

FAGOCITOSIS POR MACRÓFAGOS MURINOS DE LEVADURAS DE *Histoplasma capsulatum* OPSONIZADAS CON DIFERENTES SUBCLASES DE IGG

por Blanca Rico-Galindo*
Esperanza Duarte-Escalante* y
Maria Lucia Taylor*

MURINE MACROPHAGES PHAGOCYTOSIS OF *Histoplasma capsulatum* YEASTS OPSONIZED WITH DIFFERENT IgG SUBCLASSES

SUMMARY

Internalization kinetics of opsonized yeasts with different IgG subclasses obtained from infected mice and the participation of several Fc γ receptors (Fc γ R) were studied. Yeast cells were incubated 30 min at 37°C with enriched fractions of anti-*Histoplasma* IgG₁, IgG_{2a}, or IgG_{2b} separated by protein A-Sepharose chromatography. IgG from non infected mice was used as control. Before triggering internalization at 37°C, opsonized yeasts were washed and adjusted to a 5:1 ratio in relation to phagocytic cells. A murine macrophage J774.2 cell line monolayer was used and yeasts' attachment on the cultured monolayer was performed for 1 h at 4°C, to standardize and synchronize the inocula ingestion. IgG and Fc γ R participation was determined through a modified ELISA test, using a goat IgM anti-mouse IgG peroxidase-conjugate to evidence IgG opsonized yeasts on the macrophages' surface at different times of phagocytosis. Results showed a decrease in the optical density (O.D.) determined by ELISA at 15-60 min, followed by a recovery of O.D. during the further phagocytic times, suggesting a disappearance of Fc γ R during these times due to their utilization or cointernalization together with opsonized yeasts, as well as a possible recycling mechanism. In relation to the different IgG subclasses used, results support the highest opsonizing activity for IgG₁ and IgG_{2a} and a probable Fc γ RII participation in the internalization of opsonized yeasts.

* Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 04510, México.

RESUMEN

Se estudió la cinética de internalización de levaduras opsonizadas con diferentes subclases de IgG obtenidas de ratones infectados, así como la participación de distintos receptores FcR (Fc γ R). Las células levaduriformes fueron incubadas 30 min a 37°C con fracciones enriquecidas por cromatografía en Sepharose-proteína A de IgG₁, IgG_{2a} o IgG_{2b} con actividad anti-*Histoplasma*. Se utilizó IgG de ratones no infectados como testigo. Antes de permitir la internalización a 37°C, las levaduras opsonizadas fueron lavadas y ajustadas a una relación 5:1 con respecto a las células fagocíticas. Se emplearon monocapas de una línea celular de macrófagos murinos, la J774.2, y se permitió la adherencia de levaduras por 1 h a 4°C, sobre las monocapas cultivadas, para uniformar y sincronizar la ingestión del inóculo. La participación de las IgG y del Fc γ R fue determinada por una modificación de la técnica de ELISA, utilizando una IgM de cabra anti-IgG de ratón conjugada a peroxidasa, para evidenciar levaduras opsonizadas con IgG en la superficie de los macrófagos a diferentes tiempos de fagocitosis. Los resultados mostraron una baja en las lecturas de densidad óptica, reveladas por ELISA, a los 15-60 min de fagocitosis, recuperándose éstas en los tiempos posteriores, lo que sugiere la desaparición de los Fc γ R en este período debido a su utilización o cointernalización por las levaduras opsonizadas, así como su posible reciclaje. Respecto a las diferentes subclases de IgG empleadas, los resultados permitieron caracterizar una mayor actividad opsonizante para las IgG₁ e IgG_{2a} y una probable participación del receptor Fc γ RII en la internalización de levaduras opsonizadas.

INTRODUCCIÓN

Los macrófagos, en concierto con los mecanismos inmunes humorales y celulares son los efectores finales en la destrucción de muchos parásitos, una vez que han sido ingeridos. La interacción de los macrófagos con los parásitos involucra reconocimiento molecular y el entendimiento de cómo estas interacciones contribuyen a la eliminación de invasores o a su capacidad de sobrevivir en el hospedero, es fundamental para el avance del conocimiento de los procesos infecciosos.

La histoplasmosis es una enfermedad producida por un parásito intracelular facultativo, el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* Darling 1906, que en un hospedero susceptible se presenta bajo la forma de levadura con gran afinidad por el sistema fagocítico mononuclear. A pesar de que se desconocen a la fecha muchos de los eventos que intervienen en la

formación del binomio hongo/fagocito se cree que el contacto inicial, dado por la unión del hongo a los receptores de la membrana plasmática del fagocito, juega un papel importante en el destino final de las levaduras fagocitadas.

