



Revisión

Mecanismos de evasión de *Histoplasma capsulatum* en los fagocitos

María Teresa Maniscalchi Badaoui*, Druvic Lemus Espinoza.

Grupo de Micología Aplicada. Escuela de Ciencias de la Salud. Universidad de Oriente,
Núcleo de Anzoátegui

Recibido 15 de diciembre de 2005; aceptado 08 de mayo de 2006

Resumen: *Histoplasma capsulatum* es un hongo patógeno dimórfico termal del cual existen tres variedades: *H. capsulatum* var. *capsulatum* (histoplasmosis americana), *H. capsulatum* var. *duboissi* (histoplasmosis africana) e *H. capsulatum* var. *farciminosum* (linfangitis epizoótica). La histoplasmosis americana es más común y se puede considerar en la actualidad una de las micosis profundas más frecuentes a nivel mundial. Se manifiesta con gran diversidad de tipos y variaciones clínicas que van a depender de las condiciones inmunológicas del hospedero, del tamaño del inóculo y de la vía de entrada. La resolución de la enfermedad, que básicamente depende del sistema inmune celular, confiere cierta inmunidad a la reinfección y grados variables de hipersensibilidad a componentes antigénicos del microorganismo. Los conidios cuando penetran son fagocitados y, en el sistema retículoendotelial, se transforman, resistiendo su degradación en macrófagos, siendo capaces de sobrevivir. Al realizar una revisión de la literatura científica, nacional e internacional, sobre el mecanismo y eficiencia de la fagocitosis del *H. capsulatum*, se espera contribuir con el conocimiento de la interacción hospedero-hongo, lo que puede ser útil para mejorar el tratamiento. A pesar de que en los últimos 20 años se han dilucidado muchas dudas, con respecto a la respuesta inmunológica contra este miceto (específicamente sobre el proceso de fagocitosis) y se han planteado hipótesis sobre posibles mecanismos de evasión que presenta el hongo y su interacción con el hospedador, es necesario continuar profundizando en las investigaciones, ya que aún quedan algunos aspectos, de su capacidad a adaptarse a las nuevas condiciones que le ofrece el fagocito, por ser clarificados.

Palabras clave: *Histoplasma capsulatum*, Fagocitosis, Macrófagos, Fagocitos

Mechanisms of escape of *Histoplasma capsulatum* in the phagocytes

Abstract: *Histoplasma capsulatum* is a dimorphic fungal pathogen with three varieties: *H. capsulatum* var. *capsulatum* (american histoplasmosis), *H. capsulatum* var. *duboissi* (african histoplasmosis) and *H. capsulatum* var. *farciminosum* (epizotic lymphangitis). The american histoplasmosis is the most common and can be actually considered one of the worldwide deep mycoses most frequent. It causes a broad spectrum of clinical variations that will depend on the host immunologic condition, and the fungus inoculum size and entrance way. Cellular mediated immunity is considered the main mechanism of defense against this fungi; it confers certain immunity to the reinfection and variable degrees of hypersensitivity to microorganism antigenic components. When the conidia penetrate, they are ingested by resident phagocytes; then, in the reticulo-endothelial system, the conidia transformed, resisting macrophages degradation, and being able to survive. When we carrying out a scientific, national, and international literature revision, about the mechanism and efficiency of *H. capsulatum* phagocytoses, it is hoped to contribute with the knowledge of host-fungus interaction; this information can be useful to improve the treatment. Although many doubts have been elucidated in the last 20 years, with respect on the immunologic response against this fungus (specifically about phagocytoses process), and have many hypothesis on possible escape mechanisms, and their interaction with the host, it is necessary to continue with the investigations, since still there are some aspects to be clarified of the capacity of this fungus to adapt to new conditions that the phagocyte offers to him.

Key words: *Histoplasma capsulatum*, Phagocytoses, Macrophages, Phagocytes

* Correspondencia:

E-mail: mteresa23@yahoo.com

Introducción

El *Histoplasma capsulatum* es un hongo patógeno dimórfico termal en cultivo; a temperaturas inferiores a 35°C

y sobre sustratos naturales crece como un hongo filamentosos y en cultivos a temperatura de 37°C o cuando parasita, lo hace en forma de levadura [1].

Fue encontrado y nombrado, por primera vez, por el Dr. Samuel Darling, en 1906, mientras buscaba *Leishmanias* en frotis de material de autopsias. Inicialmente consideró que el parásito hallado era un protozooario muy cercano a *Leishmania* spp. en vista que los elementos observados por él en los tejidos eran intracelulares y median, aproximadamente, lo mismo que los cuerpos de Leishman-Donnovan del Kala-azar, pero les faltaba el quinetonúcleo y además tenían un halo claro acromático a su alrededor. Posteriormente, en 1912, el investigador brasileño Da Rocha Lima, sugirió que realmente se trataba de un hongo, al comparar las estructuras vistas por Darling con el agente etiológico de la linfangitis epizoótica de los caballos y mulas [1,2].

Actualmente se considera que existen tres variedades de este organismo: *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farcinosum* y ocasionan la histoplasmosis americana (igualmente llamada histoplasmosis capsulati), la histoplasmosis africana y la histoplasmosis farciminosum (también conocida como linfangitis epizoótica de algunos equinos), respectivamente [1,2]. La histoplasmosis se manifiesta en un abanico de diversidad de tipos y variaciones clínicas, debido a esto aparecen en las diferentes literaturas nuevos esquemas de clasificación de esta enfermedad. La histoplasmosis más común es la originada por el *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Se puede considerar en la actualidad que esta enfermedad es una de las micosis profundas más comunes, a nivel mundial [1].

