ESTUDIO DEL RECEPTOR MANOSA/FUCOSA EN LA FAGOCITOSIS DE LEVADURAS DE *Histoplasma capsulatum*

por María Elena Jerez* y
Maria Lucia Taylor*

STUDY OF THE MANNOSE/FUCOSE RECEPTOR ON THE PHAGOCYTOSIS OF *Histoplasma capsulatum* YEASTS

SUMMARY

Information concerning the receptors participation in the phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* fungus is scarce. The present paper is focussed on the role of mannose/fucose murine macrophages receptors in the *H. capsulatum* yeast phagocytosis. Two types of assays were used, one blocking mannose/fucose receptors with ligands, such as D(+) mannose or methyl-α-D-mannopyranoside, and another by receptors overtaking a semi solid-phase of β 1 → 4-D-polymannuronic acid. The phagocytosis of *H. capsulatum*, in the presence of blocked ligands, showed a smaller percentage than controls (20.5%) and values of 11.5 and 7.5% were obtained by using D(+) mannose and methyl-α-D-mannopyranoside, respectively. Differences between controls and both ligands values were significant ($p<0.005$). Results with *Candida albicans*, used as a reference microorganism, showed a 23% of phagocytosis with D(+) mannose and 31% with methyl-α-D-mannopyranoside, whereas 38% with controls. The receptors overtaking assays showed a difference ($p<0.02$) between the phagocytosis of *H. capsulatum* controls (40.5%) and those obtained in the presence of β 1 → 4-D-polymannuronic acid (29.5%), whereas no difference was obtained when *C. albicans* was used. Generally, *C. albicans* developed a higher percentage of phagocytosis than *H. capsulatum*. The phagocytosis index for both microorganisms was similar in the two types of assays used, and most macrophages phagocytized 1 to 2 yeasts, followed by 3 to 6, and very few macrophages phagocytized more than 6.

RESUMEN

Existe poca información sobre la participación de receptores en la fagocitosis del hongo *Histoplasma capsulatum*. El presente trabajo está orientado a valorar el papel de los receptores de manosa/fucosa de macrófagos murinos en la fagocitosis de levaduras de *H. capsulatum*, utilizando para esto dos tipos de ensayos: uno por bloqueo de receptores con ligandos competidores D(+) manosa o metil-α-D-manopiranosa, y el otro por atrapamiento de receptores en un gel de ácido β 1 → 4-D-polimanurónico. La fagocitosis de *H. capsulatum* en presencia de los competidores mostró menor porcentaje que el testigo sin competidor (20.5%), siendo los resultados de 11.5 y 7.5% con D(+) manosa y metil-α-D-manopiranosa, respectivamente. Se encontró una diferencia significativa ($p<0.005$) entre el testigo y los valores para cada ligando. Los datos para el hongo *Candida albicans*, utilizado como microorganismo de referencia, mostraron un 23% de fagocitosis con D(+) manosa y 31% con el metil

*Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 04510.

α-D-manopiranosa, así como el 38% para el testigo de fagocitosis. Los ensayos de atrapamiento de receptores mostraron una diferencia ($p<0.02$) entre el testigo de la fagocitosis de H. capsulatum (40.5%) y la fagocitosis obtenida en presencia del ácido β1 → 4-D-polimanurónico (29.5%), mientras que no se obtuvo diferencia en la fagocitosis de C. albicans. De modo general, C. albicans presentó un porcentaje de fagocitosis más elevado que H. capsulatum. Los índices fagocíticos para ambos microorganismos en los dos tipos de experimentos fueron similares, observándose que la mayoría de los macrófagos fagocitaron de 1 a 2 levaduras, en menor proporción de 3 a 6 y escasamente más de 6.

INTRODUCCIÓN

La histoplasmosis americana se considera un padecimiento de origen fúngico de alto riesgo en México, sobre todo en individuos susceptibles que, por razones de trabajo en recintos cerrados, se ven expuestos al agente productor de esta enfermedad, el cual se encuentra en nuestro país preferentemente en cuevas o minas abandonadas donde se conforma su nicho ecológico (Velasco-Castrejón y Fujigaki, 1984). Su etiología se debe a un hongo dimórfico, Histoplasma capsulatum Darling 1906, que se encuentra en la naturaleza en forma micelial, presentando esporas y pequeños fragmentos de hifas que, al ser dispersadas e inhaladas, se instalan en el tejido pulmonar del huésped, donde prevalecen las condiciones adecuadas para convertirse a la forma parasitaria de levadura, la cual es facultativamente intracelular (Rippon, 1988).

El destino del hongo, una vez fagocitado, es el hecho más importante para definir el curso de la infección, razón por la cual el conocimiento profundo de la interacción célula huésped/parásito es de primordial interés.

El proceso fagocítico comprende una cascada de eventos que se disparan a partir de un contacto primario entre el fagocito y la partícula fagocitable, en este caso el hongo parásito. Se ha sugerido que la etapa inicial de esta interacción huésped/parásito se lleva a cabo mediante un mecanismo de reconocimiento, en el que están involucrados componentes propios de la superficie del parásito, que funcionan como ligandos, y un receptor localizado en la superficie de la membrana plasmática de la célula fagocítica (Griffin et al., 1975). La unión ligando-receptor no sólo es crítica para la adherencia de la partícula al fagocito, sino también es esencial para el disparo del estallido oxidativo del fagocito, que constituye uno de los mecanismos de destrucción del parásito.

Hasta hoy es muy poca la información existente respecto a la interacción del hongo con receptores de macrófagos. Bullock y Wright (1987) observaron que el contacto inicial de reconocimiento y adherencia de levaduras de H. capsulatum, a macrófagos derivados de monocitos humanos, era mediado por una familia de receptores CR3, LFA-1 y p 150,95. Cada uno de estos receptores fue capaz de actuar aisladamente y mediar la unión de la levadura con el macrófago. Esta unión fue además dependiente de la temperatura y de Ca++ y Mg++.