La unión de levaduras no opsonizadas de *H.capsulatum* a una familia de receptores expresados en macrófagos humanos cultivados, fue descrita inicialmente por Bullock y Wright (1987). Schnur y Newman (1990), demostraron la participación del complejo CD18, de neutrófilos humanos, en la unión de estas levaduras. Las células fúngicas reconocen en macrófagos cultivados y en neutrófilos humanos, componentes de membrana, preferencialmente la cadena β de las integrinas CR3, LFA-1, y p150.95 (Bullock y Wright, 1987; Schnur y Newman, 1990; Newman et al., 1990). La posible participación de IgG y C3bi como opsoninas séricas, promoviendo un aumento de la fagocitosis de levaduras por polimorfonucleares humanos ha sido planteada por Bullock y Wright (1987) y por Schnur y Newman (1990); también fueron investigados, en fagocitos humanos, los receptores manosa/fucosa no encontrándose, sin embargo, una actividad importante de éstos en la internalización de *Histoplasma* (Bullock y Wright, 1987).

El estudio de receptores para la internalización del hongo en el modelo de fagocitos murinos fue inicialmente abordado por Jerez y Taylor (1989), quienes utilizaron macrófagos peritoneales de ratón que están enriquecidos en receptores manosa/fucosa; sus resultados mostraron una participación pobre de estos receptores en la fagocitosis de levaduras, y confirman las observaciones de Bullock y Wright (1987) en fagocitos humanos.

Rico-Galindo (1987), al estudiar receptores Fc γ por iodización de proteínas de membrana de macrófagos y por la formación de rosetas con eritrocitos cubiertos con anticuerpos, en macrófagos infectados con levaduras opsonizadas del hongo, mostró que los receptores Fc γ participan en la internalización del hongo por los macrófagos, aunque, no aceleran esta etapa del proceso fagocítico. Además, sus resultados sugieren que estos receptores son parcialmente reciclados a la membrana de la célula fagocítica después de cumplirse 30-60 min de fagocitosis de las levaduras opsonizadas con IgG anti-*Histoplasma*.

Considerando lo anterior y con el propósito de identificar los receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas G (Fc γ R) que participan en la internalización de levaduras del hongo en macrófagos murinos, se planteó el presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos. Se empleó una cepa de *Histoplasma capsulatum* de alta virulencia-EH53, del cepario del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM. La cepa fue mantenida en fase levaduriforme a 37°C en medio de infusión cerebro corazón (BHI) (Bioxón, México, D.F.), suplementado con 0.1% de L-cisteína y 1% de glucosa.

Células. Se utilizaron macrófagos de la línea celular J774.2 derivada de un sarcoma de células reticulares de ratones BALB/c (Ralph y Nakoin, 1975; Ralph et al., 1975). Estos se cultivaron a 37°C con atmósfera húmeda y CO₂ al 5%, en frascos de plástico (Nunc, Roskilde, Denmark) conteniendo Medio Eagle Modificado por Dulbecco (MEMD) (Gibco, Grand Island Biological Co., N. Y.) debidamente suplementado con 50 µg/ml de gentamicina (Scheramex, México, D.F.), 2.0 mM L-glutamina, 1.0 mM piruvato de sodio y 20% de suero fetal bovino (Gibco).

Animales. Se utilizaron ratones machos singénicos BALB/c para la inmunización con el hongo y posterior obtención de inmunoglobulinas G. Los animales fueron adquiridos del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

Reactivos. Todos los reactivos empleados, salvo los que se especifican, procedieron de los Laboratorios Merck de México, S.A., México, D.F.

Inmunización de animales para la obtención de anticuerpos anti-*Histoplasma*. Ratones machos BALB/c de 4 meses fueron infectados por inyección intraperitoneal con la dosis letal 50 (DL₅₀) de la fase levaduriforme de la cepa EH53, que corresponde al inóculo de 5.6×10^7 levaduras/ml (Reyes-Montes et al., 1985). Se observó la evolución de la infección durante un período de 15 a 30 días. A la aparición de los signos de enfermedad: pelo erizado, pérdida de peso y disminución de actividad del animal, se sangraron los ratones y se separó el suero, almacenándolo a -20°C.

Obtención de inmunoglobulinas G (IgG). Se separaron fracciones enriquecidas de IgG a partir del suero normal de ratones no infectados o del suero inmune procedente de animales infectados con *Histoplasma*. El método para la separación de subclases de IgG fue similar al descrito por Ey et al. (1978). Una vez obtenido el suero se adicionaron 2 ml de fosfato de sodio 0.1 M pH 8.0 por cada 3-4 ml de suero. Se ajustó el pH de la muestra sérica a 8.1 con Tris-HCl 1.0 M pH 9.0 y se aplicó a una columna de Sepharose 4B-proteína A (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8.0. Se dejó reposar de 20-30 min. El material no retenido se eluyó con 30 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8.0 hasta

obtener una densidad óptica de cero a 280 nm. La IgG₁ se eluyó con 30 ml de amortiguador de citratos 0.1 M pH 6.0 y se lavó la columna con 20-25 ml de amortiguador de citratos 0.1 M pH 5.5. La IgG_{2a} se eluyó con 25-30 ml de amortiguador de citratos 0.1 M pH 4.5 y la IgG_{2b} con 25-30 ml de amortiguador de citratos 0.1 M pH 3.5. Todo el procedimiento se realizó a 4°C.

