediendo después de los lavados a teñirlos con la técnica de Giemsa. Para los controles se procedió de un modo idéntico que los de la cinética de dosis, únicamente procesando un par de controles por cada tiempo de incubación estudiado.

Determinación de la Cinética de Infección por Microscopía Electrónica. En 10 tubos de vidrio de fondo plano (7 cm de altura y 1 cm de diámetro) que contenían en el fondo un disco de filtro Millipore con poro de $0.45 \mu\text{m}$, de 0.8 cm de diámetro, se colocó 1 ml de la suspensión de macrófagos obtenidos por la técnica descrita previamente. Se incubaron a 37°C en estufa de CO² al 5% durante 24 hrs. Luego se lavaron 3 veces con SBS y se procedió a la infección continua con 5×10^5 levaduras, incubándose a diferentes tiempos tal y como está descrito en la cinética de tiempo. Después de la incubación se

lavaron varias veces con SBS y se les agregó buffer de fosfatos pH 7.2, tres veces cada 10 minutos y se fijaron con glutaraldehído al 70% durante 30 minutos. Se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio durante 2 horas. La deshidratación se hizo con alcohol etílico de 60%, 70%, 80% y 90% durante 10 minutos cada uno; posteriormente con alcohol absoluto haciendo dos cambios de 20 minutos. Finalmente, la infiltración se llevó a cabo en Epón al 25%, 50% y 75% (diluido con alcohol absoluto) durante 24 horas cada cambio y luego se colocaron las muestras en Epón al 100% durante 2 horas. Por último, las muestras se desecaron y posteriormente se extrajo el Epón. Se colocaron en un porta-objetos y se procedió a tomar muestras (0.3 x 0.2 cm aproximadamente). Se colocaron en moldes, se agregó Epón al 100% y se polimerizó en estufa a 60°C durante 1 hora. Se hicieron cortes finos en el ultramicrotomo, se tiñeron con azul de toluidina y se observaron al microscopio óptico. Al localizar el material deseado, se hicieron cortes finos, se colocaron en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo durante 30 minutos y posteriormente con citrato de plomo 15 minutos. Se observó en microscopio de transmisión modelo Zeiss EM9-C2. Simultáneamente se trabajó con controles normales de macrófagos sin infectar.

Determinación de la Cinética de Infección por Microscopía de Fluorescencia. El marcado del microorganismo se hizo con isotiocianato de fluoresceína (ITF), en una relación de 50 μ l de ITF en dimetil sulfoxido por ml del paquete de microorganismo contenido en RPMI. Se incubó durante 2 hrs en agitación a temperatura de 4°C y a un pH 9.0. Se infectaron los macrófagos cultivados en lentes de vidrio (1 x 10⁶ células) a los 5, 15 y 30 minutos, 1, 24 y 48 hrs, con las células de microorganismos marcados con ITF, a una dosis de 5 x 10⁶ levaduras/ml de *H. capsulatum* y 5 x 10⁶ células/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (H37 Rv), usada como control de infección relacionada. Simultáneamente se procesaron controles de macrófagos sin infectar. La observación final se hizo por montaje de las lentes de vidrio con resina o con barniz de uñas y observación en microscopio de epifluorescencia.

RESULTADOS

Cinética de Infección por Dosis. A las dosis más bajas, de 3.5 x 10⁴ a 1.35 x 10⁵ fueron escasos los campos en los que se observaron levaduras. Los macrófagos presentaron un aspecto comparable al de los controles, por lo que se descartaron estas dosis en los experimentos posteriores. A las siguientes dosis: 1.7 x 10⁵ a 3.2 x 10⁵, ya fue posible observar un número cuantificable de levaduras posiblemente adheridas o en el interior de los macrófagos; éstos se observaron ligeramente vacuolizados. Sin embargo, a estas dosis todavía se encontraron campos desprovistos de levaduras.

