

3

CELULARIDAD DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA) EN LA PARACOCCIDIOIDOMICOSIS EXPERIMENTAL

- Susana Restrepo
- ** Angela M. Tobón
- *** Angela Restrepo

RESUMEN

Para determinar la respuesta celular en la paracoccidiodomicosis murina, se infectaron con conidias viables del *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) y por vía nasal, ratones BALB/c adultos. A partir de la primera semana post-infección y hasta la semana 28, se practicó el LBA a grupos de animales y se estudio la celularidad del mismo. Se encontró que el lavado broncoalveolar de los animales infectados era altamente celular; los macrófagos predominaron en la primera semana, disminuyeron bruscamente en la cuarta para recuperar su posición hasta el final del experimento. Los PMN experimentaron un alza brusca en la cuarta semana y luego estuvieron presentes todo el tiempo concentraciones bajas. Las células gigantes aparecieron tardíamente mientras que los linfocitos variaron muy poco.

Las levaduras del Pb fueron recuperadas de todos los lavados. El 75% de tales levaduras estaban fagocitadas por macrófagos y el 20%, por células gigantes. Los resultados indican que en esta micosis los varios tipos de macrófagos así como los linfocitos, interactúan

-
- Investigadora Asociada de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Profesora de la Universidad de Antioquia y CES. Médica Patóloga.
 - ** Médica Internista.
 - *** Jefe Sección Micología de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).

Separatas: Doctora Angela María Tobón. A.A. 1178 Medellín, Colombia S.A.

secuencialmente en un intento por dominar el germen, el que, sin embargo, escapa a la acción fungicida de tales células. Se establece entonces la enfermedad crónica.

Palabras Clave: Paracoccidiodomicosis experimental, Lavado broncoalveolar, Interacción celular.

SUMMARY

An experimental study was undertaken to determine cell afflux in the lungs of mice intranasally infected with viable *P. brasiliensis* conidia. The cellularity of bronchoalveolar lavage fluids was investigated from the first to the 28th week post-challenge; in comparison with non-infected control animals, the cellularity of the challenged mice was very high all throughout the experimental period. Macrophages predominated during the first week post-infection, diminished abruptly after 4 week but regained and maintained their position after-wards. PMN's experienced a sudden and marked increase at week 4 post challenge but were present in low numbers thereafter. Giant cells were late comers; lymphocytes varied little during the observation period. *P. brasiliensis* was recovered from everyone of the lavage fluids; 75% of the yeast cells were phagocytosed by macrophages and the remaining, by giant cells. The results indicate that macrophages and lymphocytes interact in an effort to control the fungus but fail to do so. This results in the establishment of a chronic disease.

KEY WORDS: Experimental paracoccidiodomycosis, Bronchoalveolar lavage fluid, Cellular interactions.

INTRODUCCION

La PCM es la micosis sistémica más importante en América Latina no solo por su frecuencia sino también por su severidad (24). Estudios clínicos revelan que el 50% de los pacientes con la entidad presentan fibrosis durante el curso de la enfermedad; por estudios de anatomía patológica, esta secuela puede demostrarse hasta en el 90% de los pacientes (24). Se conoce que desde etapas tempranas de la enfermedad pulmonar, ocurren alteraciones en la composición del estroma reticular del intersticio, las que llevan al establecimiento progresivo de la fibrosis característica de esta micosis (22, 24). La fibrosis progresiva del alvéolo, que es la causante de los hallazgos clínicos, radiológicos y fisiológicos, es el resultado de un proceso inflamatorio crónico en el microambiente alveolar (alveolitis) (7, 8), el cual ha sido implicado en la génesis de la fibrosis pulmonar progresiva (11). Se ha demostrado que en tal microambiente existe una interacción estrecha entre los procesos efectores inmunes y entre éstos y otros factores no inmunes (fibroblastos, colagenasas y fibronectina) (11). Gran parte del anterior conocimiento ha sido obtenido mediante estudios realizados con el LBA. Los pacientes con PCM que tienen fibrosis pulmonar, presentan frecuentemente problemas funcionales que van desde disnea leve hasta el cor pulmonale. A pesar de lo anterior tal complicación sólo ha sido estudiada morfológicamente en humanos (24); por su parte, el LBA ha sido practicado en pacientes con la micosis por Nogueira y Boscardin (18), quienes analizaron los hallazgos citológicos y por Gohman-Yahr (9), quien estudió la capacidad fagocítica de las células del LBA provenientes de pacientes con la entidad.