Hasta 1948, se le consideró como una enfermedad esporádica y fatal, siendo en ese mismo año cuando Furcolow demuestra que había una forma benigna de la enfermedad [3]. En Venezuela se conoce la histoplasmosis apenas desde 1949, cuando se iniciaron los estudios epidemiológicos por parte del Dr. Campion, Dr. Scharyj y el Dr. Pollak; pero actualmente sabemos que, en nuestro país, es la micosis que complica con más frecuencia los casos de SIDA [3,4].

Se le considera una enfermedad del sistema fagocítico mononuclear. Las variaciones clínicas y la severidad van a depender de las condiciones inmunológicas del hospedero, del tamaño del inóculo y de la vía de entrada del hongo [2]. La enfermedad grave es más común después de la exposición intensa y prolongada con la tierra o el polvo contaminados con excrementos (guano) de aves o murciélagos (que le proveen al miceto gran cantidad de nitrógeno, indispensable para su biología), y ocurre con mayor frecuencia en los lactantes y las personas con alteración de la inmunidad mediada por células T [1,2].

Las microconidias penetran principalmente por vía inhalatoria, originando al principio una infección pulmonar, seguido de una diseminación hematógena rápida y transitoria. En la mayoría de los pacientes la infección es auto-limitada y sólo deja calcificaciones residuales en pulmón y algunas veces en bazo (forma benigna de histoplasmosis). La elevada resistencia natural a la infección por *Histoplasma capsulatum*, se comprueba por el hecho de que, en la gran mayoría de las personas infectadas, sólo hay pocas que presentan algunos síntomas y la enfermedad se resuel-

ve pronto; numéricamente hablando, se ha estimado que unas 500.000 personas se infectan anualmente con *H. capsulatum*, sin embargo, de estas, sólo el 1% presentan síntomas [5]. La resolución de la enfermedad confiere cierta resistencia a la reinfección y, además, grados variables de hipersensibilidad a los componentes antigénicos del microorganismo, que depende, básicamente, del sistema inmune celular [6]. Evidencia de este concepto ha sido probado por diferentes estudios experimentales [7,8]: primero, los linfocitos de los ratones inmunizados por una infección subletal con *Histoplasma capsulatum* puede mediar la supresión del crecimiento intracelular del hongo en macrófagos de ratones normales; segundo, hay un incremento de la susceptibilidad a desarrollar Histoplasmosis en ratones atímicos congenitamente o en ratones normales tratados con suero antilinfocitos y agentes citotóxicos; y tercero, la inmunidad anti-histoplasma puede ser transferida por células peritoneales o de bazo provenientes de donadores inmunizados.

En experimentos en los que se ha usado cultivo de tejidos, se demostró que la fagocitosis y el desarrollo intracelular del *H. capsulatum* no se afectaba por la existencia de suero con anticuerpos contra el microorganismo, por lo que se considera que los anticuerpos circulantes son de poco valor en la inmunidad establecida después de la resolución de la enfermedad [1]. Sin embargo, recientemente, Nosanchuk y col. [9] probaron la existencia de un rol importante en la defensa contra *H. capsulatum* de unos anticuerpos contra una proteína tipo histona (denominada histona H2B), los cuales facilitarían la acción de la fagocitosis y aumento en la producción de algunas citoquinas.

Teniendo claro que la principal respuesta inmunitaria protectora frente a algunas bacterias, protozoarios y muchas especies de hongos patógenos, intracelulares, es la inmunidad mediada por células [1,8,10,11] (que por un lado, causa la lisis de las células infectadas por efecto de los linfocitos T citolíticos, LTC, y por el otro, por la acción de los macrófagos activados por citoquinas, como el interferón gamma, IFN- γ), nos explica por que algunos individuos con enfermedades del grupo de linfoma-leucemia-Hodgkin o el SIDA, son extremadamente susceptibles a las infecciones por organismos intracelulares como el *H. capsulatum* [1,10,11].

Como ya se indicó, este microorganismo es un hongo patógeno, por lo que, no es frecuente que se comporte como un oportunista invasor, tornándose la enfermedad en crónica y progresiva. El mecanismo básico de patogenicidad de los hongos es su habilidad para adaptarse al medio tisular y a la temperatura, además de su capacidad para resistir la actividad lítica de las defensas del hospedero. Específicamente, en el caso de *H. capsulatum*, los conidios cuando penetran por inhalación son fagocitados, ya que el organismo libre de infección reacciona inicialmente mediante una respuesta inflamatoria inespecífica a polimorfonucleares, luego con linfocitos y macrófagos, se produce una alveolitis y, en el sistema retículoendotelial, se transforman en levaduras, resistiendo su degradación en los macrófagos, al igual que otras bacterias y protozoarios

intracelulares (varias especies de *Mycobacterium*, *Listeria monocytogenes*, *Leishmania* spp., *Salmonella typhimurium*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, etc), por lo tanto, son capaces de sobrevivir dentro de los fagocitos [10,12].

La función fagocítica es ejercida por varias células, las cuales clasificaremos en fagocitos profesionales (polimorfonucleares, macrófagos, células dendríticas) y fagocitos no profesionales (células HeLa, células L; líneas epitelial y fibroblástica, respectivamente). En la respuesta inmunitaria contra los parásitos intracelulares como el *H. capsulatum*, los fagocitos profesionales cumplen un doble papel [13], en primer lugar como efectores preliminares del sistema inmune innato o inespecífico (englobando o ‘engullendo’ a los microorganismos para destruirlos y produciendo citoquinas) y en segundo lugar, como partícipes de la respuesta inmune mediada por células (por ejemplo, como células presentadoras de antígenos o como efectores después de su estimulación por parte de los linfocitos T_H).