Opsonización. A partir del cultivo del hongo en fase logarítmica de crecimiento se cosecharon las levaduras por centrifugación a 1000 g 10 min; se lavaron con amortiguador salino de fosfatos (ASF) 0.15 M pH 7.2 y se contaron en cámara de Neubauer. Se les adicionó, por separado, cada una de las IgG obtenidas del suero anti-*Histoplasma* o la IgG separada del suero normal, determinando sus actividades opsonizantes según Kozel y McGaw (1979). Brevemente: Se colocó un número constante de levaduras (2.35×10^6) en una serie de pozos de una placa de poliestireno y se añadieron cantidades crecientes de la IgG a probar; se incubó a 37°C durante 30 min y se agregó anti-IgG de ratón obtenida en conejo, de clase IgM (Sigma), diluida de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial. Se incubó 30 min a 37°C y se observó en el fondo del pozo la aglutinación. Para los ensayos de fagocitosis, según la cantidad de levaduras requerida por el experimento, y la inmunoglobulina G de que se tratase, se adicionó la IgG respectiva al paquete de levaduras resuspendido en medio MEMD y se incubó durante 30 min a 37°C. Se centrifugó a 700 g por 30 min para eliminar el anticuerpo libre y se restituyó el volumen original con MEMD fresco.

Infección de macrófagos in vitro. Monocapas de macrófagos cultivadas en placas de 96 pozos (Nunc), por 24 h, fueron utilizadas para la infección con levaduras de *H.capsulatum*. Se lavaron las monocapas con MEMD previa la infección y se agregó el inóculo de levaduras opsonizadas según lo descrito anteriormente, en una relación de 5 levaduras por macrófago. Se permitió la adherencia durante 1 h a 4°C. Se lavaron las monocapas para eliminar las levaduras no adheridas, se agregó medio de cultivo fresco y se incubó a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5%, para permitir la fagocitosis durante diferentes tiempos: 0, 5, 15, 30, 60, y 120 min. Una vez transcurrido el tiempo de fagocitosis se procesaron los cultivos para la prueba de ELISA modificada como se indica más adelante.

Para determinar la viabilidad de *Histoplasma*, se sembraron los inóculos, por plaqueo en cajas de Petri con BHI-Agar, después de realizada la infección. Se incubaron las placas por 2-3 semanas a temperatura ambiente y se observó la reversión del hongo a la fase micelial, por macro y microscopía.

Prueba de ELISA modificada. Una vez realizada la infección de las monocapas cultivadas de macrófagos con levaduras opsonizadas con las diferentes subclases de IgG, y después de haber transcurrido cada tiempo deseado de fagocitosis, los cultivos se lavaron y se

fijaron con metanol durante 10 min. En seguida, se procedió a la realización de la técnica de ELISA según Voller et al. (1979). Se lavaron los pozos, varias veces, con ASF pH 7.4 conteniendo 0.05% (v/v) de Tween 20 (ASF-Tween) y se les añadieron 100 μ l de albúmina sérica bovina (ASB) al 5% en ASF-Tween. Se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y se lavaron, repetidas veces, con ASF-Tween. Posteriormente, se les agregaron 50 μ l de una IgM de cabra anti-IgG de ratón conjugada a peroxidasa (Sigma) y se incubaron a 37°C durante 1 h. Se lavaron nuevamente, los pozos, con ASF-Tween y se les añadieron 50 μ l del sustrato preparado con ortofenildiamina a 40 mg/100 ml de amortiguador de citrato (0.1 M)-fosfato (0.2 M) pH 5.0 y 40 μ l de peróxido de hidrógeno al 30%. Se permitió llevar a cabo la reacción en la oscuridad hasta el desarrollo del color. La reacción fue detenida con 50 μ l/pozo de ácido sulfúrico 2.5 M y el contenido de cada pozo fue transferido a una placa nueva para hacer la lectura, la cual se realizó a 492 nm en un lector de ELISA (Dynatech modelo MR-300, Alejandría, VA.).

Como testigos para estos experimentos se usaron macrófagos sin infectar, macrófagos infectados con levaduras sin opsonizar y macrófagos más partículas de látex de 0.45 μ de diámetro (Sigma), añadiendo éstas en la misma relación de las levaduras, esto es, 5 partículas por macrófago.

RESULTADOS

Determinación de la actividad opsonizante. La reactividad de las subclases de IgG, obtenidas del suero anti-*Histoplasma*, hacia las levaduras del hongo, fue probada por aglutinación indirecta. La tabla 1 muestra los resultados, observándose que las diferentes subclases participan en la reacción, mientras que los testigos de levaduras no opsonizadas, en presencia de una anti-IgG de ratón de clase IgM, no desarrollan aglutinación. Al utilizar un número constante de levaduras de 2.35×10^6 , las dosis opsonizantes baja, media y alta para las IgG₁ e IgG_{2a} fueron de 0.62, 1.25 y 2.5 μ g y para la IgG_{2b} fueron de 5, 10 y 20 μ g de proteínas, respectivamente. Estas dosis fueron empleadas en la realización de los experimentos subsecuentes. La IgG testigo, obtenida de suero normal de ratones no infectados, no desarrolla actividad aglutinante.