Los anteriores hallazgos promovieron la realización del presente estudio, el cual tuvo por objeto determinar la celularidad del LBA practicado en ratones infectados experimentalmente con conidias de *P. brasiliensis* (Pb).

MATERIALES Y METODOS

Animales: Se emplearon ratones BALB/c, machos y hembras de 6-8 semanas de edad; los animales fueron alimentados con concentrado comercial y agua acidificada *ad libitum*.

Preparación del inóculo de conidias de Pb: Se llevó a cabo de acuerdo con las técnicas ya descritas por nuestro grupo (15).

Inóculo: Se suspendieron 3×10^8 a las seis conidias viables, en 0.05 de solución salina y se administraron por vía nasal, previa anestesia con ketamina intramuscular.

Sacrificio: A partir de la primera semana post-inoculación hasta la semana 28, se sacrificaron 3 ratones de cada sexo para cultivos y LBA.

Cultivos de pulmón: Los animales fueron sacrificados por anestesia profunda inducida con 0.2 ml de pentotal intraperitoneal. Luego se hizo una incisión mediana longitudinal y se extrajeron ambos pulmones. Se separó el pulmón derecho, se pesó y se maceró con 5 ml de solución salina. Esta suspensión fue sometida a diluciones, sembrándose por duplicado 1 ml en el medio de cultivo de Sabouraud modificado. Después de incubación a 23°C por 3 semanas se procedió al recuento de colonias.

Lavado broncoalveolar y preparación de las células: Los ratones (inoculados controles) se sacrificaron por anestesia intraperitoneal. Una vez hecha la disección, se insuflaron los pulmones con 0.5 ml de solución de Hanks, aspirando y recogiendo el material 5 veces; éste se centrifugó en frío (4°C) y se lavaron las células por 3 veces con la solución de Hanks. Seguidamente se contó en cámara de Neubauer el número de células presentes en el lavado y se hizo un extendido por medio de citocentrífuga para el recuento diferencial. El extendido fue coloreado con la técnica de Wright.

Estudio del extendido:

Se revisó el extendido con objetivo de 40 X, un promedio de 864 campos, determinándose la fagocitosis de levaduras por los macrófagos y las células gigantes. Igualmente se determinó el número de levaduras libres. Con objetivo de alto poder (100 X) se enumeraron 200 - 300 células y se hizo el recuento diferencial (macrófagos, polimorfonucleares neutrófilos, eosinófilos y linfocitos, así como células gigantes).

RESULTADOS

Celularidad del Lavado Broncoalveolar:

El LBA de los animales controles (no inoculados) mostró una población total de 0.44×10^6 a la cuatro células, compuesta casi toda por macrófagos (98%). En los animales previamente inoculados con el hongo (Tabla 1), los LBAs tuvieron una celularidad siempre ma-

yor, con aumento notorio (aproximadamente 12×10^6 a la cuatro) entre las 2 y 4 semanas post-inoculación; en los períodos restantes las cifras fueron más bajas, con ligeras fluctuaciones en las semanas 10 y 24.