En el proceso de la fagocitosis, una vez atrapado el microorganismo en el fagosoma, intervienen varios mecanismos por medio de los cuales la célula de defensa intenta eliminar al patógeno. Los mecanismos dependientes del oxígeno se basan en la actividad de los intermediarios reactivos del oxígeno (ROI, siglas en inglés), que provocan el llamado “estallido respiratorio”, y de los intermediarios reactivos del nitrógeno (NRI), que generan óxido nítrico (NO), el cual es tóxico para algunos microorganismos y células tumorales [10,14]. Los mecanismos independientes del oxígeno se relacionan con la producción de ciertas proteínas ya formadas y acumuladas en los gránulos, como lisozimas, lactoferrina y proteínas catiónicas denominadas defensinas, catepsina G y azurozidina [15].

Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, en algunos casos no ocurre la digestión de las partículas o de los microorganismos ingeridos, ya sea por el volumen del material fagocitado, deficiencias primarias o congénitas de la función fagocítica (enfermedad granulomatosa crónica, deficiencia de mieloperoxidasa, etc.) o que el propio microorganismo desarrolle la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en la célula fagocítica, empleando diversos mecanismos de evasión.

A continuación se revisan los conocimientos relativos a la fagocitosis como efector de la respuesta inmune innata y celular en la histoplasmosis, así mismo, se describen los mecanismos básicos relacionados con el evento fagocítico y tráfico intracelular del *Histoplasma capsulatum*, junto con las estrategias de evasión de la fagocitosis que se han propuesto para este hongo.

Parasitismo de Histoplasma capsulatum en fagocitos profesionales

Se ha demostrado [16,17] que las conidias al entrar a los pulmones y, específicamente, al ser ingeridas por los macrófagos, su condición metabólica se altera marcadamente, aumentando la síntesis de algunas proteínas constitutivas que pudieran estar relacionadas con su patogenicidad.

Los macrófagos y las células dendríticas son los principales reguladores de la respuesta inmune contra *Histoplasma capsulatum* [17,18,19,20]. Estas células reconocen, atrapan y fagocitan las levaduras, de forma que le proveen un medio ambiente intracelular donde el hongo presenta la habilidad de multiplicarse [13,16,18]. De hecho, de los últimos trabajos realizados al respecto, se ha demostrado que las células dendríticas son más eficientes en la destrucción del *Histoplasma*, debido a mayor exposición a las hidrolasas del fagolisosoma, venciendo a uno de los mecanismos de evasión del hongo dentro de los macrófagos [19].

Para los organismos ingeridos, precisamente el medio más adverso dentro de los fagocitos profesionales, se encuentra en el fagolisosoma. Este organelo es altamente ácido y, como ya se mencionó, contiene una gran variedad de enzimas hidrolíticas que sólo son activadas a pH bajo. Por lo regular, el patógeno al entrar a la célula del hospedero, es encerrado en un fagosoma inicialmente unido a la membrana, en el cual el pH comienza a descender, probablemente por la incorporación de la ATPasa a la membrana fagosomal. Este pH fagosomal bajo influye varios eventos, como la unión de los lisosomas y por ende la formación del fagolisosoma y garantiza la funcionalidad de las hidrolasas, para promover su efecto microbicida, en el tráfico intracelular normal y para el proceso de presentación de antígenos [10,21,22].

Experimentalmente se ha observado que del total de levaduras del *Histoplasma* unidas a receptores CD11/18, de la familia de las β -2 integrinas, sobre la superficie de los fagocitos, son ingeridas alrededor del 80% de ellas en una hora [17,23]. Al ingresar en los macrófagos, las células fúngicas se multiplican en los fagolisosomas, a pesar de que, como se ha observado en modelos murinos, se produzca la fusión fago-lisosomal [22]. Esta multiplicación intracelular sucede aun cuando las levaduras son expuestas a ciertos anticuerpos específicos y a complemento [24]. Aunque las levaduras opsonizadas con anticuerpos estimulan el estallido respiratorio en macrófagos murinos, probablemente por la fagocitosis mediada por receptores Fc [25], el efecto de la opsonización de estas células de *Histoplasma capsulatum* con anticuerpos, no modifica la susceptibilidad intracelular del hongo a los diferentes mecanismos citocidas del fagocito, por lo que la opsonización no influye en la habilidad del microorganismo de proliferar dentro del macrófago. Paradójicamente, los macrófagos le proveen un medio ambiente interno que permite el continuo crecimiento facilitándole su diseminación a diferentes tejidos.

Otros fagocitos profesionales también pueden ser considerados como hospederos permisivos de *Histoplasma capsulatum*, por ejemplo los leucocitos polimorfonucleares (PMN). De estos, los neutrófilos son el mayor componente de la respuesta inflamatoria aguda por este hongo y puede jugar un rol en la limitación de la diseminación de las levaduras desde el pulmón [18].

No obstante el hecho de que las levaduras opsonizadas del *Histoplasma capsulatum* estimulen el estallido respiratorio en PMN [26] y de que son eliminadas *in vitro* por una

combinación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), yodo y peroxidasa [27], los datos de Newman y col. [28], en PMN humanos, sugieren que su acción está mediada, además, por un mecanismo no oxidativo. Este hallazgo se apoya en el hecho de que la actividad fungistática de los PMN de tres pacientes con Enfermedad Granulomatosa Crónica, fue equivalente a la de PMN normales. Además, la preincubación de PMN con cloruro de amonio, un agente lisosomotrópico, inhibe la fungistasis mediada por PMN, debido a su habilidad de elevar el pH endocítico y por ende, interferir en la óptima actividad de las enzimas lisosomales [28].