A las dosis mayores de 4 x 10⁵ a 5 x 10⁵ fue posible observar, en forma abundante, al hongo en todos los campos. Los macrófagos se encontraron altamente vacuolizados. Por lo general, con la microscopía óptica fue difícil diferenciar levaduras adheridas de las fagocitadas (Fig. 1).

Cinética de Infección por Tiempo. En los primeros tiempos de infección (5 minutos

hasta 3 hrs) se encontraron abundantes levaduras adheridas a los macrófagos, al igual que en los espacios intermacrofágicos, las cuales desaparecieron a las 24 y 48 hrs de infección. Asimismo, en los primeros tiempos de infección se observó menor vacuolización que a las 24 y 48 hrs, en que los macrófagos estaban altamente vacuolizados (Tabla 1). El número de levaduras fagocitadas pareció ser igual en los diferentes tiempos estudiados según el índice fagocítico determinado para cada tiempo (Tabla 1). En los tiempos iniciales, las levaduras se observaron con mucha frecuencia en las células fagocíticas, mientras que en los tiempos finales, al parecer, se perdió la integridad de las células levaduriformes.

Determinación de la Cinética de Infección por Microscopía Electrónica. La cinética de infección *in vitro* con *Histoplasma capsulatum*, en macrófagos peritoneales de ratones normales a diferentes tiempos de exposición al hongo, nos indicó que a los 5 minutos de infección no hubo evidencias de gran cantidad del microorganismo dentro del macrófago, pero sí actividad de membrana dada por la formación de pseudópodos, siendo que algunas imágenes sugirieron que los pseudópodos se proyectaban hacia algunas partículas envolviéndolas y es posible, que debido al procesamiento del material éstas se desprendieran (Fig. 2). A las 3 hrs ya se encontró el hongo en el interior del macrófago (Fig. 3). La presencia de levaduras íntegras en el interior del macrófago, fue más frecuente en los primeros tiempos de infección e incluso a las 3 hrs, a partir de las cuales se incrementó el número de células levaduriformes en diferentes etapas de digestión. En algunos campos se observaron linfocitos adheridos a la superficie del macrófago y evidencias de su destrucción. En la Fig. 4 se muestra un macrófago con gran actividad metabólica y restos de una posible célula linfocítica.

A las 24 hrs se encontró gran cantidad de hongo, tanto íntegro como semidestruido, en el interior de fagosomas, observándose además muchos *destritus* celulares. Asimismo, el número de vacuolas fagocíticas fue mayor en estos tiempos finales. Por otra parte, existió una aparente disminución de ingestión, que se manifestó por la escasez de pseudópodos (Fig. 5). La actividad celular en los tiempos finales se caracterizó por la presencia de poros nucleares, nucleolos, heterocromatina escasa y abundante eucromatina (Fig. 5). Una observación importante que llama la atención en esta serie de experimentos, es el gran número de mitocondrias en los tiempos iniciales en relación a los finales.

Determinación de la Cinética de Infección por Microscopía de Fluorescencia. En los diferentes tiempos experimentados, se observó mayor marca fluorescente en los macrófagos infectados con *H. capsulatum* que en los macrófagos con *M. tuberculosis* (Fig. 6). Asimismo, la marca de fluorescencia de *M. tuberculosis* se perdió rápidamente (Fig. 6). En los tiempos mas largos de infección, la marca fluorescente tendió a desaparecer aunque persistió con mayor frecuencia en los macrófagos infectados con *H. capsulatum*.