Prueba de ELISA modificada. Con el interés de identificar la subclase de IgG anti-*Histoplasma* que más participa en la internalización de levaduras del hongo, por medio de los diferentes receptores Fc γ de macrófagos, y además caracterizar mejor la cinética de tiempo de fagocitosis de las levaduras opsonizadas, se empleó una prueba de ELISA modificada, la cual permitiría solamente determinar levaduras opsonizadas mientras se hallaban adheridas al macrófago. Utilizamos macrófagos infectados

Tabla 1. Actividad opsonizante de las IgG obtenidas por cromatografía de afinidad en Sepharose-proteína A

Subclases de IgG	µg de proteínas de las IgG							
	0.15	0.31	0.62	1.25	2.5	5	10	20
Suero inmune anti- <i>Histoplasma</i>								
IgG1	-	-	+	+	+	-	-	-
IgG2a	-	-	±	+	±	-	-	-
IgG2b	-	-	-	-	-	+	+	+
Suero normal								
IgG testigo	-	-	-	-	-	-	-	-

La actividad opsonizante fue estimada por la técnica de aglutinación de Kozel y McGaw (1979). Se colocó en cada pozo una dilución de la IgG murina a probar con una cantidad determinada de proteína y se agregó un número constante de levaduras (2.35×10^6). Después de ajustar el volumen final en los pozos, se añadió una anti-IgG de ratón de clase IgM. Se procesaron testigos de levaduras no opsonizadas tratadas con la anti-IgG de ratón, ver detalles en Materiales y Métodos.

con levaduras opsonizadas y diferentes testigos, tales como, macrófagos no infectados y macrófagos fagocitando levaduras no opsonizadas o partículas de látex. Una vez alcanzado cada tiempo de fagocitosis, se detuvo el proceso fagocítico por incubación en frío y se añadió la anti-IgG acoplada a peroxidasa para determinar el tiempo en que desaparecen las levaduras opsonizadas de la superficie del fagocito, hecho que se evidencia por la disminución de la intensidad de la reacción proporcionada por la enzima más su sustrato.

Estos experimentos se realizaron procediendo a la opsonización de levaduras con 3 concentraciones distintas de proteínas de las subclases de IgG utilizadas y manteniendo la relación macrófago/hongo de 1:5. Los resultados se observan en las figuras 1-3. Las dosis opsonizantes bajas y medias (Figs.1 y 2) permitieron discriminar más claramente la participación de las inmunoglobulinas, destacándose primeramente la IgG₁ seguida de la IgG_{2a}. Con ambas se desarrollaron lecturas de D.O. elevadas a los tiempos de 0-5 min cuando aún se encontraban levaduras adheridas al fagocito; posteriormente se abatieron las lecturas a los 15 min, desapareciendo éstas a los 30-60 min de fagocitosis, correspondiendo posiblemente este tiempo a la completa internalización de las levaduras. En los tiempos tardíos de fagocitosis se observó una recuperación de las lecturas de D.O. exclusivamente con levaduras opsonizadas (Figs.1-3). Los experimentos con dosis opsonizantes altas (Fig. 3) dieron menores lecturas de D.O. y el comportamiento individual de cada subclase de IgG fue menos claro, aunque se repitió la misma cinética para los distintos tiempos de fagocitosis. La IgG_{2b} en los varios ensayos realizados siempre presentó lecturas más bajas en todos los tiempos procesados (Figs. 1-3).

Por lo general, las lecturas de ELISA fueron muy bajas en los ensayos testigos procesados con macrófagos fagocitando levaduras tratadas con IgG obtenidas de suero de ratones no infectados (Fig. 1-3), levaduras no opsonizadas o partículas de látex (Fig. 4). Las cinéticas observadas en los testigos, a diferencia de los ensayos con IgG anti-*Histoplasma*, carecen de recuperación de las lecturas de D.O. en los tiempos tardíos de fagocitosis (Fig. 4).

Los datos graficados fueron corregidos con los valores de las lecturas obtenidas, de cada tiempo, de macrófagos sin infectar.

DISCUSIÓN

El destino final de las partículas ingeridas por los macrófagos está relacionado con el tipo de receptor al que se adhieren (Mosser y Edelson, 1984). El receptor para la fracción Fc de las IgG es uno de los más relevantes en la internalización de parásitos, particularmente de bacterias extracelulares