Igualmente se ha demostrado [15] que los principales componentes de los neutrófilos, que participan en la actividad antimicrobiana por la vía no oxidativa, son las hidrolasas lisosomales y los péptidos catiónicos que residen en los gránulos azurófilos, siendo estos últimos los componentes llamados defensinas. El efecto de las defensinas humanas sobre la inhibición del crecimiento intracelular de *H. capsulatum*, también fue reportado por Couto y col. [29], en una línea celular de macrófagos murinos transfectados con un DNA complementario que codificaba para la defensina de neutrófilos humanos HNP-1.

Los neutrófilos sintetizan y liberan varias citoquinas, entre las que están incluidas la interleucina 12 (IL-12), el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), la cual es esencial en la protección del hospedero en la infección primaria [30,31], y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), debido a esto, el deterioro de la respuesta inmune del hospedador seguido de un descenso de los neutrófilos, durante la infección primaria, puede estar asociado con alteraciones de la producción de citoquinas [18]. Deep y Gibbons [31] comprobaron que la GM-CSF es necesaria para eliminar al *Histoplasma* de los tejidos, en la Histoplasmosis pulmonar, e inclusive la reducción del hongo dependía de alguna forma de la dosis; sugiriendo que esta citoquina pudiera ser empleada como un adyuvante en el tratamiento de la Histoplasmosis.

Dado el periodo de vida corto de los polimorfonucleares *in vivo*, el hábitat más productivo para los microorganismos de crecimiento lento como *H. capsulatum*, son los macrófagos migratorios de larga vida. Los macrófagos murinos son activados por las citoquinas para acelerar la actividad antifúngica [32]. Una de las citoquinas que estimula directamente a los macrófagos murinos para inhibir el crecimiento del *Histoplasma capsulatum* es el INF- γ . Después de exponer a esta citoquina los macrófagos peritoneales, se acelera la actividad fungistática [33]. Esta población de macrófagos puede ser la única que se activa directamente por esta citoquina, para expresar la actividad anti-*Histoplasma*. Adicionalmente, los lipopolisacáridos (LPS) son requeridos para que los macrófagos esplénicos comiencen a activarse completamente, seguido de su exposición al INF- γ [34].

El efecto antifúngico de los macrófagos murinos estimulados con sólo INF- γ o con LPS es causado por la liberación de óxido nítrico (NO) [14]. A diferencia de los macrófagos murinos, en los macrófagos humanos no se ha de-

mostrado que sean estimulados por el INF- γ *in vitro* para limitar el crecimiento intracelular del *H. capsulatum*, mientras que el GM-CSF, el M-CSF y la IL-3 activan las células humanas para hacerse fungistáticas [35]. No obstante, la inmunidad mediada por el INF- γ es, probablemente, un factor de suma relevancia en el control de la histoplasmosis, esto sustentado en los casos reportados de histoplasmosis recurrente diseminada en individuos con deficiencia genética del receptor 1 [36].

En los últimos años, el NO ha sido involucrado en la muerte de varios parásitos intracelulares [37]. El NO es una molécula de corta vida, producida a partir del metabolismo de la L-arginina, derivada de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS). La producción de nitrito (NO_2^-), sintetizado a partir de la L-arginina, como indicador de la producción de NO, se correlaciona con la inhibición *in vitro* del crecimiento intracelular de *Histoplasma capsulatum* [38]. El NO atrapa al hierro intracelular, lo que produce una disminución del hierro intracelular, aunado a la baja regulación de los receptores de transferrina inducida en los macrófagos por el INF- γ [39]. En vista que el *Histoplasma* necesita del hierro para su metabolismo [3,11], estos datos nos sugieren que la restricción o captura del hierro intracelular puede ser una de las bases del efecto anti-*Histoplasma* del macrófago murino. Cabe señalar, que al adicionar hierro se puede provocar que el hongo supere los efectos del NO *in vitro* [14].

Otra citoquina importante en la activación de los macrófagos en la respuesta inmune, de una infección primaria por *Histoplasma capsulatum*, es la IL-12, por medio de su inducción de INF- γ [40, 41]. Se ha observado que la disminución de IL-12 en ratones con Histoplasmosis está asociado con una mortalidad acelerada [40].

Parasitismo de Histoplasma capsulatum en fagocitos no profesionales

Histoplasma capsulatum puede entrar y multiplicarse en fagocitos no profesionales, tanto *in vivo* como *in vitro*. Cuando Darling, en 1906, describió por primera vez la histoplasmosis, observó levaduras dentro de células del epitelio y del endotelio alveolar [24].

Algunas líneas celulares como las células HeLa (una línea epitelial), las células L (una línea fibroblástica) y las células embrionarias de tipo fibroblasto pollo, funcionan como fagocitos no profesionales y pueden servir como hospederos para las levaduras de *Histoplasma*, *in vitro*, Eissenberg y Goldman, en 1991 [42] observaron que una cepa mutante avirulenta del hongo, deficiente en α -(1,3)-glucano en su pared celular, presentaba tropismo para parasitar las células epiteliales de tráquea de hámster. Todo indica que estas células carecen de los mecanismos citocidas para eliminar al hongo, y no se sabe como las lesiona [24,42].

Mecanismos de evasión del H. capsulatum del efecto citocida de los fagocitos

El medio intracelular proporciona ventajas para la sobrevivencia y acceso a otros órganos, por medio de las circulaciones sanguínea y linfática, a varios patógenos intracelulares como algunas especies de *Mycobacterium*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes*, *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Histoplasma capsulatum*, etc; no obstante, estas condiciones son complejas y hostiles para estos parásitos y muchos de ellos han desarrollado estrategias para sobreponerse a la agresividad del medio interno de las células hospederas, y así sobrevivir [10,12].