DISCUSION

La adherencia del hongo a la célula fagocítica se realiza posiblemente desde los

Tabla 1

Comportamiento a diferentes tiempos de la infección *in vitro* de macrófagos con *Histoplasma capsulatum*

| CARACTERISTICAS OBSERVADAS | TIEMPOS DE INFECCION | | | | | | |
|--|--------------------------------|---------|------|---------|---------|---------|---------|
| | 5 min | 30 min | 1 hr | 2 hrs | 3 hrs | 24 hrs | 48 hrs |
| Presencia de fagocitosis | + | + | + | + | + | + | + |
| Macrófagos íntegros | + | + | + | + | + | ++ | ++ |
| Presencia de vacuolas cito- plásmicas | - | - | ± | + | ++ | +++ | +++ |
| Índice fagocítico* | NR** | 340/100 | NR | 315/100 | 258/100 | 250/100 | 265/100 |
| Espacio intermacrofágico | presencia de lava- duras | 340/100 | NR | 315/100 | 258/100 | limpio | limpio |
| Levadura adherida macrófago | +++ | - | - | - | - | - | - |
| Levadura dentro macrófago | + | + | + | + | + | +++ | ++++ |

* Fue calculado con el número total de levaduras presentes en una población de 100 macrófagos.

** No realizado

tiempos iniciales de infección, según las observaciones al microscopio óptico. Los resultados en microscopía electrónica indican que en los primeros tiempos hay gran cantidad de pseudópodos en los macrófagos infectados (Fig. 2), en comparación con los no infectados, lo cual sugiere contacto del macrófago con la levadura (posible adhesión), sin embargo, en estos mismos tiempos iniciales no hay evidencias de que el hongo se encuentre en el interior de los fagocitos. La presencia de vacuolas en los macrófagos infectados con diferentes dosis del hongo, así como en los tiempos largos de la infección, registrados en microscopía común, sugiere que los macrófagos se encuentran en gran actividad, sobre todo a la dosis máxima de infección 5×10^5 levaduras. Esto hace pensar que esta dosis no es masiva y que no impide la función fungicida de los macrófagos. Las imágenes de los tiempos largos de infección, sugieren la presencia del hongo en diferentes etapas de procesamiento, incluso se pudieron observar lavaduras aparentemente intactas.

En microscopía óptica es difícil diferenciar las levaduras fagocitadas de las adheridas. Hay imágenes que sugieren que existe ingestión temprana, sin embargo, esto se observó con mayor nitidez a partir de los 30 minutos de infección. Por otro lado, tanto por microscopía óptica como por microscopía electrónica (Fig. 3) se observa que existen muy pocos hongos dentro del macrófago, aún a las 3 horas de infección. Estos hechos hacen considerar que el proceso de fagocitosis del *Histoplasma* es lento.

El estudio de la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón con *Histoplasma capsulatum* en microscopía electrónica, sugiere que el fenómeno fagocítico para *Histoplasma* se procesa en tiempos diferentes a lo esperado para otros microorganismos intracelulares (*M. tuberculosis*, por ejemplo). Además, se ha visto que durante los tiempos de infección más largos, 3-24 horas, existe gran actividad metabólica de la célula fagocítica y parásitos en diferentes etapas de digestión. En el proceso de eliminación del parásito hay imágenes que sugieren unión fagosoma-lisosoma (Fig. 5).

En algunos campos por microscopía electrónica se pudieron observar interacciones linfocito-macrófago con aparente daño del linfocito. Estas imágenes son poco frecuentes en los controles sin infección, lo que sugiere un posible efecto citotóxico, mediado por el proceso infeccioso, de los macrófagos sobre otras células. El marcado con isotiocianato de fluoresceína del hongo y *Mycobacterium* (utilizado como cepa de referencia), mostró la presencia de *Histoplasma* en los diferentes tiempos de infección, mientras que *Mycobacterium* se encontró escasamente (Fig. 6).

De acuerdo a los datos anteriores, se considera que *H. capsulatum* y *M. tuberculosis* presentan diferencias durante el desarrollo del fenómeno fagocítico, debido probablemente a que exista un proceso de facilitación marcada para *H. capsulatum* en su entrada al macrófago, mientras que en *M. tuberculosis* tal mecanismo sea menos notorio, lo cual implicaría asumir que *M. tuberculosis* casi no es fagocitado, o bien que comparado con *H. capsulatum*, *M. tuberculosis* a la misma dosis entre más tempranamente y es rápidamente degradado, de ahí que no se detecte su presencia (apagamiento de la fluores-

cencia), lo que podría sugerir que el apagamiento de este microorganismo se deba a su constante y rápida entrada al macrófago.