Wolf et al. (1987), al investigar la interacción de levaduras intracelulares de H. capsulatum y el estallido oxidativo de macrófagos peritoneales murinos, plantearon que la sobrevida de levaduras dentro del fagocito se debía a que el hongo inhibía la producción de metabolitos reactivos del oxígeno. Sin embargo, la opsoni-

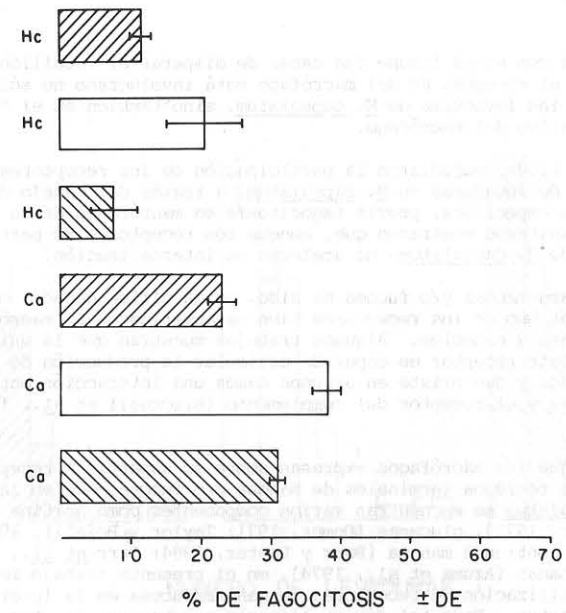

Fig. 1. Porcentaje de fagocitosis de levaduras de H. capsulatum o C. albicans con competencia de ligandos. Se aplicaron 300 µl de una solución de D(+) manosa o metil-α-D-manopiranosa (1 mg/ml) sobre una monocapa de macrófagos, durante 30 min a 4°C previa infección con levaduras de H. capsulatum (H c) o de C. albicans (C a) en una relación levaduras/macrófago de 5:1. Se sincronizó la adherencia del inóculo a 4°C 1 h y se disparó la fagocitosis a 37°C 1 h (ver detalles en Materiales y Métodos). La determinación de la fagocitosis se realizó en una población de 200 macrófagos por preparación. Se efectuaron 4 experimentos por cuadruplicado. Los resultados expresan la media ± desviación estándar. ▨ Macrófagos con D(+) manosa; ▧ macrófagos con metil-α-D-manopiranosa; □ macrófagos sin ligando competidor.

zación de levaduras con suero inmune fue capaz de disparar el estallido oxidativo, lo que sugiere que el receptor Fc del macrófago está involucrado no sólo en la internalización de las levaduras de H. capsulatum, sino también en el disparo del mecanismo oxidativo del macrófago.

Taylor et al. (1988) estudiaron la participación de los receptores Fc en la internalización de levaduras de H. capsulatum, a través del manejo de levaduras opsonizadas con IgG específica, previa fagocitosis en macrófagos de la línea celular J774.2. Sus resultados mostraron que, aunque los receptores Fc participan en la fagocitosis de H. capsulatum, no aceleran su internalización.

El receptor para manosa y/o fucosa ha sido, en la última década, objeto de extenso estudio y es uno de los receptores bien caracterizados en macrófagos de distintas ubicaciones y especies. Algunos trabajos muestran que la unión de ciertos parásitos con este receptor es capaz de estimular la producción de metabolitos reactivos de oxígeno, y que existe en algunos casos una interacción entre el receptor de manosa/fucosa y el receptor del complemento (Blackwell et al., 1985; Wilson y Pearson, 1988).

Considerando que los macrófagos expresan sobre su superficie receptores para glicoconjugados con residuos terminales de manosa y/o fucosa, que en la pared celular de H. capsulatum se encuentran varios componentes como quitina (Domer et al., 1967; Domer, 1971), glucanas (Domer, 1971; Taylor y Bojalil, 1977), glicoesfingolípidos que contienen manosa (Barr y Lester, 1984; Barr et al., 1984), así como galactomananas (Azuma et al., 1974), en el presente trabajo se plantea el estudio de la utilización de receptores de manosa/fucosa en la interacción macrófago/H. capsulatum. Para tal fin se llevaron a cabo experimentos dirigidos a la determinación de la fagocitosis del hongo en presencia de ligandos competidores o por atrapamiento de los receptores manosa/fucosa de los macrófagos en un gel semi-sólido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Se utilizaron ratones normales, machos, de la cepa singénica NIH, de aproximadamente 2 meses de edad, proporcionados por la Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología, Laboratorio Nacional de Salud Pública, México, D.F.

Microorganismos. Se trabajó con los hongos H. capsulatum EH46 y Candida albicans 47 U, pertenecientes al cepario del Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, UNAM. Ambas cepas se mantuvieron en fase levaduriforme a 37°C en medio de infusión de cerebro-corazón (Bioxón, México) debidamente suplementado con hidrocloruro de L-cisteína (1 g/l), glucosa (10 g/l) y gentamicina (Scheramex) (100µg/ml).

Reactivos, medios y soluciones. Todos los reactivos utilizados, salvo los que se especifican, procedieron de los laboratorios Merck de México, S.A.

Cultivo de macrófagos. Para obtener un mayor número de macrófagos, se inyectaron intraperitonealmente, a cada ratón, 2 ml de aceite mineral estéril. Los ratones

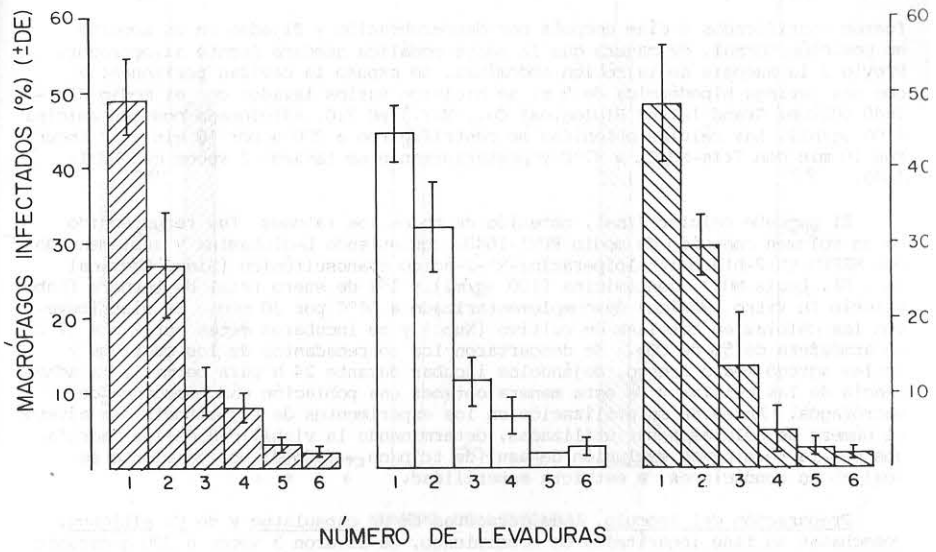

Fig. 2. Porcentaje del índice fagocítico de levaduras de H. capsulatum con competencia de ligandos. Los detalles de los experimentos son los mismos descritos en la figura 1. Para la determinación del porcentaje del índice fagocítico se consideró el número de levaduras por macrófago en una población de 200 macrófagos infectados por preparación. Se efectuaron 4 experimentos por cuadruplicado. Los resultados expresan la media ± desviación estándar. ▨ Macrófagos con D(+) manosa; ▨ macrófagos con metil-α-D-manopiranosa; ▭ macrófagos sin ligando competidor.