Internalización y mecanismos de escape

La internalización rápida de la célula fúngica en los fagocitos, ha sido propuesto como un posible mecanismo de evasión de las condiciones adversas extracelulares, pero existen contradicciones sobre el tiempo real que transcurre en la internalización de las diferentes estructuras morfológicas del hongo, como conidios y levaduras [24]. La levadura es la forma fúngica más estudiada en ensayos de adherencia e internalización. León y col. [23] observaron que el tiempo óptimo promedio para la internalización de levaduras de *Histoplasma capsulatum* en macrófagos murinos fue de 15 a 30 min (incluso se pudiera extender a 60 min) independientemente de la concentración del inóculo y aún después de 180 min se observaron organismos extracelulares. Otros autores [28] han reportado un tiempo de 180 minutos para que se lleve a cabo una fagocitosis completa del inóculo y ajustando este a una relación levaduras/macrófagos de 1:5. Comparado con *Mycobacterium tuberculosis* [23], en el que se ha observado este mismo proceso, el tiempo de internalización de *H. capsulatum* es bastante prolongado, por lo que se puede considerar que las levaduras tienen una alta resistencia a los mecanismos de agresión extracelular, o bien que desarrolla otras estrategias para escapar de este medio hostil, como la de utilizar moléculas del hospedero para facilitar su entrada más rápida *in vivo*. Es conocido que las levaduras de *Histoplasma*, emplean para internalizarse receptores propios de las células del hospedero, como mecanismo mimético [17].

Las β -2-Integrinas o Leu-CAM CD11b/CD18 se expresan exclusivamente en los granulocitos, células asesinas naturales (NK) y monocitos. Ellas son las integrinas más abundantes en los neutrófilos, donde se encuentran almacenadas en los gránulos intracelulares y son expresados en la superficie leucocitaria después de la activación celular. Pueden actuar con varios ligandos, como el C3 y el C3b inactivo, y con factores de la coagulación, como el fibrinógeno y el factor X. Estos receptores también median la unión de los macrófagos a diversos parásitos, como el *Histoplasma capsulatum* [43].

Hay que tomar en cuenta que la forma infectante del *H. capsulatum*, son las microconidias de la fase micelial (que podemos encontrar en la tierra o flotando en el aire contaminados), por lo que esta será, en primera instancia, la encargada de establecer la infección y la fase levaduriforme la diseminación; tomando en cuenta esto, se deberían

realizar más estudios sobre la internalización de las conidias en las células fagocíticas.

Por otro lado, *H. capsulatum* tiene un largo tiempo de permanencia intracelular. El tiempo de generación de las levaduras en el microhábitat, determinado por Newman y col., [44] fue de 10 horas. Además, las mutantes avirulentas de *H. capsulatum* carentes de α -(1,3)-glucano, no matan a los macrófagos de la línea celular murina P388D1, aún después de 20 días en cultivo, sugiriendo una infección latente o crónica [24]. Esta permanencia larga dentro de la célula hospedadora podría ser considerada como un mecanismo alternativo de escape, para proteger las levaduras de la agresión extracelular.

Estrategias de escape en el fagosoma y en el fagolisosoma

La proliferación de *Histoplasma capsulatum* dentro de macrófagos es restringida por la activación de estos por el IFN- γ liberado por las células Th1 [11]. El éxito de la sobrevivencia intracelular del parásito depende de su habilidad para prevenir o impedir su destrucción por los componentes lisosomales. Por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Legionella pneumophila* y *Toxoplasma gondii* inhiben la fusión del fagosoma con los lisosomas, evitando con ello la exposición a los contenidos tóxicos del lisosoma. Por el contrario, *Trypanosoma cruzi*, *Listeria monocytogenes* y *Shigella flexneri*, lisan la membrana del fagosoma y se liberan al citoplasma del macrófago. En cambio *Salmonella typhimurium* y especies de *Leishmania* se localizan dentro del compartimiento fagolisosomal del macrófago, donde aparentemente resisten la inactivación por los factores lisosomales [12].

Eissemberg y col. [22] demostraron la existencia de una cinética de fusión de lisosomas con fagosomas, en los macrófagos de la línea celular P388D1 conteniendo *Histoplasma capsulatum*. Ellos observaron que los lisosomas premarcados con dextrán-FITC, comienzan a fusionarse con fagosomas conteniendo *H. capsulatum* a los 15 min después de la inoculación, y a las 3 horas la fusión fagolisosoma se presenta en un 95%. Otros autores [21] mostraron que la fusión fagolisosoma en macrófagos peritoneales murinos infectados con *Histoplasma capsulatum*, dependía del tamaño del inóculo infectante y probaron que las fusiones decrecen al aumentar el tiempo de fagocitosis. Pero otros investigadores [45] afirman que la fusión fagosoma-lisosoma en los macrófagos humanos, está limitada.

Ya que este hongo puede prosperar en este microambiente [16], probablemente induce algunas modificaciones en el fagosoma o en el compartimiento fagolisosomal, que le permiten su sobrevivencia dentro de la célula hospedera. Un mecanismo podría ser por el incremento del pH del fagolisosoma [22, 45]. Sin embargo, un pH mayor a 6,5 los priva del hierro, el cual es requerido para su crecimiento y por lo tanto la levadura muere [46,47]. Esta regulación de la adquisición del hierro por el pH está basado en unos estudios [13,46] en los cuales, macrófagos cargados de levaduras se expusieron a cloroquina (una base débil que alcaliniza los lisosomas) y posteriormente causó la muerte

de los elementos fúngicos. Estos resultados sugieren que el mantenimiento de un rango, por demás bien estrecho, de entre 6,0 y 6,5 es esencial para que el *Histoplasma capsulatum* se multiplique gracias a la adquisición del hierro.