Los resultados preliminares de este estudio apoyan la idea de diferencias en el evento fagocítico entre los microorganismos intracelulares estudiados. Actualmente el trabajo está dirigido a detectar los cambios en la relación macrófago-hongo en una infección sincronizada, manejando cepas del hongo de diferente virulencia y dosis mas críticas para la resolución del proceso infeccioso.

LITERATURA CITADA

- Emmons, C. W., H. Chester, Ch. P. Binford y K. J. Kwon-Chung, 1977. **Medical Mycology**. Lea & Febiger, Filadelfia.
- Howard, D. H., 1975. The role of phagocytic mechanisms in defense against **Histoplasma capsulatum**. In: Mycosis, Scientific Publication No. 304, Pan American Health Organization, Washington D. C. pp. 50-59.
- Howard, D. H. y V. Otto, 1977. Experiments on lymphocyte mediated cellular immunity in murine histoplasmosis. **Infect. Immun.** **16**: 226-231.
- Howard, D. H. y N. Dabrowa, 1982. Antifungal systems derived from phagocytic cells. In: Baxter, M. (Ed.), Proceedings VIII Congress International Society for Human and Animal Mycology. Massey University, Palmerston North (Nueva Zelandia) pp. 82-87.
- Kimberlin, C. L., A. R. Hariri., H. O. Hempel y N. L. Goodman, 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.
- Ratonoff, W. D., J. M. Pepple y J. A. Winkelstein, 1980. Activation of the alternative complement pathway by **Histoplasma capsulatum**. **Infect. Immun.** **30**: 147-149.
- Rippon, J. W. 1974. Histoplasmosis. **Medical mycology**. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. W. S. Saunders, Filadelfia, pp. 321-347.
- Sánchez, S. B. D. y L. M. Carbonell, 1975. Immunological studies on **Histoplasma capsulatum**. **Infect. Immun.** **11**: 387-394.
- Taylor, M. L., S. Díaz, P. A. González, C. A. Sosa y C. Toriello, 1984. Relationship between pathogenesis and immune regulation mechanism in histoplasmosis: A hypothetical approach. **Rev. Infect. Dis.** **6**: (en prensa).
- Wu-Hsieh, B. y D. H. Howard, 1984. Inhibition of growth of **Histoplasma capsulatum** by lymphokine-stimulated macrophages. **J. Immunol.** **132**: 2593-2597.



Fig. 1 Macrófagos infectados con levaduras de *H. capsulatum*. Se trabajó con 1×10^6 macrófagos y 5×10^5 levaduras. Postinfección las células fueron teñidas con Giemsa. Se observa la típica imagen de la falsa cápsula del hongo. Lev = levadura. N = núcleo.