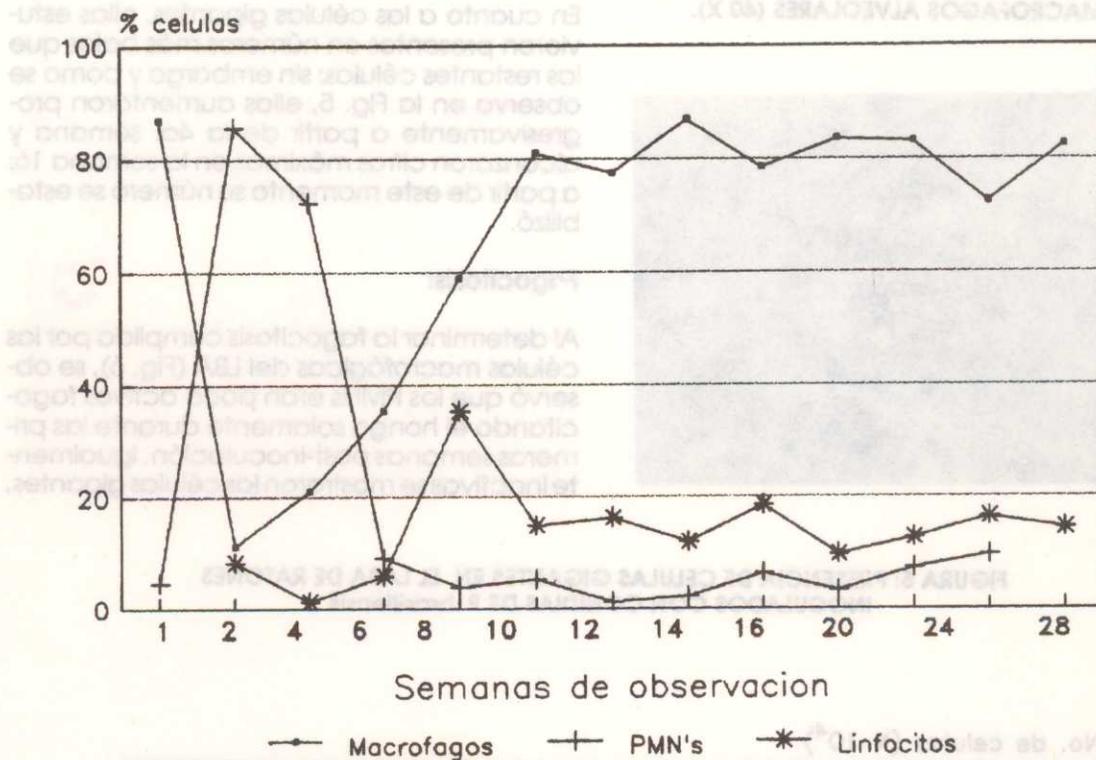
Recuento diferencial de células en el LBA:

Al hacer los recuentos diferenciales se observó que el aumento en la celularidad total anotado para las semanas 2a. y 4a., correspondía al gran aflujo de PMNs los que representaban el 85% de todas las células (Fig. 1). El número de PMNs disminuyó bruscamente a partir de la 5a. semana pero durante el resto del estudio, las cifras correspondientes se mantuvieron bajas. Una imagen contraria se obtuvo con los macrófagos, los que cayeron a partir de la 2a. semana para luego aumentar y mantenerse a niveles altos, cercanos al 80%, por el resto del tiempo. El número de linfocitos experimentó pocos cambios durante el período de estudio, con excepción de un moderado aumento observado en la 6a. semana post-infección.

TABLA 1 : CELULARIDAD DEL LAVADO BRONQUIAL PRACTICADO EN RATONES INFECTADOS CON CONIDIAS DE *P. brasiliensis*

Semanas de observación post-inoculación	No. células obtenidas * ($\times 10^6$)
1	1.97
2	12.10
4	12.32
6	0.95
8	0.68
10	2.29
12	1.66
14	0.78
16	1.00
20	1.98
24	5.1
28	1.23
* Controles sanos	0.44

FIGURA 1: RECUENTO DIFERENCIAL DE LAS CELULAS OBTENIDAS DE LBA DE RATONES INOCULADOS CON CONIDIAS DE P. brasiliensis



Las Figs. 2, 3 y 4 ilustran los cambios en la composición celular durante los varios períodos de estudio.

FIGURA 3: LAVADO BRONCO-ALVEOLAR EN LA 6a. SEMANA POST-INFECCION. ABUNDANCIA DE LINFOCITOS (40 CX)

FIGURA 2: LAVADO BRONCO-ALVEOLAR TOMADO EN LA SEGUNDA SEMANA. PREDOMINIO DE POLIMORFONUCLEARES NEUTROFILOS (40 X).