Los mecanismos por medio del cual las levaduras mantienen un pH ligeramente ácido, permanecen sin esclarecerse del todo, podría ser que la responsable fuera la V-ATPasa (enzima vacuolar responsable de la generación y mantenimiento del pH ácido en el fagosoma) [48]. Strasser y col. [45] sugieren que hay dos posibles mecanismos por medio de los cuales *Histoplasma capsulatum* puede controlar el pH lisosomal para su sobrevivencia de forma diferente en los macrófagos murinos y humanos. Primero, que *H. capsulatum* pudiera alcalinizar el fagosoma neutralizando el efecto de la V-ATPasa; este pudiera ser el mecanismo que funciona en los macrófagos peritoneales murinos o en los macrófagos de la línea P388D1, en los cuales la fusión fagosoma-lisosoma ocurre normalmente. El segundo mecanismo sugiere que el hongo pudiera inhibir la acumulación o inactivaría la V-ATPasa en la membrana fagosomal (por interacción directa o por aumento en la degradación de la enzima), o que produciría la inhibición de la fusión de las vesículas que contienen la V-ATPasa, en este caso las levaduras pudieran necesitar una ligera acidificación de su medio ambiente para obtener un pH de 6,5 (el cual es el pH que *Histoplasma* mantiene en el fagosoma, para permitirle obtener hierro de las transferrinas [13,47] y así minimizar la actividad de las hidrolasas lisosomales del macrófago); este es el mecanismo que se sugiere, puede operar en los macrófagos humanos en donde la fusión fagosoma-lisosoma está limitada. Interesantemente estos mecanismos específicos sólo serían activados cuando el microorganismo estuviera dentro del fagosoma del macrófago [48]. Pero, además de lo señalado, nuevos estudios han revelado que, ha diferencia de los macrófagos murinos, los macrófagos humanos son capaces de eliminar y degradar las levaduras sin la acidificación del fagosoma (demostrado al inhibir la acción de la V-ATPasa con bafilomicina) [49], indicando la existencia de otros cofactores involucrados en la evasión de la respuesta inmune por parte del *Histoplasma*.

La explosión respiratoria genera la conversión catalítica del oxígeno molecular al anión superóxido, el cual se convierte en peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso y radicales hidroxilo; siendo esta reacción catalizada por la NADPH oxidasa [50]. Estos derivados del oxígeno (ROI), realizan un papel importante en la reacción microbicida contra bacterias y hongos. Diferentes autores han presentado resultados contradictorios con respecto a la regulación del estallido respiratorio de los fagocitos [24, 51]. Wolf y col. [25] observaron fallas en la estimulación del estallido respiratorio en los macrófagos murinos que habían fagocitado levaduras de *Histoplasma capsulatum* no opsonizadas, vivas o muertas por calor; Taylor y col. [24] refieren haber obtenido resultados similares con macrófagos murinos peritoneales y levaduras no opsonizadas. Posteriormente en otro trabajo, los mismos autores, se plantearon que las fallas del estallido respiratorio eran debidas a la inhibición de la proteína quinasa C, PKC (que puede parti-

cipar en la regulación de la maduración del fagosoma y de la cual se ha comprobado que, por lo menos, la isoenzima PKC- α juega un papel importante en la regulación de la función macrofágica innata, involucrado en el control de la infección por parásitos intracelulares [54]) en los macrófagos murinos como resultado de la ingestión de levaduras no viables del hongo.

Por otro lado, la fagocitosis de levaduras opsonizadas con suero normal o con suero inmune anti-*Histoplasma capsulatum*, fue capaz de estimular el estallido respiratorio en macrófagos murinos [25], mientras que Schnur y Newman [26], reportaron que la fagocitosis de levaduras opsonizadas llevada a cabo por neutrófilos humanos, no altera la generación de superóxido. Por todo esto se plantea que la estimulación del estallido respiratorio por *Histoplasma capsulatum*, es regulada de modo diferente en los fagocitos humanos y murinos.

Comentarios

Los parásitos intracelulares, especialmente el *Histoplasma capsulatum*, pueden desarrollar varias estrategias para evadir el sistema de defensa del hospedero, y es posible que se activen varios mecanismos de escape simultáneos, para lograr la supervivencia dentro del hospedador. El mecanismo de defensa primaria activada en respuesta a la presencia de *H. capsulatum*, es la inmunidad mediada por células.

La resolución de la histoplasmosis requiere de la interacción de las moléculas que activan a los macrófagos (INF γ , interleucinas, etc), en conjunto con la actividad de los intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) y de los intermediarios reactivos del nitrógeno (NRI), que generan óxido nítrico (NO).

El conocimiento de la interacción hospedero-hongo, puede ser útil para mejorar el tratamiento.

A pesar de que en los últimos 20 años se han dilucidado muchas dudas, con respecto a la respuesta inmunológica (específicamente sobre el proceso de fagocitosis) contra el *Histoplasma capsulatum*, y se han planteado hipótesis de los posibles mecanismos de evasión que presenta el hongo y su interacción con el hospedador, es necesario continuar profundizando en las investigaciones, ya que aún quedan algunos aspectos, de la capacidad del *Histoplasma* a adaptarse a las nuevas condiciones que le ofrece el fagocito, por ser clarificados.