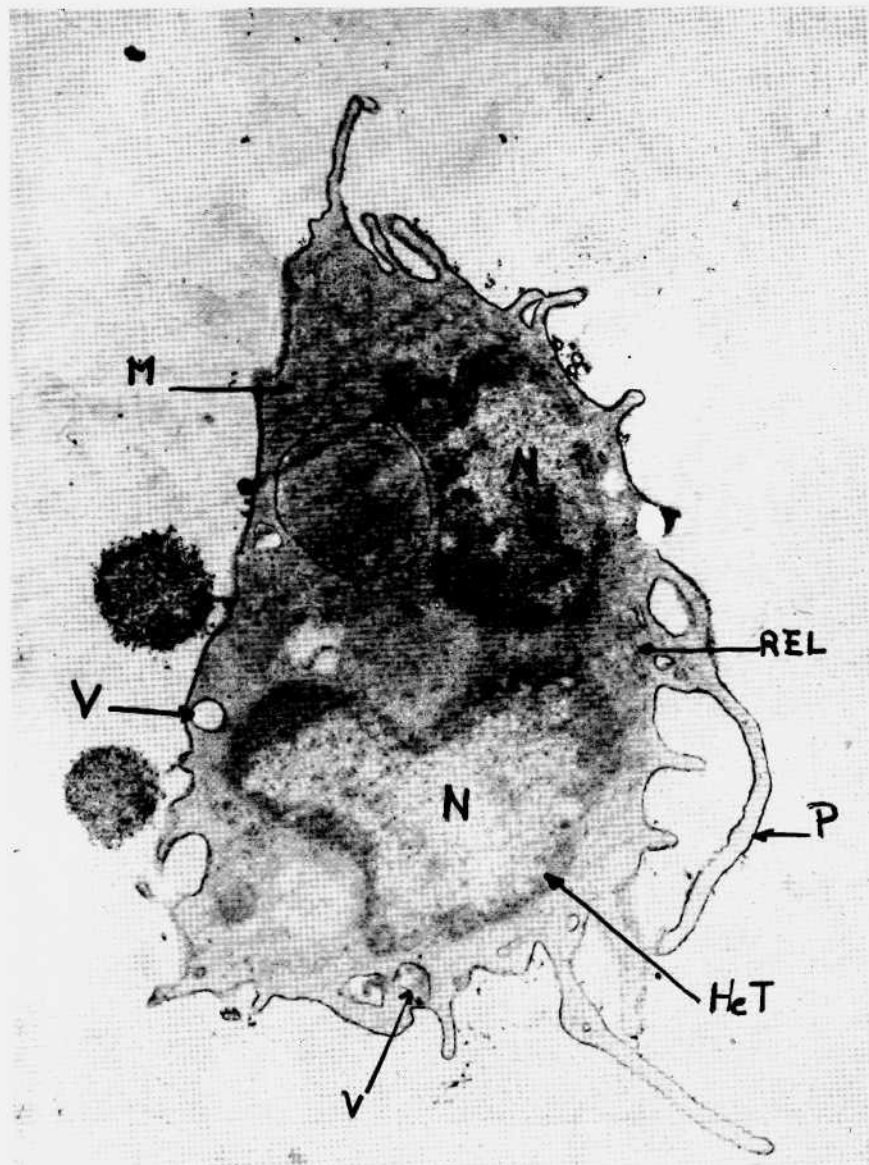


Fig. 2 Micrografía electrónica (4500X). Macrófagos infectados con *H. capsulatum* a los 5 minutos de infección. N = núcleo, M = mitocondria, REL = retículo endoplásmico liso, V = vacuola, P = pseudópodo, Het = heterocromatina.