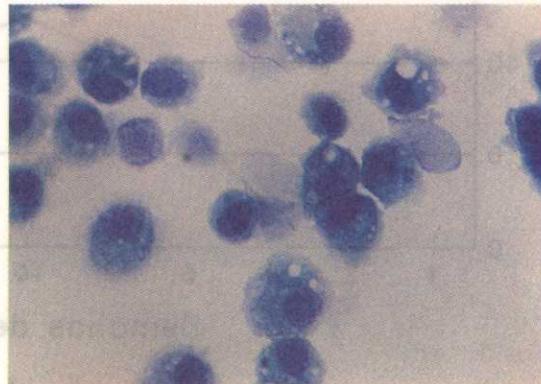
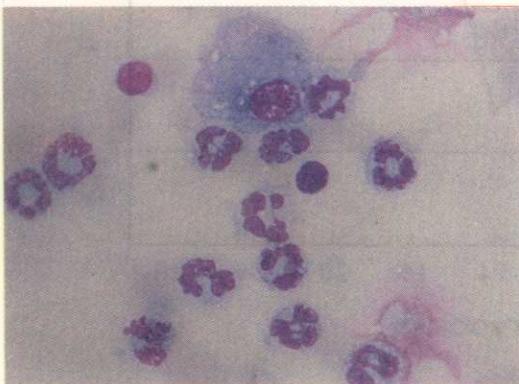
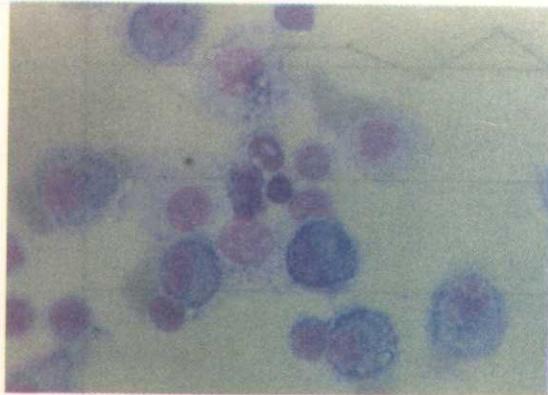


FIGURA 4: LAVADO BRONCO-ALVEOLAR TOMADO EN LA SEMANA 16; HAY PREDOMINIO DE MACROFAGOS ALVEOLARES (40 X).



Presencia de Células Gigantes:

En cuanto a las células gigantes, ellas estuvieron presentes en números más bajos que las restantes células; sin embargo y como se observa en la Fig. 5, ellas aumentaron progresivamente a partir de la 4a. semana y alcanzaron cifras máximas en la semana 16; a partir de este momento su número se estabilizó.

Fagocitosis:

Al determinar la fagocitosis cumplida por las células macrofágicas del LBA (Fig. 6), se observó que los PMNs eran poco activos fagocitando el hongo solamente durante las primeras semanas post-inoculación. Igualmente inactivas se mostraron las células gigantes,