fueron sacrificados 4 días después por descerebración y fijados en un soporte en posición dorsal, de manera que la parte podálica quedara frente al operador. Previo a la asepsia de la región abdominal, se expuso la cavidad peritoneal y con una jeringa hipodérmica de 5 ml se hicieron varios lavados con el medio RPMI-1640 (Gibco, Grand Island Biological Co., N.Y.) pH 7.0, adicionado con gentamicina (100 µg/ml). Las células obtenidas se centrifugaron a 250 g por 10 min y se incubaron 10 min con Tris-NH_4Cl a 37°C y posteriormente se lavaron 2 veces con RPMI-1640.

El paquete celular final, obtenido de todos los ratones, fue resuspendido en un volumen conocido de medio RPMI-1640, conteniendo L-glutamina y suplementado con HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfónico (Sigma Chemical Co., St. Louis MO.), gentamicina (100 µg/ml) y 15% de suero fetal de ternera (Laboratorio In Vitro, México) descomplementarizado a 56°C por 30 min. Se distribuyeron las células en botellas de cultivo (Nunc) y se incubaron éstas por 2 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2. Se descartaron los sobrenadantes de los cultivos y se les agregó medio fresco, dejándolos incubar durante 24 h para permitir la adherencia de las células y de esta manera obtener una población más homogénea de macrófagos. Antes de su utilización en los experimentos de fagocitosis, se ajustó el número de células a ser utilizadas, determinando la viabilidad de los macrófagos por la técnica de exclusión de azul de tripano. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de estricta esterilidad.

Preparación del inóculo. Las levaduras de H. capsulatum y de C. albicans, cosechadas en fase logarítmica de crecimiento, se lavaron 3 veces a 300 g durante 20 min con un amortiguador salino de fosfatos (ASF) 0.03 M, pH 7.2. Las levaduras sedimentadas se resuspendieron en medio RPMI-1640 y fueron cuantificadas en la región W de la cámara de Neubauer. Se ajustó el inóculo a 5 levaduras por macrófago.

Experimentos de fagocitosis. A) Fagocitosis con competencia de ligandos. Se depositaron 50 µl de una población conocida de macrófagos en cada pozo de las cajas de cultivo (Nunc) de 24 pozos, los cuales contenían una lenteja de vidrio de 13 mm de diámetro en el fondo plano. Se añadió medio de cultivo RPMI-1640 para completar un volumen de 300 µl, el cual fue debidamente suplementado con suero fetal de ternera descomplementarizado. Se incubaron las cajas a 37°C en cámara húmeda y atmósfera de 5% de CO_2 durante 4 h para adherir la monocapa de macrófagos. Transcurrido este tiempo, se lavaron las cajas con el fin de eliminar la población de macrófagos no adherida y se adicionaron los ligandos competidores, D(+) manosa (1 mg/ml) y metil -α-D manopiranosa (1 mg/ml) (Sigma) en 300 µl de volumen final a cada pozo correspondiente. Se incubó a 4°C por 30 min con el objeto de inducir la unión de los competidores con los receptores de manosa/fucosa. Al mismo tiempo se procesó un testigo utilizando sólo el amortiguador de fosfatos. Se descartaron los sobrenadantes y se agregaron los inóculos de H. capsulatum y/o C. albicans. Se permitió la adherencia durante 1 h a 4°C con el propósito de uniformar los inóculos. Se lavaron los pozos para eliminar las levaduras no adheridas y se agregaron, a cada uno, 300 µl de medio de cultivo fresco con suero descomplementarizado. Se incubó a 37°C durante 1 h para llevar a cabo la fagocitosis, y luego ésta se detuvo cambiando la temperatura a 4°C. Posteriormente se añadieron, a cada pozo, 3 gotas de acetona y se procedió a la tinción de Wright. Se determinó el porcentaje de fagocitosis y del índice fagocítico. Todo el procedimiento

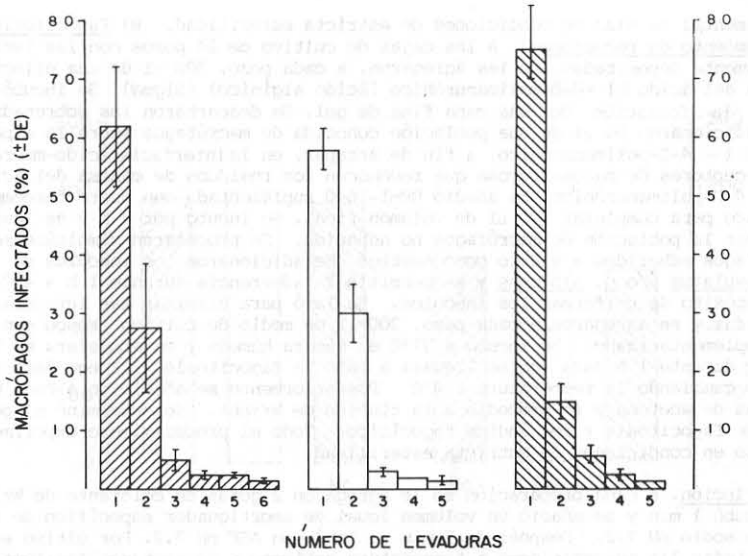

Fig. 3. Porcentaje del índice fagocítico de levaduras de C. albicans con competencia de ligandos. Los detalles de los experimentos son los mismos descritos en la figura 1. Para la determinación del porcentaje del índice fagocítico se consideró el número de levaduras por macrófago en una población de 200 macrófagos infectados por preparación. Se efectuaron 4 experimentos por cuadruplicado. Los resultados expresan la media ± desviación estándar. ▨ Macrófagos con D(+) manosa; ▧ macrófagos con metil-α-D-manopiranosa; □ macrófagos sin ligando competidor.