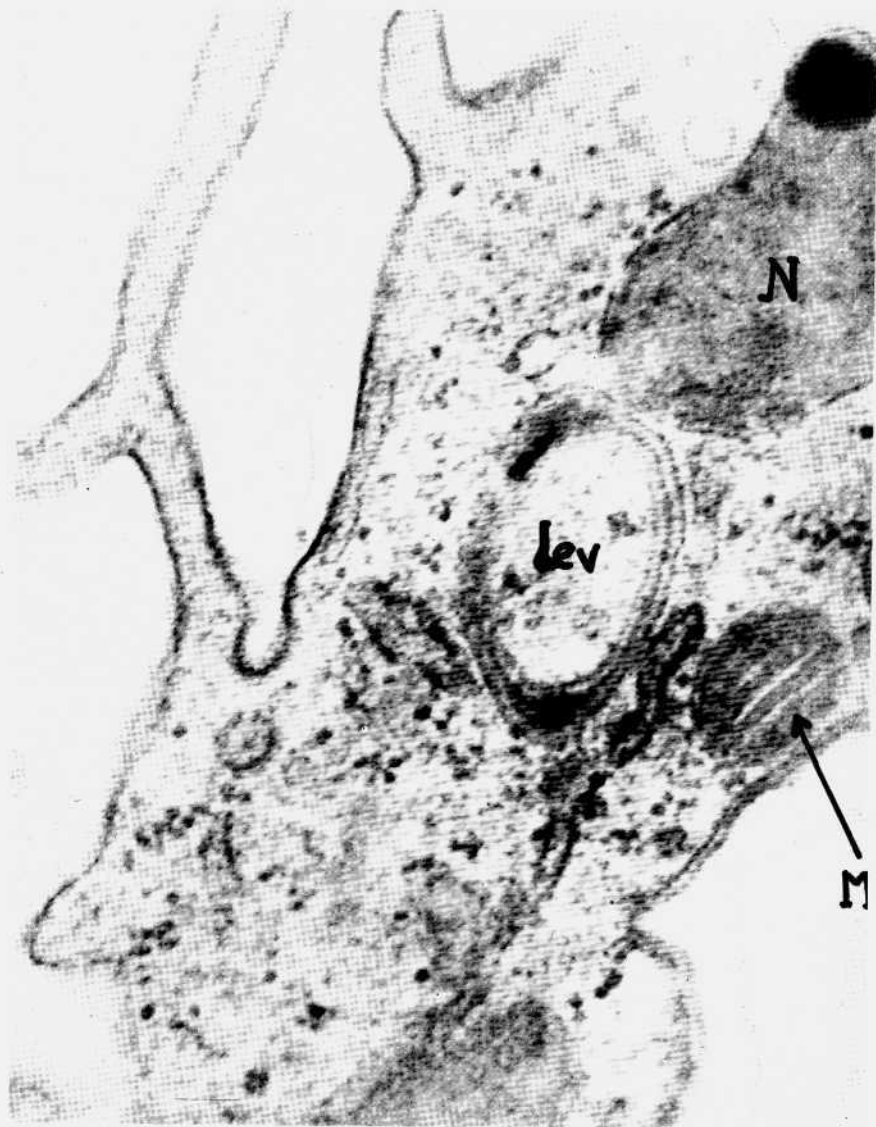


Fig. 3 Micrografía electrónica (9000X). Macrófago a las 3 horas de infección, con una levadura en su interior. N = núcleo, M = mitocondria, Lev = levaduras.