FIGURA 5: PRESENCIA DE CELULAS GIGANTES EN EL LABA DE RATONES INOCULADOS CON CONIDIAS DE *P. brasiliensis*

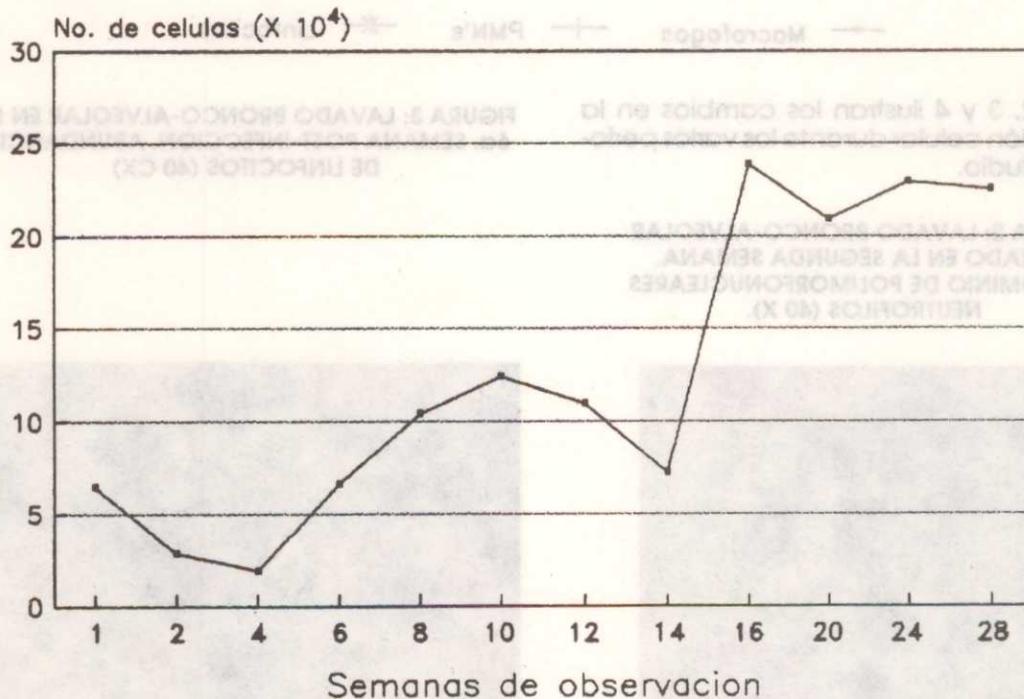
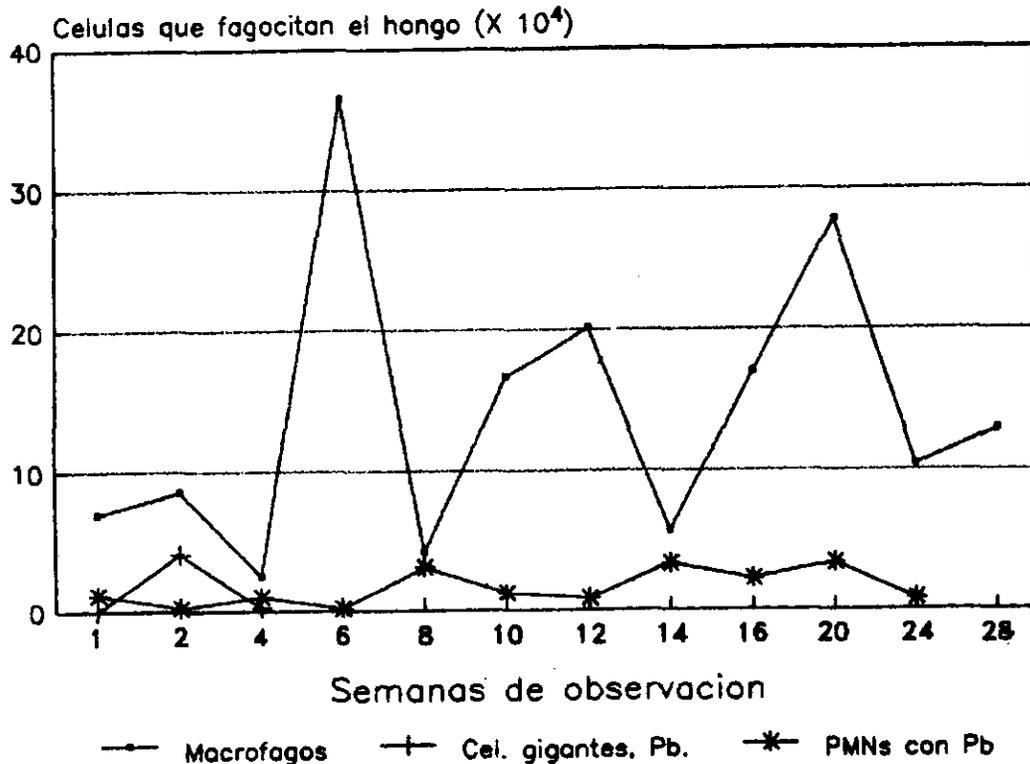


FIGURA 6: FAGOCITOSIS DE *P. brasiliensis* POR LAS CELULAS MACROFAGICAS DEL LBA DE RATONES INOCULADOS CON CONIDIAS DE *P. bras.*



las que, sin embargo, fagocitaron el hongo en forma baja pero sostenida. Por el contrario, los macrófagos desplegaron gran actividad, especialmente durante las semanas 6, 12 y 20.

Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC):

La actividad del proceso infeccioso fue juzgado con base en las UFC obtenidas del pulmón de los ratones infectados. Como se observa en la Tabla 2, el hongo se recuperó durante todo el experimento pero con variaciones de acuerdo con el tiempo post-inoculación. El número de colonias cambió, observándose resultados altos que luego disminuían y volvían a subir, en forma cíclica. El nivel más alto ocurrió en la semana 14 y el mes bajo en la semana 28.