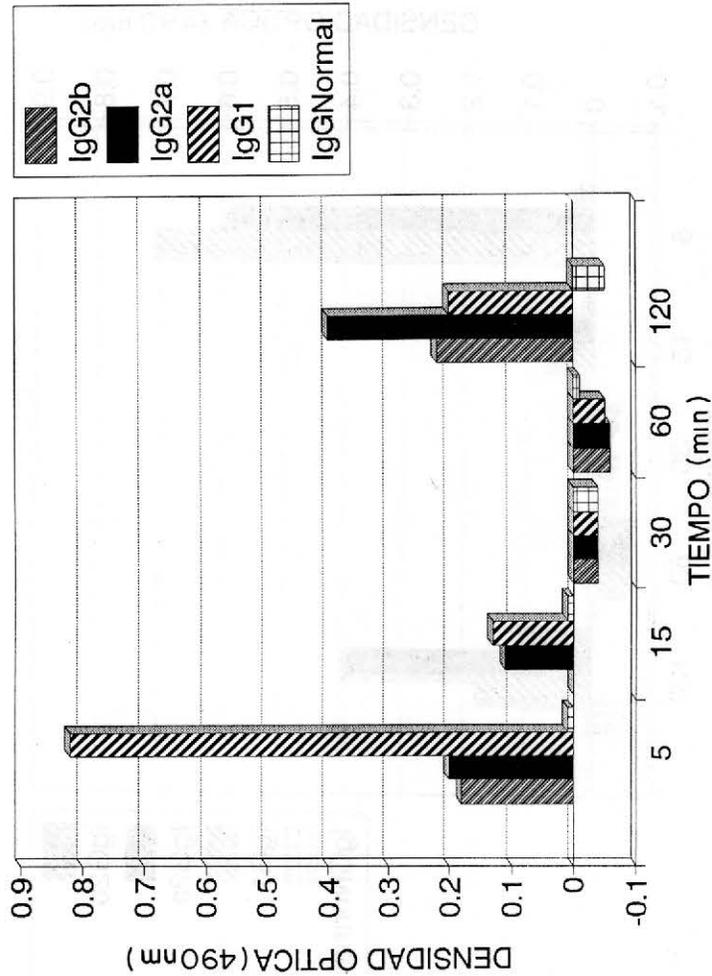


Fig. 1. Participación de subclases de IgG murinas en la fagocitosis de macrófagos infectados con levaduras de *H. capsulatum* opsonizadas con dosis bajas de inmunoglobulinas. Se utilizó la prueba de ELISA modificada, según lo descrito en Materiales y Métodos. Se emplearon las dosis opsonizantes de 0.62 μ g de IgG₁ e IgG_{2a}, y de 5 μ g de proteínas de la IgG_{2b}, determinadas por la técnica de aglutinación de Kozel y McGaw (1979). Para la IgG de ratones no infectados se utilizó la dosis de 1.8 μ g de proteínas que corresponde a una dosis aglutinante para partículas de látex cubiertas con esta inmunoglobulina. Los valores graficados fueron corregidos con las lecturas

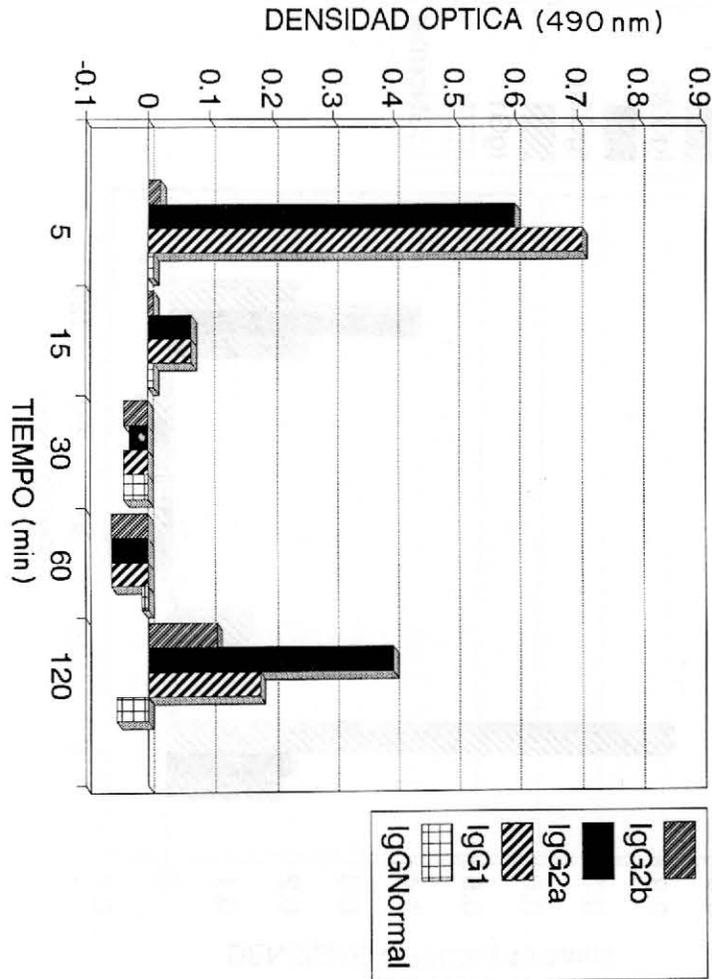


Fig. 2. Participación de subclases de IgG murinas en la fagocitosis de macrófagos infectados con levaduras de *H. capsulatum* opsonizadas con dosis medias de inmunoglobulinas. Se emplearon las dosis opsonizantes de 1.25 μ g de IgG₁ e IgG_{2a}, y de 10 μ g de proteínas de la IgG_{2b}, determinadas por la técnica de aglutinación de Kozel y McGaw (1979). Ver detalles en la figura 1.