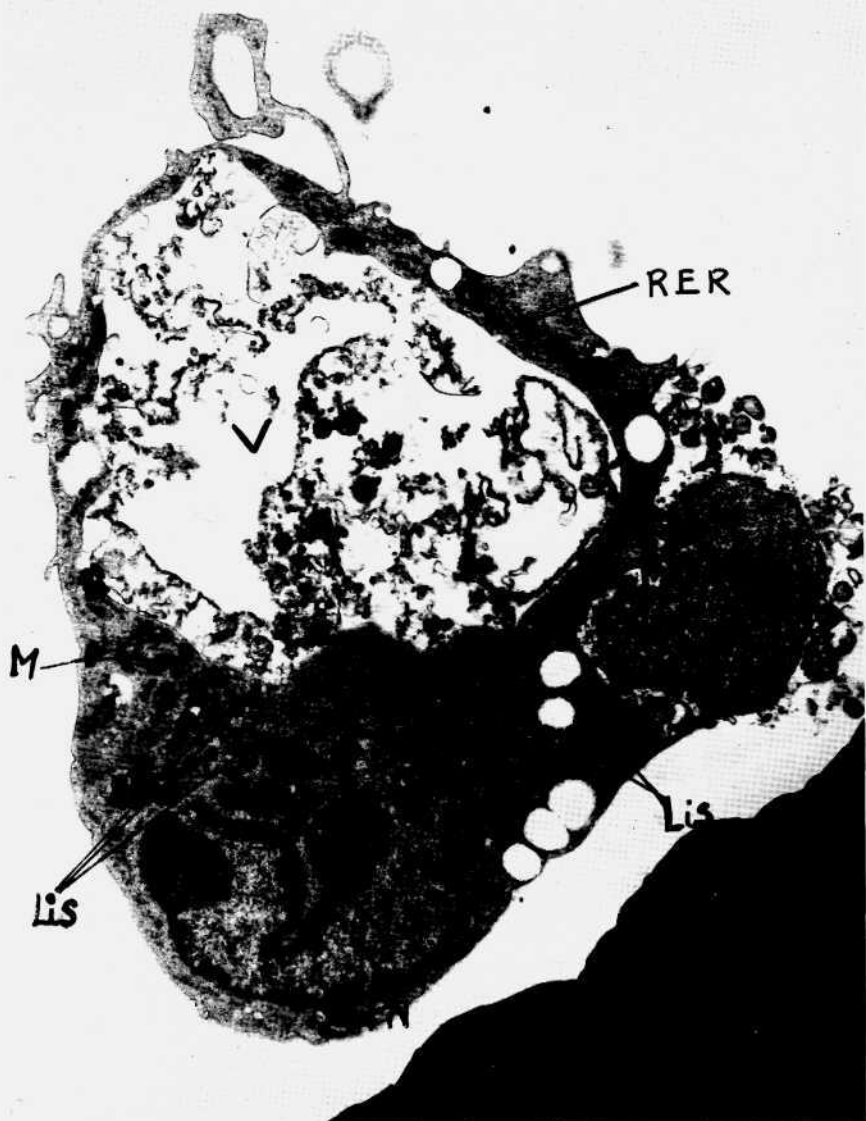


Fig. 4 Micrografía electrónica (4500X). Macrófago a las 24 horas de infección, mostrando una gran vacuola con abundante *debris* celular y probable destrucción de un linfocito. V = vacuola, RER = retículo endoplásmico rugoso, M = mitocondria, Lis = lisosomas, Lin = linfocito, N = núcleo, PN = poro nuclear.