experimental se hizo en condiciones de estricta esterilidad. B) Fagocitosis por atrapamiento de receptores. A las cajas de cultivo de 24 pozos con las lentejas previamente depositadas, se les agregaron, a cada pozo, 300 µl de una dilución óptima del ácido β 1 → 4-D-polimanurónico (ácido algínico) (Sigma). Se incubó a 4°C hasta la formación de una capa fina de gel. Se descartaron los sobrenadantes y se adicionaron 50 µl de una población conocida de macrófagos sobre la capa del ácido β 1 → 4-D-polimanurónico, a fin de atrapar, en la interfacie ácido-macrófagos, los receptores de manosa/fucosa que reconocen los residuos de manosa del ácido β 1 → 4-D-polimanurónico. Se añadió RPMI-1640 suplementado con suero descomplementarizado para completar 300 µl de volumen final. Se incubó por 4 h y se lavó para eliminar la población de macrófagos no adherida. Se procesaron simultáneamente macrófagos adheridos a vidrio como testigo. Se adicionaron los inóculos de H. capsulatum y/o C. albicans y se permitió la adherencia durante 1 h a 4°C con el propósito de uniformar los inóculos. Se lavó para eliminar las levaduras no adheridas y se agregaron, a cada pozo, 300 µl de medio de cultivo fresco con suero descomplementarizado. Se incubó a 37°C en cámara húmeda y en atmósfera de 5% de CO_2 durante 1 h para que se llevara a cabo la fagocitosis, y luego ésta se detuvo cambiando la temperatura a 4°C. Posteriormente se añadieron, a cada pozo, 3 gotas de acetona y se procedió a la tinción de Wright. Se determinó el porcentaje de fagocitosis y del índice fagocítico. Todo el procedimiento experimental se hizo en condiciones de estricta esterilidad.

Tinción. A cada preparación se le agregaron 2 gotas de colorante de Wright. Se incubó 1 min y se añadió un volumen igual de amortiguador específico de fosfatos de sodio pH 7.2. Después de 7 min se lavó con ASF pH 7.2. Por último se secaron todas las preparaciones a temperatura ambiente y se montaron las lentejas con resina sintética en portaobjetos. Finalmente, éstas fueron observadas con el microscopio de luz para la determinación del porcentaje de fagocitosis y del índice fagocítico.

Determinación del porcentaje de fagocitosis y del índice fagocítico. El porcentaje de fagocitosis se determinó en una población total de 200 macrófagos por preparación, cuantificando el número de macrófagos capaces de fagocitar de 1 ó más levaduras. El índice fagocítico se determinó por el número total de levaduras fagocitadas en una población de 200 macrófagos infectados y el porcentaje del índice fagocítico se determinó por la cuantificación del número de levaduras fagocitadas por cada macrófago en una población total de 200 macrófagos infectados por preparación.

El resultado final de cada lote se expresó por el promedio de los datos obtenidos de las preparaciones sometidas a las mismas condiciones experimentales.

Análisis estadístico. Se realizó por la prueba de t de Student (Fisher, 1934).

RESULTADOS

Para llevar a cabo los experimentos de competencia de ligandos, previamente se determinó la concentración óptima de los ligandos competidores, D(+) manosa y metil α-D-manopiranosa, la cual fue de 1 mg/ml para ambos y que corresponde, además, a la concentración frecuentemente referida para ellos en la literatura.

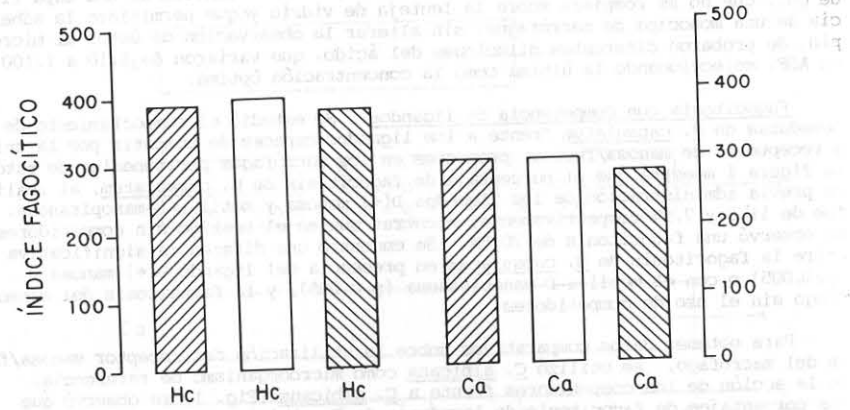

Fig. 4. Índice fagocítico de levaduras de H. capsulatum o C. albicans con competencia de ligandos. Los detalles de los experimentos son los mismos descritos en la figura 1. Se determinó el índice fagocítico por el número total de levaduras de H. capsulatum (H c) o de C. albicans (C a) fagocitadas en una población de 200 macrófagos infectados. Macrófagos con D(+) manosa; macrófagos con metil-α-D-manopiranosa; macrófagos sin ligando competidor.

Para los experimentos de atrapamiento de receptores se hicieron pruebas preliminares con el ácido β 1 → 4-D-polimanurónico, con el objeto de establecer la concentración adecuada de este compuesto, necesaria para la formación de una capa fina de gel, que no se rompiera sobre la lenteja de vidrio y que permitiera la adherencia de una monocapa de macrófagos, sin alterar la observación de éstos al microscopio. Se probaron diferentes diluciones del ácido, que variaron de 1:10 a 1:100 en ASF, seleccionando la última como la concentración óptima.

Fagocitosis con competencia de ligandos. Se estudió el comportamiento de levaduras de H. capsulatum frente a los ligandos capaces de competir por la unión a receptores de manosa/fucosa, presentes en los macrófagos peritoneales de ratón. La figura 1 muestra que el porcentaje de fagocitosis de H. capsulatum, al realizarse previa administración de los ligandos D(+) manosa y metil-α-D-manopiranosa, fue de 11.5 y 7.5% respectivamente, mientras que en el testigo sin competidores se observó una fagocitosis de 20.5%. Se encontró una diferencia significativa entre la fagocitosis de H. capsulatum en presencia del ligando D(+) manosa ($p < 0.005$) o con el metil-α-D-manopiranosa ($p < 0.005$), y la fagocitosis del mismo hongo sin el uso de competidores.