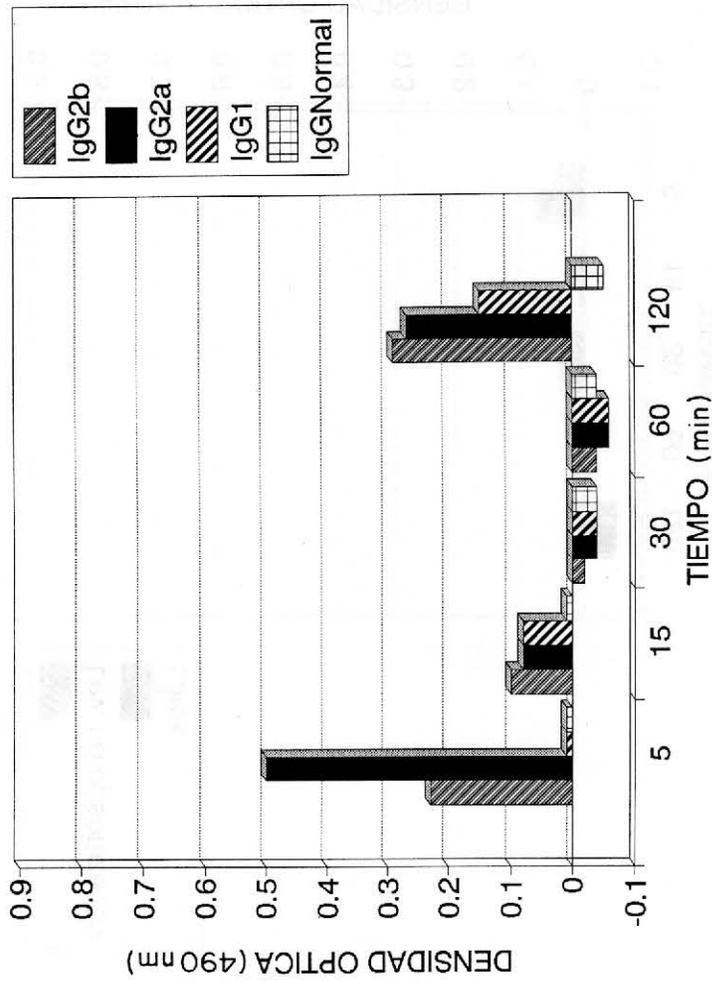


Fig. 3. Participación de subclases de IgG murinas en la fagocitosis de macrófagos infectados con levaduras de *H.capsulatum* opsonizadas con dosis altas de inmunoglobulinas. Se emplearon las dosis opsonizantes de 2.5 μ g de IgG₁ e IgG_{2a}, y de 20 μ g de proteínas de la IgG_{2b}, determinadas por la técnica de aglutinación de Kozel y McGaw (1979). Ver detalles en la figura 1.

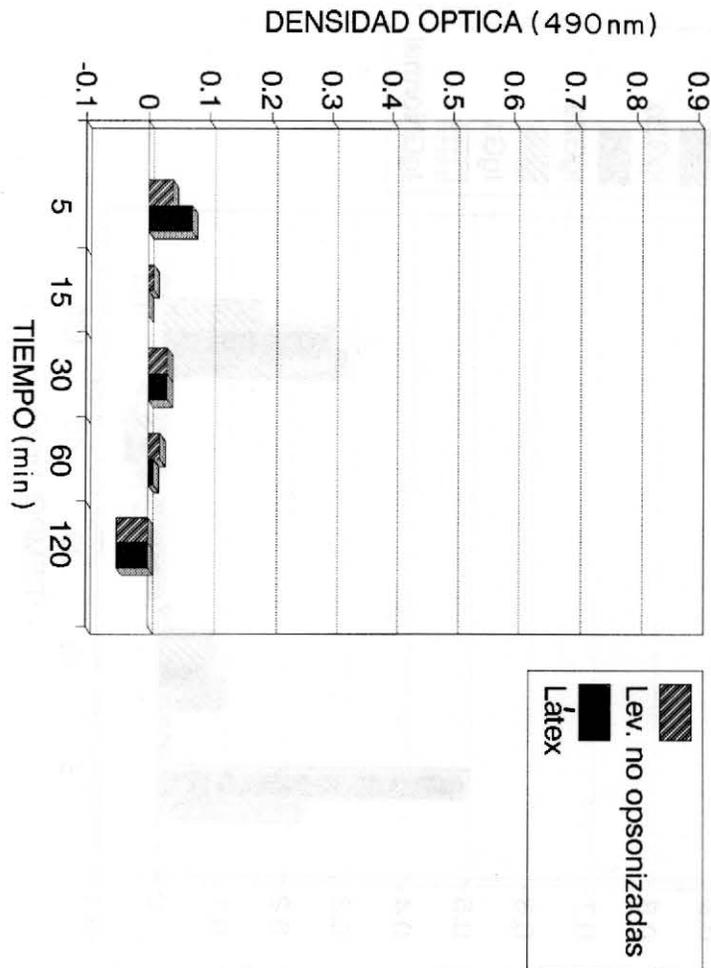


Fig. 4. Fagocitosis de levaduras no opsonizadas y de partículas de látex por macrófagos murinos. Los valores graficados fueron corregidos con las lecturas inespecíficas dadas, para cada tiempo, de los testigos de macrófagos no infectados. Se utilizaron 1×10^5 macrófagos por pozo, manteniendo la relación de 1:5 de macrófago:partícula fagocitada (levadura o látex).

capsuladas (Mosser y Edelson, 1984). En la fagocitosis de algunos microorganismos intracelulares, los mecanismos oxidativos del fagocito sólo se disparan si el parásito es internalizado a través del receptor Fc γ (Wilson et al., 1980), lo que induce en otros modelos intracelulares la necesidad de determinar la fagocitosis de ellos mediante esta vía.