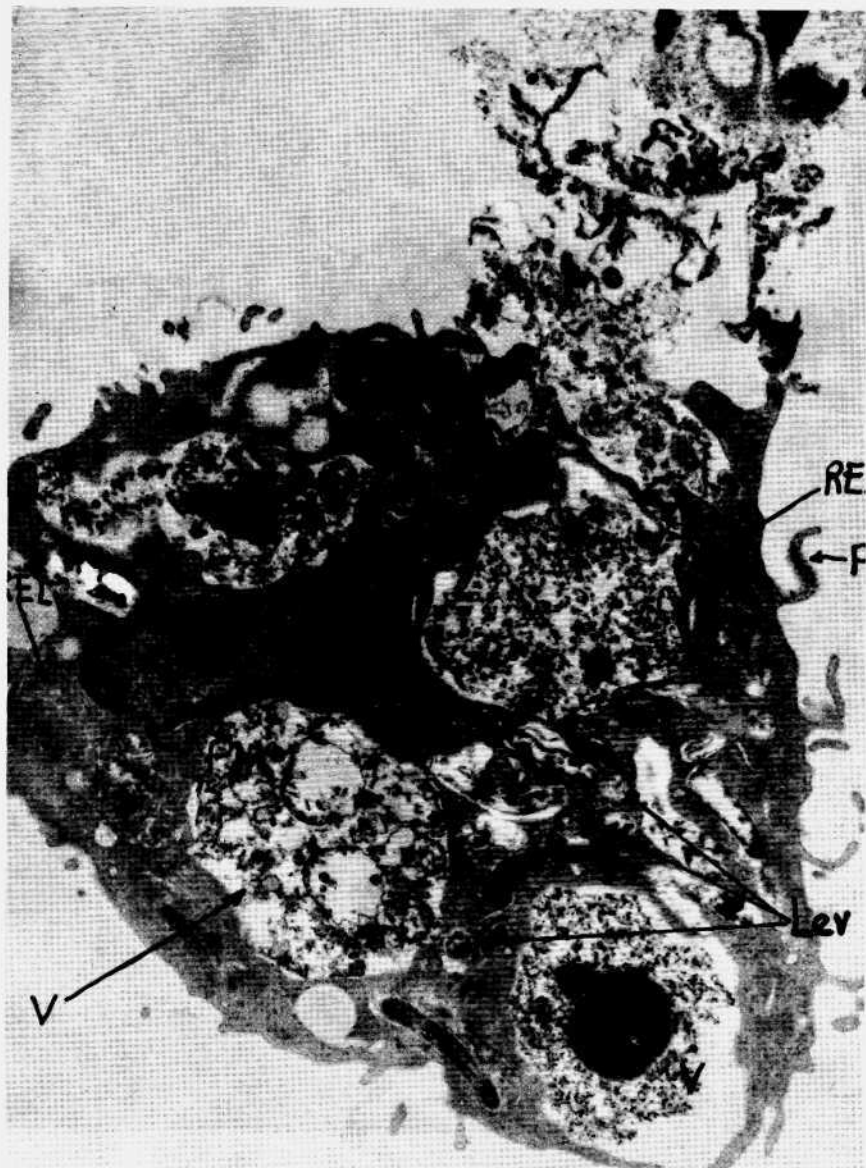


Fig. 5 Micrografía electrónica (4500X). Macrófago a las 24 horas de infección mostrando diferentes grados de digestión del hongo. RER = retículo endoplásmico rugoso, P = pseudópodo, N = núcleo, Nu = nucleolo, PN = poro nuclear, V = vacuola, Lev = levaduras.

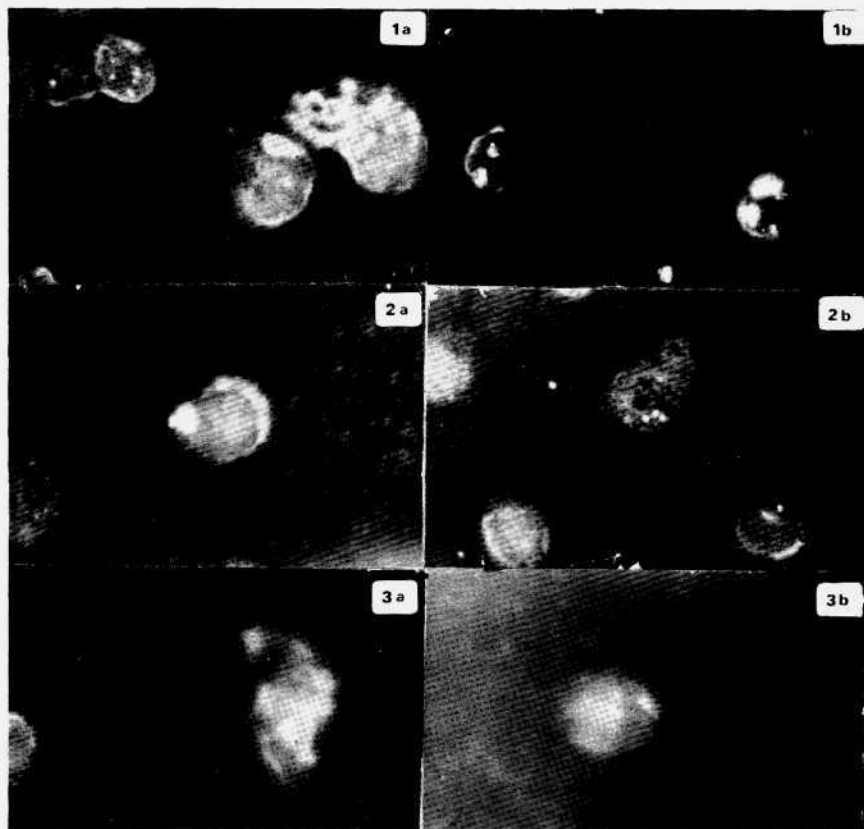


Fig. 6 Micrografías ópticas de *H. capsulatum* y *M. tuberculosis* marcados con isotiocianato de fluoresceína, a diferentes tiempos de infección: 1) 0 minutos, 2) 5 minutos, 3) 15 minutos, a) *H. capsulatum* y b) *M. tuberculosis*.