Para obtener datos comparativos sobre la utilización del receptor manosa/fucosa del macrófago, se utilizó C. albicans como microorganismo de referencia. En la acción de los competidores frente a C. albicans (Fig. 1) se observó que los porcentajes de fagocitosis de levaduras de C. albicans fueron de 23% cuando se utilizó D(+) manosa y 31% con el metil-α-D-manopiranosa, siendo estos valores más bajos que el porcentaje de fagocitosis alcanzado por el testigo sin competidores que fue de 38%. Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.025$) entre el porcentaje de fagocitosis de C. albicans, con el uso previo de D(+) manosa y su testigo sin el uso de competidores, no así cuando el competidor fue el metil-α-D-manopiranosa.

La determinación del índice fagocítico en los experimentos de competencia de ligandos (Figs. 2-4) confirma de alguna manera los resultados del porcentaje de fagocitosis, en los que se observó que las levaduras de C. albicans son más fagocitadas que las de H. capsulatum en la población de macrófagos estudiada y bajo condiciones de no facilitación (opsonización) del proceso fagocítico. Por lo general, la distribución del número de levaduras de H. capsulatum (Fig. 2) y C. albicans (Fig. 3) por célula fagocítica varió de 1 a 6, y en pocos casos hasta 7 y 8, siendo que la mayoría de los macrófagos fagocitó de 1 a 2 levaduras (Fig. 4).

Fagocitosis por atrapamiento de receptores. La utilización de un polímero de manosa en el cual los receptores manosa/fucosa del macrófago pudieran quedarse atrapados, fue la estrategia de estos experimentos. La figura 5 muestra los resultados del atrapamiento de receptores en la fagocitosis de H. capsulatum y C. albicans. Para las levaduras de H. capsulatum se obtuvo un promedio de 29.5% de fagocitosis al usar ácido β 1 → 4-D-polimanurónico, mientras que en el testigo sin atrapamiento de receptores se observó un 40.5% de fagocitosis. Se encontró poca diferencia ($p < 0.02$) entre la fagocitosis de H. capsulatum determinada en macrófagos adheridos al ácido β 1 → 4-D-polimanurónico y el testigo de fagocitosis del hongo en macrófagos adheridos al vidrio. En los resultados con C. albicans en los experimentos de atrapamiento de receptores, la fagocitosis fue de 58%,

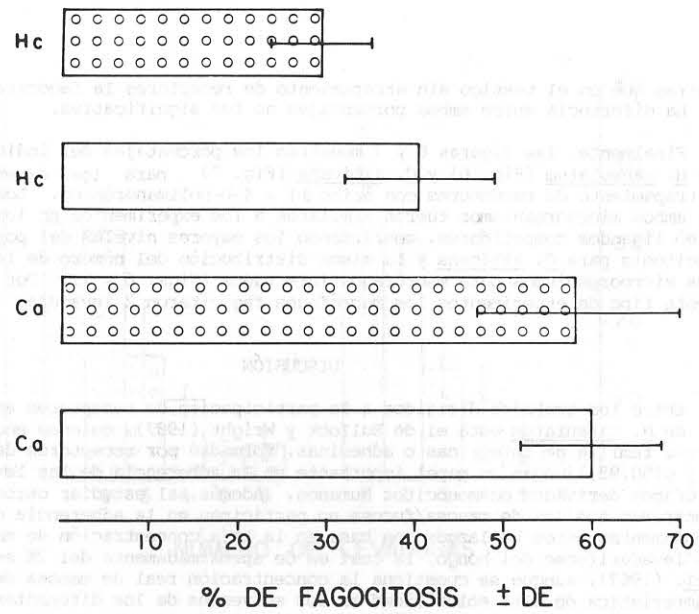

Fig. 5. Porcentaje de fagocitosis de levaduras de H. capsulatum o C. albicans por atrapamiento de receptores. Se adicionó una población conocida de macrófagos sobre un gel de ácido β 1 → 4-D-polimanurónico o directamente sobre lentejas de vidrio. Se procedió a la infección de los macrófagos con levaduras de H. capsulatum (H c) o C. albicans (C a) en una relación levaduras/macrófago de 5:1. Se sincronizó la adherencia del inóculo a 4°C 1 h y se disparó la fagocitosis a 37°C 1 h (ver detalles en Materiales y Métodos). La determinación de la fagocitosis se realizó en una población de 200 macrófagos por preparación. Se efectuaron 4 experimentos por cuadruplicado. Los resultados expresan la media ± desviación estándar. [o o o] Macrófagos sobre el gel de ácido β 1 → 4-D-polimanurónico; [ ] macrófagos adheridos a vidrio.

mientras que en el testigo sin atrapamiento de receptores la fagocitosis fue de 60%. La diferencia entre ambos porcentajes no fue significativa.

Finalmente, las figuras 6 y 7 muestran los porcentajes del índice fagocítico para H. capsulatum (Fig. 6) y C. albicans (Fig. 7) para los experimentos de atrapamiento de receptores con ácido β 1 → 4-D-polimanurónico. Los resultados para ambos microorganismos fueron similares a los experimentos en los cuales se empleó ligandos competidores, confirmando los mayores niveles del porcentaje de fagocitosis para C. albicans y la misma distribución del número de levaduras de ambos microorganismos para macrófagos infectados (Figs. 6 y 7). Por lo general, en este tipo de experimentos los macrófagos fagocitaron 2 levaduras (Fig. 8).