Referencias

- [1] Rippon J. Tratado de micología médica. 3ra.edición. México. Interamericana Mc Graw Hill. 1990.
- [2] López R., Méndez L., Hernández F. y R. Castañón. Micología Médica. México. Editorial Trillas. 1995.
- [3] Vargas-Montiel H. Histoplasmosis. En: Albornoz, M.C ed. Temas de Micología Médica. 1ra. Edición. Caracas. 1996. p. 201-220.
- [4] Constantino, R.; Castillo, Z.; Castrillo, M. y E. Angulo. Histoplasmosis en pacientes con síndrome de inmunodefici-

- ciencia adquirida. Bol. Soc. Ven. Infec. 1998. Disponible en: www.svinf.org.ve/1998.htm.
- [5] Cano, M.V. and Hajjeh, R.A. The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Semin. Respir. Infect.* 2001; 16:109 - 118.
- [6] Ruiz, B.; Carvajal, R. and L. Ortiz-Ortiz. Modification of the Immune Response Induced by *Histoplasma capsulatum* Products. *Mycopathologia.* 1990; 109: 1-9.
- [7] Howard DH. Further studies on the inhibition of *Histoplasma capsulatum* within macrophages from immunized animals. *Infect Immun.* 1973; 8(4):577-581.
- [8] Kappe, R.; Levitz, M.; Cassone, A and G. Washburn. Mechanisms of host defense against fungal infection. *J. Med. Vet. Mycol.* 1992; 30: 167-177.
- [9] Nosanchuk, J.; Steenbergen, J.; Shi, L.; Deepe, G. and A. Casadevall. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *J. Clin. Invest.* 2003; 112:1164-1175.
- [10] Abbas, A.; Lichtman, A. y J. Pober. *Inmunología Celular y Molecular.* Segunda Edición. Interamericana McGraw-Hill. 1995.
- [11] Fukazawa, Y.; Cassone, F.; Bistoni, D.; Howard, H.; Kagaya, K.; Murphy, W.; Cenci, E.; Lane, T.; Mencacci, A.; Puccetti, P.; Romani, R.; Spaccapelo, L.; Tonnetti, L. and A. Wu-Hsieh. Mechanisms of cell-mediated immunity in fungal infection. *J. Med. Vet. Mycol.* 1994; 32: 123-131.
- [12] Prescott, L.; Harley, J. y D. Klein *Microbiología.* 4ta.ed. Caracas. Mc Graw Hill. 1999.
- [13] Newman, S. Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum*. *Trends Microbiol.* 1999; 7(2): 67-71.
- [14] Lane, T.; Wu-Hsieh, B. and D. Howard. Antihistoplasma effect to activate mouse splenic macrophages involves production of reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun.* 1994; 62: 1940-1945.
- [15] Newman, S.; Gootee, L.; Gabay, J. and M. Selsted. identification of constituents of human neutrophil azurophil granules that mediate fungistasis against *Histoplasma capsulatum*. *Infec. Immun.* 2000; 68(19): 5668-5672.
- [16] Kamei, K.; Brummer, E.; Clemons K. and D. Stevens. Induction of stress protein synthesis in *H. capsulatum* heat, low pH and hydrogen peroxide. *J. Med. Vet. Mycol.* 1992; 30: 385-393.
- [17] Newman, S.; Bucher, C.; Rhodes, J. and W. Bullock. Phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* yeasts and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* 1990; 85(1): 223-230.
- [18] Allendörfer, R. and G. Deep. Infection with *Histoplasma capsulatum*: Host-Fungus Interface. *Rev. Iberoam. Micol.* 1998; 15:256-260.
- [19] Gildea, L.; Ciraolo, G.; Morris, R. and S.Newman. Human dendritic cell activity against *Histoplasma capsulatum* is mediated via phagolysosomal fusion. *Infect Immun.* 2005; 73(10):6803 -6811.
- [20] Lin, J.; Yang, C.; Wang, D. and B. Wu-Hsieh. Dendritic cells cross-present exogenous fungal antigens to stimulate a protective CD8 T cell response in infection by *Histoplasma capsulatum*. *J. Immunol.* 2005;174(10):6282-6291.
- [21] Taylor, M.; Espinosa, M.; Iturbe, R.; Rico, B.; Casasola, J. and F. Goodsaid. Evaluation of phagolysosome fusion in acridine orange stained macrophages infect with *Histoplasma capsulatum*. *Clin. Exp. Immunol.* 1989; 75(3): 466-470.
- [22] Eissenberg, L.; Schlesinger, P and W. Goldman. Phagosome-Lysosome fusion in P388D1 macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* J. Exp. Med. 1993; 177: 1605-1611.
- [23] Leon, M.; Zepeda, A.; Olivia, E.; Barrios, R. y M. Taylor. Cinética de Infección de la línea celular de macrófagos J774.2 con *H. capsulatum*: estudio por microscopia electrónica. *Rev. Lat Amer. Microbiol.* 1989; 31: 23-29.
- [24] Taylor, M. y E. Duarte-Escalante. Estrategias del *Histoplasma capsulatum* para evadir los mecanismos citocidas de los macrófagos. *Rev. Invest. Clin.* 1995; 47: 499-506.
- [25] Wolf, J.; Kerchberger, G.; Kobayashi, G.; and R. Little. Modulation of the macrophage oxidative burst by *Histoplasma capsulatum*. *J. Immunol.* 1987; 138 (2): 582-586.
- [26] Schnur, R. and S. Newman. The respiratory burst response to *Histoplasma capsulatum* by human neutrophils. *J. Immunol.* 1990; 144 (12): 4765-4772.
- [27] Brummer, E.; Kurita, N.; Yosihida, S.; Nishimura, K. and M. Miyaji. Fungistatic activity of human neutrophils against *Histoplasma capsulatum*: correlation with phagocytosis. *J. Infect. Dis.* 1991; 164(1): 158-162.
- [28] Newman, S.; Gootee, L. and J. Gabay. Human neutrophil-mediated fungistasis against *Histoplasma capsulatum*. localization of fungistatic activity to the azurophil granules. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 624-631.
- [29] Couto, M.; Liu, L.; Lehrer, R. and T. Ganz. Inhibition of intracellular *Histoplasma capsulatum* replication by murine macrophages that produce human defensin. *Infec. Immunol.* 1994; 62 (6): 2375-2378.
- [30] Brummer, E. and D. Stevens. Effect of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on Macrophage morphology, phagocytosis, and intracellular multiplication of *Histoplasma capsulatum*. *Int. J. Immunopharmacol.* 1994; 16 (2): 171-176.
- [31] Deep, G. and R. Gibbons. recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates the course of pulmonary histoplasmosis in immunocompetent and immunodeficient mice. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2000; 44 (12): 3328-36.
- [32] Brummer, E. and D. Stevens. Antifungal mechanisms of active murine bronchoalveolar and peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 102: 65-67.
- [33] Wu-Hsieh, B. and H. Dexter. Inhibition of growth of *Histoplasma capsulatum* by lymphokine stimulated macrophages. *J. Immunol.* 1984; 132 (5): 2593-2597.
- [34] Lane, T.; Wu-Hsieh, B. and D. Howard. Gamma interferon cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to antihistoplasma state. *Infect Immun.* 1994; 61: 1468-1473.
- [35] Newman, S.; Gootee, L. and R. Morris. Digestion of *Histoplasma capsulatum* yeasts by human macrophages. *J. Immunol.* 1992; 1; 149(9): 3127.
- [36] Zerbe, C. and S. Holland. Disseminated histoplasmosis in persons with interferon-gamma receptor 1 deficiency. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(4):e38-41.
- [37] Fang, F. Perspectives series: host/pathogen interactions. mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.* 1997; 99(12): 2818-2825.
- [38] Nittler, M.; Hocking-Murray, D.; Foo, C. and A. Sil. Identification of *Histoplasma capsulatum* transcripts induced in response to reactive nitrogen species. *Mol. Biol. Cell.* 2005; 16: 4792-4813.
- [39] Morikawa, A.; Koide, N.; Kato, Y.; Sugiyama, T.; Chakravorty, D.; Yoshida, T. and T. Yokochi. Augmentation of nitric oxide production by gamma interferon in mouse vascular endothelial cell line and its modulation by tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide. *Infec. Immun.* 2000; 68(11): 6209-6214.