TABLA 2 : UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS A PARTIR DEL PULMON DE RATONES INOCULADOS CON CONIDIAS DE *P. brasiliensis*

Semanas de observación	No. UFC/gr de tejido (X 10 ⁵)
1	63.4
4	87.9
8	19.2
10	14.5
12	60.3
14	105.5
16	23.6
20	94.5
24	29.4
28	10.8

DISCUSION

Los animales control mostraron una población celular compuesta por macrófagos pero no por polimorfonucleares, este hallazgo es similar a lo descrito por otros autores (23).

Con frecuencia se menciona que, a nivel pulmonar, la inflamación tisular es el resultado de un cambio proporcional en las poblaciones celulares propias del alvéolo (6, 12, 26); sin embargo, para poder entender el por qué la alveolitis trae cambios patológicos, es necesario aceptar que el factor decisivo no reside solamente en el aumento en la celularidad, sino en la actividad celular misma (7, 8).

Nuestro estudio reveló una elevada celularidad del LBA en las varias etapas de la PMC experimental; sin embargo el período crítico ocurrió en las primeras 2-4 semanas post-infección, cuando la abundancia de PMNs debió haber llevado a la liberación de factores líticos; este fenómeno podría explicar el descenso marcado de la población de macrófagos observados en la 2a. semana (13). Al no disponer de macrófagos eficientes, el fenómeno inflamatorio del parénquima pulmonar, se vería favorecido. Se ha señalado que tal fenómeno conduce a la fibrosis (10, 13).

Aunque el papel del PMN como causante de injuria pulmonar es motivo de controversia, la salida de mediadores proinflamatorios activos como son los radicales de O₂ y las proteasas de los PMNs activados, podrían causar una injuria inflamatoria (13). Es así como enzimas proteolíticas, producidas por el neutrófilo tales como la elastasa, son capaces de degradar *in vitro* la matriz extracelular (4, 16) y pueden llevar a daño microvascular *in vivo* (4). Igualmente, factores oxidantes derivados del PMN son capaces de causar alteración tisular por ambas vías, peroxidativa y no peroxidativa (4). Los radicales tóxicos de O₂ y la mieloperoxidasa de los neutrófilos pueden, a su vez, potenciar la proteólisis tanto por inactivación de inhibido-

res de proteasas (14), como por inducción de autoactividad de enzimas proteolíticas latentes (27).

La presencia del PMN en el LBA obtenido en las fase inicial de la PCM pulmonar, sugiere que esta célula cumple un papel importante dentro del sistema defensivo del huésped contra la invasión del hongo; sin embargo la eficacia del PMN es cuestionable, ya que su capacidad fagocítica mostró ser pobre, con tan sólo una pequeña elevación en su poder macrófago celular en la 2a. semana post-infección. Esta célula ha demostrado ser poco potente en cuanto a la destrucción del hongo (17); ello parece ser debido a la presencia en la pared de la levadura de un gluco-péptido (alfa 1,3 glucan), adquirido durante la transformación del micelio en levadura, el que impide la destrucción post-fagocitarla dada la ausencia de alfa glucanasas en los PMN (21). De esta forma el hongo escaparía de la primera línea de defensa presentada por el huésped (17).

La presencia del PMN en las etapas iniciales de la enfermedad experimental depende de la activación ejercida por el macrófago alveolar, célula presente en alta proporción en la primera semana post-infección y que tiene la capacidad de producir linfoquinas y otros factores solubles; entre éstos vale la pena mencionar el factor quimiotáctico para los neutrófilos (AMCF), el cual es producido y liberado por macrófagos activados (5, 12). Este factor quimiotáctico no ha sido completamente identificado y su documentación se fundamenta en pruebas indirectas, tales como la migración de PMNs de sangre periférica en presencia del mencionado factor, que ha sido obtenido del LBA de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (11, 12).

El proceso inflamatorio iniciado por el PMN, podría ser incrementado y/o perpetuado por la presencia constante y elevada de macrófagos activados, cuya función estimuladora no está limitada a células con función proplamente inmune sino que, a través de una serie de factores, es capaz de promover