DISCUSIÓN

Entre los trabajos dirigidos a la participación de receptores en la fagocitosis de H. capsulatum está el de Bullock y Wright (1987), quienes encontraron que una familia de integrinas o adhesinas, formada por receptores del tipo LFA-1, CR3 y p150,95, juegan un papel importante en la adherencia de las levaduras a macrófagos derivados de monocitos humanos. Además, al estudiar otros receptores encontraron que los de manosa/fucosa no participan en la adherencia del hongo y fundamentan estos hallazgos con base en la baja concentración de manosa en la fase levaduriforme del hongo, la cual es de aproximadamente del 2% según Domer et al. (1967), aunque se cuestiona la concentración real de manosa debido a su característica de alta solubilidad en los solventes de los diferentes métodos de extracción. Otros investigadores han demostrado la presencia de manosa aislada o formando conjugados con compuestos como los glicolípidos (ceramida-P-inositol-[manosa$_2$] y ceramida-P-inositol-[manosa$_2$, galactosa]) presentes en la fase levaduriforme de H. capsulatum (Barr y Lester, 1984; Barr et al., 1984). Azuma et al. (1974) han dado gran importancia a la presencia de manosa asociada a otros compuestos,como responsables de moléculas compartidas entre hongos productores de nosologías afines. Aunque si bien es cierto que la manosa está más elevada en la fase micelial que en la fase levaduriforme de H. capsulatum (Domer et al., 1967), la asociación de manosa con galactosa (galactomananas), y determinada concentración crítica de éstas en la fase parasitaria del hongo, es posiblemente un factor relacionado a la producción de anticuerpos de reactividad cruzada (Azuma et al., 1974; Toriello et al., 1983). Dadas las discrepancias respecto a la composición real de manosa en H. capsulatum, y considerando que microorganismos levaduriformes como C. albicans y Saccharomyces cerevisiae tienen concentraciones importantes de manosa en su pared celular, se ha planteado, en el presente trabajo, la necesidad de buscar otras estrategias que permitan discriminar la participación de los receptores manosa/fucosa en la fagocitosis del hongo. También hay que considerar que los receptores manosa/fucosa no se expresan uniformemente en los fagocitos; por ejemplo, no lo hacen en monocitos humanos, sino en macrófagos derivados de ellos que se obtienen a través de su cultivo (Shepherd et al., 1982), lo que sugiere que el receptor manosa/fucosa se expresa en macrófagos más diferenciados o maduros. Por tal motivo, en este estudio se utilizaron macrófagos peritoneales de ratón, por ser éstos,células finalistas bien establecidas, en las que se sabe que se expresan receptores manosa/fucosa (Stahl y Gordon, 1982; Berton y Gordon, 1983).

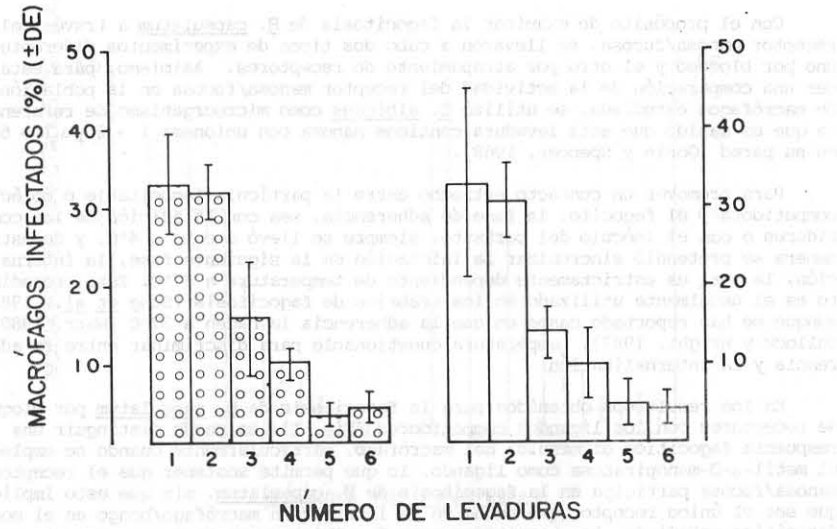

Fig. 6. Porcentaje del índice fagocítico de levaduras de H. capsulatum por atrapamiento de receptores. Los detalles de los experimentos son los mismos descritos en la figura 5. Para la determinación del porcentaje del índice fagocítico se consideró el número de levaduras por macrófago en una población de 200 macrófagos infectados por preparación. Se efectuaron 4 experimentos por cuadruplicado. Los resultados expresan la media ± desviación estándar. [o o o] Macrófagos sobre el gel de ácido β 1 → 4-D-polimanurónico; [ ] macrófagos adheridos a vidrio.

Con el propósito de examinar la fagocitosis de H. capsulatum a través del receptor manosa/fucosa, se llevaron a cabo dos tipos de experimentos diferentes: uno por bloqueo y el otro por atrapamiento de receptores. Asimismo, para establecer una comparación de la actividad del receptor manosa/fucosa en la población de macrófagos estudiada, se utilizó C. albicans como microorganismo de referencia, ya que es sabido que esta levadura contiene manosa con uniones $\alpha 1 \rightarrow 2$ y $\alpha 1 \rightarrow 6$ en su pared (Gorin y Spencer, 1968).

Para promover un contacto estrecho entre la partícula fagocitable o molécula competidora y el fagocito, la fase de adherencia, sea con la adición de los competidores o con el inóculo del parásito, siempre se llevó a cabo a 4°C, y de esta manera se pretendió sincronizar la iniciación de la siguiente fase, la internalización, la cual es estrictamente dependiente de temperatura a 37°C. Este procedimiento es el usualmente utilizado en los trabajos de fagocitosis (Sung et al., 1983), aunque se han reportado casos en que la adherencia la hacen a 37°C (Warr, 1980; Bullock y Wright, 1987), temperatura cuestionable para discriminar entre la adherencia y la internalización.

En los resultados obtenidos para la fagocitosis de H. capsulatum por bloqueo de receptores con los ligandos competidores (Fig. 1), se puede distinguir una respuesta fagocítica disminuída del macrófago, particularmente cuando se empleó el metil-α-D-manopiranosa como ligando, lo que permite sostener que el receptor manosa/fucosa participa en la fagocitosis de H. capsulatum, sin que esto implique que sea el único receptor que actúe en la interacción macrófago/hongo en el modelo fagocítico estudiado. Los resultados para C. albicans muestran un mayor porcentaje de fagocitosis que H. capsulatum, debido quizás a las características inherentes de su pared celular. Por lo general, el porcentaje de fagocitosis de los testigos de H. capsulatum y C. albicans no es muy elevado; sin embargo, es posible pensar que los niveles de fagocitosis reportados en este estudio están dentro de un comportamiento confiable, en particular si se considera que todo sistema biológico se encuentra expuesto a variables y por lo tanto no funciona a toda su capacidad. Además, las poblaciones de macrófagos obtenidas de animales, aun cuando procedan de cepas genéticamente puras, singénicas, presentan heterogeneidades morfológicas y funcionales.