Resultados anteriores (Rico-Galindo, 1987) apoyan la participación de los receptores Fc γ (Fc γ R) en la fagocitosis de *H.capsulatum* por macrófagos murinos, aunque éstos no parecen ser los preferenciales, puesto que no modifican la cinética de internalización de levaduras del hongo. Sin embargo, los datos no aportan información sobre el tipo de Fc γ R involucrado, ni tampoco, sobre la participación de las distintas subclases de IgG murina en la fagocitosis de *Histoplasma*, razón por la cual se planteó la presente investigación.

Para comprobar que las IgG separadas por Sepharose-proteína A opsonizaban las levaduras del hongo, se utilizó una prueba de aglutinación indirecta, realizándola con una anti-IgG de clase IgM, puesto que las IgG no son buenas aglutinantes, mientras que las IgM lo son. En el procedimiento de separación de las IgG, la inmunoglobulina obtenida en mayor cantidad fue la IgG₁. Esta y la IgG_{2a} presentaron mayor sensibilidad a la opsonización debido a que sus dosis reactivas fueron menores que las requeridas para la IgG_{2b} (Tabla 1).

La utilización de macrófagos adheridos a fase sólida en la prueba de ELISA ha sido previamente empleada en una modificación de la técnica de MIF, con anticuerpos anti-macrófago acoplados a la peroxidasa (Peck, 1983). La presente modificación consistió en usar como revelador un conjugado anti-IgG-enzima, para evidenciar las levaduras opsonizadas con IgG anti-*Histoplasma* y adheridas a la superficie de los macrófagos; considerando que los macrófagos presentan cerca de 1×10^5 Fc γ R por célula (Unkeless, 1980), la realización de la prueba fue numéricamente factible.

Ensayos preliminares utilizando diferentes concentraciones de macrófagos no mostraron variaciones críticas en las lecturas de ELISA, razón por la cual se eligió la concentración de 1×10^5 macrófagos para la realización de los posteriores experimentos.

Los experimentos fueron realizados sincronizando el inicio de la fase de ingestión, permitiendo la adherencia del hongo a 4°C durante 1 h. Se ha descrito que la adherencia en frío reduce la migración molecular en el plano de la membrana impidiendo la interacción de múltiples puntos de unión con el parásito (Mosser y Edelson, 1984) y por este motivo favorece la acción independiente de un solo tipo de receptor, evitándose así efectos colaterales por la participación simultánea o sinérgica de otros receptores.

Los ensayos de fagocitosis para determinar el efecto opsonizante de las IgG mostraron, tanto para la IgG₁ como para la IgG_{2a}, lecturas altas de D.O. en la prueba de ELISA, mientras que la IgG_{2b} no desarrolló lecturas considerables, hecho que coincide además con las dosis elevadas de proteínas requeridas para la mejor expresión de su efecto opsonizante (Tabla 1), sugiriendo estas últimas observaciones una pobre participación de la IgG_{2b}.

Un hecho importante repetido en todos los experimentos procesados con levaduras opsonizadas con IgG específicas, fue la disminución de las lecturas de D.O., a partir de los 15 min y la recuperación de éstas a los 120 min, mientras que ninguno de los testigos mostró un comportamiento similar. Esto indica que los receptores desaparecen de la superficie de los macrófagos posiblemente cointernalizando con las levaduras. Además, hay que considerar que todas las lecturas fueron corregidas con los valores de reacciones inespecíficas del testigo de macrófagos no infectados. Estos resultados fueron similares a los descritos por Rico-Galindo (1987), al realizar sus estudios sobre el papel de los FcγR en la fagocitosis de *Histoplasma* por métodos más complejos, como son la radioiodinización de proteínas de membrana del fagocito y la cuantificación de células formadoras de rosetas para eritrocitos cubiertos con IgG.

La recuperación de lecturas en los tiempos tardíos de fagocitosis sugiere la posible reaparición o reciclaje de receptores en la membrana plasmática del fagocito. Los resultados sugieren además que los receptores no reciclan solos, puesto que se necesita de la presencia del ligando, esto es la IgG, para ser revelados por ELISA. No hay evidencia de levaduras completas en la superficie de los macrófagos después de cumplirse el proceso fagocítico, así que es factible que el receptor regrese a la superficie celular con el ligando o con éste unido a componentes degradados de la levadura. Mellman et al. (1983) han observado que los receptores FcγRII permanecen en niveles bajos por más de 24 h, sugiriendo que son degradados. En ausencia de ligando encuentran que el receptor se degrada en un $t_{1/2}$ de 10 h, mientras que en su presencia un 50% se degrada más rápidamente con un $t_{1/2}$ menor a 2 h; se sabe además que reciclan otros polipéptidos de la membrana plasmática en tiempos de 18 a 22 h, independientemente de si fueron fagocitados o no. Sin embargo, existen evidencias de que la membrana de vacuolas endocíticas puede reciclarse entre 5 y 10 min después de penetrar en la célula e incluso antes de unirse a los lisosomas.