la activación, replicación y movimiento de los fibroblastos (1, 2, 3, 7, 20). Estos factores conocidos como fibronectina y factor de crecimiento derivado del macrófago alveolar (AMDGF), están bien identificados (1, 3, 19, 20). La fibronectina, glicoproteína liberada por el macrófago alveolar activado, actúa como agente quimiotáctico para el fibroblasto, al tiempo que facilita la unión de esta célula con los componentes de la matriz intersticial. En esta forma se inicia la acumulación de productos propios del fibroblasto; entre éstos, el más importante es el colágeno tipo I, que es fácilmente reconocido en el intersticio de pacientes con fibrosis pulmonar (1, 3). La fibronectina actuaría en asociación con los factores de progresión, que promueven la reproducción rápida de las células (1, 3, 20). Es probable que el hongo, presente en todas las etapas de la infección experimental, actúe como antígeno, estimulando persistentemente el sistema inmune y concretamente al linfocito, célula que aunque no se encontró muy elevada, en este estudio sí mostró su pico máximo en la 6a. semana post-infección. Fue en este momento cuando se apreció una elevación importante en el número de macrófagos así como la primera y más alta tasa de fagocitosis por el macrófago (36.4×10 a la cuatro).

Durante el estudio, la actividad del proceso infeccioso fue juzgado con base en las unidades formadoras de colonias (UFC), obtenidas del macerado de pulmón de los ratones infectados con el Pb. El hongo se recuperó en todos los períodos, observándose variaciones cíclicas que no guardaban relación con el porcentaje de células fagocíticas macrofágicas; sin embargo, sí se anotó una concordancia entre el descenso de las UFC y la elevación máxima del número de células gigantes. Esta célula, cuya presencia en el granuloma paracoccidiodomicótico es observada frecuentemente en estudios histológicos (24, 25), se comportó de una manera diferente al resto de las células presentes en el LBA; en efecto, ella fue claramente detectada a partir de la 4a. semana, mostrando su nivel máximo a la semana 16. La tasa de fagocitosis por tal célula fue igual o

superior a la del macrófago. Sin embargo, la disminución en el número de UFC al alcanzarse y sostenerse el nivel máximo de células gigantes en el LBA, parece indicar que estas últimas pueden cumplir una importante función fungicida (4).

No obstante, la interacción inmune-celular no logró esterilizar totalmente el foco infeccioso. La persistencia del estímulo antigénico bien podría resultar en la generación y desarrollo de la fibrosis pulmonar, ya que los intentos de defensa y regeneración por parte del huésped podría llevar, en última instancia, a cambios definitivos en el intersticio pulmonar (7, 8).

El presente estudio sugiere que el LBA tendría gran importancia en pacientes con paracoccidiodomicosis puesto que sería posible seguir la evolución de la fibrosis pulmonar producida durante la micosis y establecer así una correlación entre el tipo de celularidad del LBA y el estadio histológico de la fibrosis pulmonar.

Esta metodología ha demostrado ser importante en el seguimiento de entidades tales como la sarcoidosis y la neumonitis de hipersensibilidad (7, 8, 11, 26), en las que, característicamente se presenta fibrosis pulmonar.

REFERENCIAS

1. Bitterman, P., Rennard, S.I., Hunninghake, G.W., Crystal, R.G. Human alveolar macrophage growth factor for fibroblasts: Regulation partial characterization. *J. Clin. Invest.* 70: 806-822, 1983.
2. Bitterman, P.B., Rennard, S.I., Brendon, A.K., Wewers, M.D., Adelberg, S., Crystal, R.G. Familial idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence of lung inflammation in unaffected family members. *New Engl. J. Med.* 314: 1343-1347, 1986.
3. Bitterman, P.B., Adelberg, S., Crystal, R.G. Mechanisms of pulmonary fibrosis: Spontaneous release of the alveolar macrophage derived growth factor in the interstitial lung disorders. *J. Clin. Invest.* 72: 1801-1813, 1983.