Es pertinente examinar la acción de los ligandos competidores de manosa. Si éstos bloquean receptores que promueven la internalización del hongo, ¿cómo es que el hongo es internalizado? La respuesta más congruente sería la de que no todos los receptores son bloqueados y que el hongo entra a través de receptores aún disponibles, sin descartar la posibilidad de que además utilice receptores desconocidos. Con seguridad se elimina la posibilidad de que el hongo entre al macrófago vía receptor del complemento, ya que el suero adicionado al medio de cultivo invariablemente fue inactivado a 56° C por 30 min.

A través del empleo de marcadores de superficie se ha visto que los macrófagos tienen una amplia distribución de receptores sobre su membrana celular, que éstos son susceptibles de ser concentrados y/o atrapados en una región de la membrana mediante la utilización del sustrato específico para un determinado receptor, lo que conlleva a una disminución de la capacidad fagocítica del macrófago cuando se le reta con la partícula apropiada, debido a la no utilización del receptor atrapado (Berton y Gordon, 1983; Sung et al., 1983). Tomando en cuenta este compor-

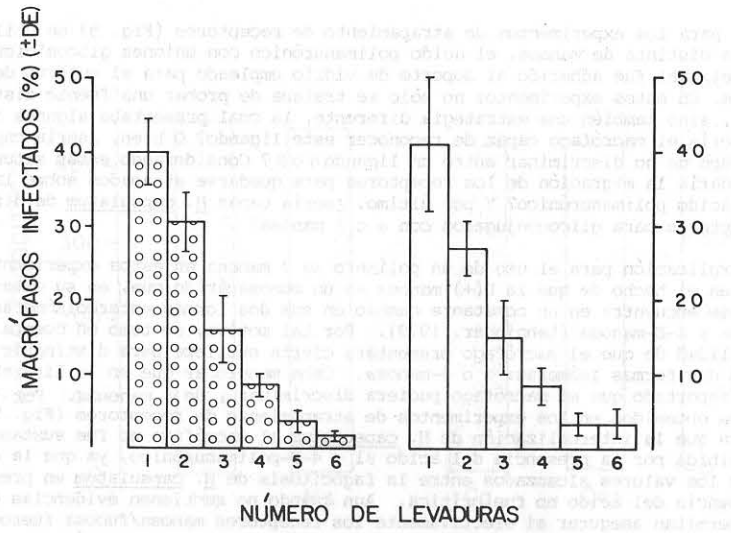

Fig. 7. Porcentaje del índice fagocítico de levaduras de C. albicans por atrapamiento de receptores. Los detalles de los experimentos son los mismos descritos en la figura 5. Para la determinación del porcentaje del índice fagocítico se consideró el número de levaduras por macrófago en una población de 200 macrófagos infectados por preparación. Se efectuaron 4 experimentos por cuadruplicado. Los resultados expresan la media ± desviación estándar. [o o o] Macrófagos sobre el gel de ácido β 1 → 4-D-polimanurónico; [ ] macrófagos adheridos a vidrio.

tamiento, para los experimentos de atrapamiento de receptores (Fig. 5) se utilizó una fuente distinta de manosa, el ácido polimanurónico con uniones glicosídicas β 1 → 4, el cual fue adherido al soporte de vidrio empleado para el cultivo de macrófagos. En estos experimentos no sólo se trataba de probar una fuente distinta de manosa, sino también una estrategia diferente, la cual presentaba algunas incógnitas: ¿sería el macrófago capaz de reconocer este ligando? O bien, ¿sería capaz el macrófago de no discriminar entre un ligando α o β? Considerando estas situaciones, ¿se daría la migración de los receptores para quedarse atrapados sobre la capa del ácido polimanurónico? Y por último, ¿sería capaz H. capsulatum de diferenciar receptores para glicoconjugados con α o β manosa?

La explicación para el uso de un polímero de β manosa en estos experimentos se apoya en el hecho de que la D(+) manosa es un monosacárido que, en su estado soluble, se encuentra en un constante cambio en sus dos formas estereoisómeras: α-D-manosa y β-D-manosa (Lehninger, 1979). Por tal motivo, se tomó en cuenta la posibilidad de que el macrófago presentara cierta sutileza para distinguir entre las dos formas isómeras: α o β-manosa. Cabe mencionar que en la literatura no se ha reportado que el macrófago pudiera discriminar α de β manosas. Por los resultados obtenidos en los experimentos de atrapamiento de receptores (Fig. 5) se infiere que la internalización de H. capsulatum al macrófago no fue sustancialmente inhibida por la presencia del ácido β1 → 4-D-polimanurónico, ya que la diferencia de los valores alcanzados entre la fagocitosis de H. capsulatum en presencia o ausencia del ácido no fue crítica. Aun cuando no se tienen evidencias directas que permitan asegurar si efectivamente los receptores manosa/fucosa fueron atrapados sobre el gel de ácido polimanurónico, sí se observaron macrófagos adheridos. Además, es conveniente aclarar que no se ha logrado montar un método que permita determinar cuantitativamente el atrapamiento de receptores por un sustrato.

Considerando que los resultados de la fagocitosis de H. capsulatum con el ácido β1 → 4-D-polimanurónico son menos relevantes frente a los observados con la D(+) manosa y el metil-α-D-manopiranosa se sugiere que el hongo utiliza preferentemente receptores α-manosa para su internalización. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que en el macrófago existan receptores para unir ligandos β-manosa, aunque éstos no sean utilizados preferencialmente para la internalización del hongo.

El análisis de los índices fagocíticos con ambos microorganismos, tanto en los experimentos de competencia de ligandos (Figs. 2-4) como en los de atrapamiento de receptores (Figs. 6-8), no muestran cambios puesto que la capacidad de internalización del macrófago no varía con estos tratamientos y, por lo general, fagocitan de 1 a 6 levaduras, lo que corresponde a la relación 5:1 de levaduras/macrófago utilizada. Finalmente, la expresión del índice fagocítico, como lo muestran las figuras 4 y 8, sugiere que los macrófagos predominantemente fagocitan de 1 a 2 levaduras.

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan el planteamiento de que el receptor manosa/fucosa participa en la fagocitosis de H. capsulatum en el sistema de macrófagos murinos utilizado, aunque se cree que no sea el receptor primario comprometido con la internalización de levaduras de este hongo.