El objetivo de usar diferentes subclases de IgG fue el de determinar la participación de los receptores FcγRI y FcγRII. Se ha reportado en varios modelos, que el FcγRII es un receptor de baja afinidad, siendo específico para IgG_{2b}, IgG₁ e IgG_{2a}; es el de mayor relevancia en la adherencia de microorganismos, así como para la ingestión y puesta en marcha del estallido respiratorio. Se sabe, además, que los organismos que interactúan con él

promueven la fusión fago-lisosomal, observándose un aumento de lisosomas secundarios (Mosser y Edelson, 1984). El Fc γ RI se encuentra en mayor número entre los macrófagos activados y es de alta afinidad para IgG_{2a}, y finalmente el Fc γ RIII que ha sido menos estudiado es supuestamente específico para IgG₃ (Unkeless et al., 1988). Conociendo el antecedente de que la afinidad de la IgG monomérica para los receptores de la línea celular J774.2 es muy baja en comparación con la afinidad que tienen los complejos antígeno-anticuerpo (Ralph et al., 1975), se considera que los resultados obtenidos con lecturas mas altas para IgG₁ apoyan que ésta es la subclase mejor opsonizante, y también sugieren un mayor compromiso del Fc γ RII en la internalización de levaduras opsonizadas, aun considerando la baja respuesta de la IgG_{2b}.

Este trabajo contribuye al estudio sobre el papel de los receptores en la fagocitosis de *H.capsulatum* por macrófagos murinos. Es de gran relevancia encontrar respuestas a varias preguntas e incógnitas aquí planteadas para lograr una mejor comprensión de la relación temprana que establecen los macrófagos y las levaduras del hongo en la etapa de infección y sus implicaciones en la patogenia de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

B. Rico-Galindo agradece al CONACYT la concesión de la beca nº F 302/0028 que permitió parte de la realización del presente trabajo. Se agradece además a José Angel Ledesma la elaboración de gráficas por computadora.

LITERATURA CITADA

- Bullock, W.E. y S.D. Wright, 1987. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150.95, in binding of *Histoplasma capsulatum* by human macrophages. *J. Exp. Med.* 165: 195-210.
- Ey, P.L., S.J. Prowse y C.R. Jenkin, 1978. Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* 15: 429-436.
- Jerez, M.E. y M.L. Taylor, 1989. Estudio del receptor manosa/fucosa en la fagocitosis de levaduras de *Histoplasma capsulatum*. *Rev. Mex. Mic.* 5: 241-259.

- Kozel, T.R. y T.G. McGaw, 1979. Opsonization of *Cryptococcus neoformans* by human immunoglobulin G: role of immunoglobulin G in phagocytosis by macrophages. *Infect. Immun.* 25: 255-261.
- Mellman, I.S., H. Plutner, R.M. Steinman, J.C. Unkeless y Z.A. Cohn, 1983. Internalization and degradation of macrophage Fc receptors during receptor-mediated phagocytosis. *J. Cell. Biol.* 96: 887-895.
- Mosser, D.M., P.J. Edelson, 1984. Mechanisms of microbial entry and endocytosis by mononuclear phagocytes. *Contemp. Top. Immunobiol.* 13: 71-96.
- Newman, S.L., C. Bucher, J. Rhodes y W.E. Bullock, 1990. Phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* yeasts and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages. Cellular cytoskeleton requirement for attachment and ingestion. *J. Clin. Invest.* 85: 223-230.
- Peck, R., 1983. An ELISA method for quantitation of macrophages migration from agarose microdroplets. *J. Immunol. Meth.* 64: 179-187.
- Ralph, P. y I. Nakoinis, 1975. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature* 257: 393-394.
- Ralph, P., J. Prichard y M. Cohn, 1975. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. *J. Immunol.* 114: 898-905.
- Reyes-Montes, M.R., J. Casasola, N.E. Elizondo y M.L. Taylor, 1985. Relationship between age and cellular suppressive activity in resistance to *Histoplasma capsulatum* infection. *J. Med. Vet. Mycol.* 23: 351-360.
- Rico-Galindo, B., 1987. Fagocitosis de *Histoplasma capsulatum*: Papel de los receptores membranales de macrófagos en el proceso fagocítico. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F.
- Schnur, R.A. y S.L. Newman, 1990. The respiratory burst response to *Histoplasma capsulatum* by human neutrophils. Evidence for intracellular trapping of superoxide anion. *J. Immunol.* 114: 4765-4772.
- Unkeless, J.C., 1980. Mouse macrophage Fc receptors. *J. Reticuloendothel. Soc.* 28: 11-19.

- Unkeless, J.C., E. Scigliano y V.H. Freedman, 1988. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Ann. Rev. Immunol.* 6: 251-281.
- Voller, A., D.E. Bidwell y A. Bartlett, 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Europe Laboratories Inc., London.
- Wilson, C.B., V. Tsai, J.S. Remington, 1980. Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages. Possible mechanism for survival of intracellular pathogens. *J. Exp. Med.* 151: 328-346.