4. Cochrane, C.G., Aikin, B.S. Polymorphonuclear leukocytes in immunologic reactions. Destruction of vascular basement membrane in vivo and in vitro. *J. Exp. Med.* 124: 733-752, 1966.
5. Cramer, E.B., Milgiorisi, G. Pologe, L. Effect of leukotrienes on endothelium and the transendothelial migration of neutrophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 74: 386-390, 1984.
6. Crystal, R. Fulmer, I., Roberts, W.C., Moss, M.L., Line, B.R., Reynolds, H.Y. Idiopathic pulmonary fibrosis: Clinical, histologic, radiographic, scintigraphic, cytologic and biochemical aspects. *Ann. Int. Med.* 85: 769-788, 1976.
7. Crystal, R., Bitterman, P.B., Rennard, S.I., Hance, A.J., Keogh, B.A. Interstitial lung disease of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract (First Part). *New Engl. J. Med.* 310: 154-166, 1984.
8. Crystal, R. Bitterman, P., Rennard, S.I., Hance, A.K., Keogh, B.A. Interstitial lung disease of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract (Second Part). *New Engl. J. Med.* 310: 235-244, 1984.
9. Gohman-Yahr, M., A. Rothenber, E. Avila-Millan, R. Roquete, M. Alvornoz, A. Kahshi et al. Las células fagocitarias. Su funcionamiento en las enfermedades granulomatosas producidas por agentes vivos. El modelo de la paracoccidiodomicosis. *Ciencia Tecnol. Venez.* 2: 193-197, 1985.
10. Haslam, P.L., Turton C.W.G., Heard, B., Lukoszek, A., Collins, J.V., Salisbury, A.J., Turner-Warwick, M. Bronchoalveolar lavage in pulmonary fibrosis: Comparison of cells obtained with lung biopsy and clinical features. *Thorax* 35: 9-18, 1980.
12. Hunninghake, G.W., Gadek, J.E., Lawley, T.J., Crystal, R.G. Mechanism of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 68: 259-269, 1981.
13. James, C., Hoog, D. Neutrophil kinetics and lung injury. *Physiol. Rev.* 67: 1249-1295, 1987.
14. Matherson, N.R., Wong, P.S., Travis, J. Enzymatic inactivation of human alpha-1-antitrypsin inhibitor by neutrophil myeloperoxidase. *Biochemistry. Research Communication.* 88: 402-409, 1979.
15. McEwen, J., Bedoya, V., Patiño, M.M., Salazar, M.E., Restrepo, A. Experimental murine paracoccidiodomycosis induced by the inhalation of conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* 25: 165-175, 1987.
16. McGowan, S.E., Stone, P.J., Snider, G.L. Alveolar macrophage modulation of proteolysis by neutrophil elastase in extracellular matrix. *Am. Rev. Resp. Dis.* 130: 734-739, 1984.
17. Mota, N.G.S., Rezkallah-Iwasso, M.T., Peracoli, M.T.S. Correlation between cell-mediated immunity and clinic forms of paracoccidiodomycosis. *Transact. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 765-772, 1985.
18. Nogueira-Boscardini, R., Brandao, H., Balla, A. Bronchoalveolar lavage in pulmonary paracoccidiodomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 23: 143-146, 1985.
19. Rennard, S., Berg, R., Martin, G. Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components. *Anal. Biochem.* 104: 205-214, 1980.
20. Rennard, S.I., Hunninghake, G.W., Bitterman, P.B., Crystal, R.G. Productions of fibronectin by human alveolar macrophage: Mechanism for recruitments of fibroblast to sites of tissue injury in interstitial lung disease. *Proceed. Nat. Acad. Sci. USA.* 78: 7147-7151, 1981.
21. Restrepo, A. Salazar, M.E., Cano, L.E., Patiño, M.M. A technique to collect and dislodge conidia produced by *Paracoccidiodomycosis brasiliensis* Mycelial form. *J. Med. Vet. Mycol.* 24: 247-250, 1986.
22. Restrepo, A. Paracoccidiodomycosis: Actualización. *Acta Med. Col.* 3: 33-36, 1978.
23. Sugar, A.M., Field, K.G. Characteristics of the pulmonary cellular immune response to two strains of *B. dermatitidis* in the mouse. *Am. Rev. Resp. Dis.* 132: 1319-1323, 1985.
24. Tuder, R.M., Ibrahim, R., Godoy, C. E., de Brito, T. Pathology of the human pulmonary paracoccidiodomycosis. *Mycopathol.* 92: 179-188, 1985.
25. Uribe, F., Zuluaga, A.I., Restrepo, A. Histopathology of cutaneous and mucosal lesions in human paracoccidiodomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo,* 29: 90, 1987.
26. Weinbenger, S.E., Kelman, J.A., Elson, N.A., Young, R.C., Reynolds, H.Y., Fulmer, J.D., Crystal, R.G. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Ann. Int. Med.* 89: 459-466, 1978.
27. Weiss, S.J., Pepin, G., Ortiz, X. Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science* 227: 743-749, 1985.