- [40] Allendörfer, R.; Brunner, G. and G. Deep. Complex Requirements for Nascent and Memory Immunity in Pulmonary Histoplasmosis. *J. Immunol.* 1999; 4: 7389-7396.
- [41] Cain, J. and G. Deep. Interleukin-12 Neutralization Alters Lung Inflammation and Leukocyte Expression of CD80, CD86 and Major Histocompatibility Complex Class II in Mice Infect with *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 2000; 68(4): 2069-2076.
- [42] Eissenberg, L. and W. Goldman. Infection of P388D1 macrophages and respiratory epithelial cell by *Histoplasma capsulatum*: selection of avirulent variants and their potential role in persistent Histoplasmosis. *Infect. Immun* 1991; 59: 1639-46.
- [43] Long, K.; Gomez, F.; Morris, R. and S. Newman. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. *J. Immunol.* 2003; 170: 487-494.
- [44] Newman, S.; Gootee, L.; Bucher, C. and W. Bullock. Inhibition of intracellular growth *Histoplasma capsulatum* yeast cell by cytokine-activated human monocytes and macrophages. *Infect. Immun.* 1991; 59(2): 737-741.
- [45] Strasser, J.; Newman, S.; Ciriola, M.; Morris, R.; Howell, M. and G. Dean. Regulation of the macrophage vacuolar ATPase and phagosome-lysosome fusion by *Histoplasma capsulatum*. *J. Immunol.* 1999; 162: 6148-6154.
- [46] Caldwell, C. and R. Sprouse. Iron and host resistance in Histoplasmosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1982; 125(6): 674-677.
- [47] Timmerman, M. and J. Woods. Ferric reduction is a potential iron acquisition mechanism for *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 1999; 12(67):6403-6407.
- [48] Porta, A. and B. Maresca. Host response and *Histoplasma capsulatum*/ macrophage molecular interactions. *Med. Mycol.* 2000; 38: 399-406.
- [49] Newman SL, Gootee L, Hilty J, Morris RE. Human macrophages do not require phagosome acidification to mediate fungistatic/fungicidal activity against *Histoplasma capsulatum*. *J Immunol.* 2006;176(3):1806-1813.
- [50] De Leo, F.; Allen, L.; Apicella, M. and W. Nauseef. NADPH Oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J. Immunol.* 1999;163: 6732-6740.
- [51] Kurita, N.; Terao, K.; Brummer, E.; Ito, E.; Nishimura, K. and M. Miyaji. Resistance of *Histoplasma capsulatum* to killing by human neutrophils. evasion of oxidative burst and lysosomal-fusion products. *Mycopathologia.* 1991;115: 207-213.
- [52] St-Denis, A.; Caouras, V.; Gervais, F. and A. Descoteaux. Role of protein kinase C- α in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *J. Immunol.* 1999; 163: 5505-5511.