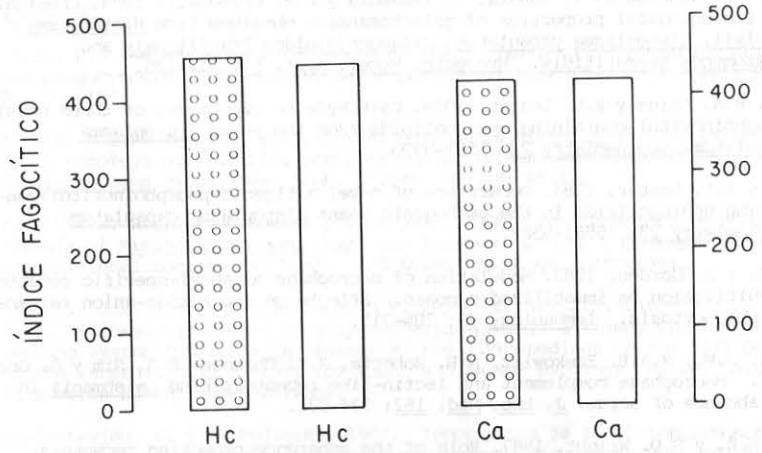

Fig. 8. Índice fagocítico de levaduras de H. capsulatum o C albicans por atrapamiento de receptores. Los detalles de los experimentos son los mismos descritos en la figura 5. Se determinó el índice fagocítico por el número total de levaduras de H. capsulatum (H c) o de C. albicans (C a) fagocitadas en una población de 200 macrófagos infectados. [o o o] Macrófagos sobre el gel de ácido β 1 → 4-D-polimanurónico; [ ] macrófagos adheridos a vidrio.

LITERATURA CITADA

Azuma, I., F. Kanetsuna, Y. Tanaka, Y. Yamamura y L.M. Carbonell, 1974. Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from Histoplasma duboisii, Histoplasma capsulatum, Paracoccidioides brasiliensis and Blastomyces dermatitidis. Mycopath. Mycol. Appl. 54: 111-125.

Barr, K., R.A. Laine y R.L. Lester, 1984. Carbohydrate structures of three novel phosphoinositol-containing sphingolipids from the yeast Histoplasma capsulatum. Biochemistry 23: 5589-5596.

Barr, K. y R.L. Lester, 1984. Occurrence of novel antigenic phosphoinositol-containing sphingolipids in the pathogenic yeast Histoplasma capsulatum. Biochemistry 23: 5581-5588.

Berton, G. y S. Gordon, 1983. Modulation of macrophage mannosyl-specific receptors by cultivation on immobilized zymosan. Effects on superoxide-anion release and phagocytosis. Immunology 49: 705-715.

Blackwell, J.M., R.A.B. Ezekowitz, N.B. Roberts, J.Y. Channon, R.B. Sim y S. Gordon, 1985. Macrophage complement and lectin-like receptors bind Leishmania in the absence of serum. J. Exp. Med. 162: 324-331.

Bullock, W.E. y S.D. Wright, 1987. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p 150,95, in binding of Histoplasma capsulatum by human macrophages. J. Exp. Med. 165: 195-210.

Domer, J.E., 1971. Monosaccharide and chitin content of cell walls of Histoplasma capsulatum and Blastomyces dermatitidis. J. Bacteriol. 107: 870-877.

Domer, J.E., J.G. Hamilton y J.C. Harkin, 1967. Comparative study of the cell walls of the yeastlike and mycelial phases of Histoplasma capsulatum. J. Bacteriol. 94: 466-474.

Fisher, R.A., 1934. Statistical methods for research workers, 5a. ed., Oliver y Boyd. Edimburgo.

Gorin, P.A.J. y J.F.T. Spencer, 1968. Structural chemistry of fungal polysaccharides. Adv. Carbohyd. Res. 23: 367-417.

Griffin, F.M., J.A. Griffin, J.E. Leider y S.C. Silverstein, 1975. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. J. Exp. Med. 142: 1263-1282.

Lehninger, A.L., 1979. Biochemistry, 2a. ed., Worth Publishers, Nueva York.

Rippon, J., 1988. Medical Mycology, 3a. ed., W.B. Saunders, Filadelfia.

Shepherd, V.L., E.J. Campbell, R.M. Senior y P.D. Stahl, 1982. Characterization of the mannose/fucose receptor on human mononuclear phagocytes. J. Reticuloendothel. Soc. 32: 423-431.

Stahl, P. y S. Gordon, 1982. Expression of a mannosyl-fucosyl receptor for endocytosis on cultured primary macrophages and their hybrids. J. Cell. Biol. 93: 49-56.

Sung, S.J., R.S. Nelson y S.C. Silverstein, 1983. Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of zymosan by mouse peritoneal macrophages. J. Cell. Biol. 96: 160-166.

Taylor, M.L. y L.F. Bojalil, 1977. Inmunología de la histoplasmosis: aislamiento de un complejo polisacárido-proteína con actividad inmunoespecífica a partir de Histoplasma capsulatum. Arch. Invest. Med. 8: 91-102.

Taylor, M.L., B. Rico, F. Goodsaid y G. Acosta , 1988. Fcγ receptors in phagocytosis of Histoplasma capsulatum. In: Abstracts of the X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Barcelona.

Toriello, C., J.L. Rosas, A. Martínez, M.R. Reyes-Montes, J.P. Latgé y M.L. Taylor, 1983. Biochemical studies of polysaccharide-protein antigens from fungi causing systemic mycosis. In: Baxter M. (ed.), Proceedings of the VIII Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Massey University, Palmerston North, Nueva Zelanda.

Velasco-Castrejón, O. y A. Fujigaki, 1984. Importancia de la histoplasmosis pulmonar primaria en trabajadores de minas. Neumol. Cir. Tórax Mex. 44: 7-9.

Warr, G.A., 1980. A macrophage receptor for (mannose/glucosamine)-glycoproteins of potential importance in phagocytic activity. Biochem. Biophys. Res. Comm. 93: 737-745.

Wilson, M.E. y R.D. Pearson, 1988. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes. Infect. Immun. 56: 363-369.

Wolf, J.E., V. Kerchberger, G.S. Kobayashi y J.R. Little, 1987. Modulation of the macrophage oxidative burst by Histoplasma capsulatum. J. Immunol. 138: 582-586.