

# FAGOCITOSIS Y LISIS DE **CANDIDA ALBICANS** Y **CANDIDA PSEUDOTROPICALIS** POR POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS DE PACIENTES HANSENIANOS<sup>1</sup>

Enrique L. FLIESS<sup>2</sup>  
Guillermo COMESANA<sup>3</sup>  
Roberto C. CARRARA<sup>4</sup>  
Alberto ESPAÑA<sup>2</sup>

**RESUMEN** — Se estudió la fagocitosis y lisis de **Candida albicans** y **Candida pseudotropicalis** por polimorfonucleares neutrófilos humanos, en 43 pacientes hansebianos. (19 virchowianos quiescentes, 12 virchowianos reaccionales y 12 tuberculoides quiescentes) y 15 testigos sanos. El propósito de este estudio fué determinar si los polimorfonucleares neutrófilos de pacientes hansebianos presentaban alteraciones de sus sistemas enzimáticos mieloperoxidasa-dependientes (investigado mediante lisis de **Candida albicans**) y mieloperoxidasa-independientes (investigado mediante lisis de **Candida pseudotropicalis**). Los resultados indican que los neutrófilos de los pacientes hansebianos tienen una actividad candidicida similar a la de los neutrófilos de testigos sanos, ( $p > 0.2$ ) en sus sistemas mieloperoxidasa dependiente e independiente. La actividad de estos sistemas enzimáticos es también similar en todas las formas clínicas de hanseiasis ( $p > 0.3$ ).

**Palabras clave:** Fagocitosis. Lisis. **Candida albicans**. **Candida pseudotropicalis**. Neutrófilos.

## 1 INTRODUCCIÓN

La importancia de los polimorfo- nucleares en los mecanismos inmunitarios antimicrobianos reside en la capacidad que poseen para fagocitar y lisar los microorganismos infectantes. A pesar de que todos los fagocitos circulantes (monocitos, neutrófilos, eosinófilos) cumplen dicha función, se acepta que los polimorfonucleares neutrófilos juegan un rol importante como primera barrera de contención de la agresión microbiana<sup>7,21</sup>.

En los últimos años se han realizado numerosos estudios orientados a

explorar las funciones de los polimorfonucleares — quimiotaxis<sup>5</sup>, fagocitosis<sup>17</sup>; metabolismo<sup>18</sup> — a partir de los cuales quedó en claro que el mecanismo bactericida más importante en estas células es el sistema mieloperoxidasa —  $H_2O_2$ — haloide de Klebanoff<sup>17</sup>, efectivo también en la fagocitosis y lisis de partículas virales y hongos; Existen también mecanismos líticos no vinculados al sistema mencionado, conocidos como mieloperoxidasa — independientes<sup>19</sup>.

Diversos autores han estudiado el sistema fagocitario en pacientes hansebianos, especialmente en lo que se re-

- (1) Comunicación presentada al I Congreso de Hansenología das Países Endémicos. Rio de Janeiro (Brasil), 1980. Este trabajo fué subvencionado por subsidio CEFYC 000203/80 otorgado por la Fundación Clínica Privada Colón. Luján (B) Argentina.
- (2) Doctor en Ciencias Médicas. Coordinador Científico del Centro de Estudios Fisiopatológicos y Clínicos (CEFYC), Luján (B). Dirección: Dorronzoro 141 — 6700 Lujan (B) — República Argentina.
- (3) Médico. Sanatorio Nacional "B. Sommer". Gral. Rodríguez, Argentina.
- (4) Bioquímico. CEFYC.

fiere a los monocitos circulantes<sup>3,4,6,11</sup>. Los resultados obtenidos por los mismos respecto a la capacidad lítica de los macrófagos frente al *Mycobacterium leprae* y otros antígenos fueron contradictorios.

Goihman-Yahr *et al.*<sup>12,14</sup> observaron incremento de la capacidad reductora del Nitroblue — Tetrazolio (NBT) (vinculada al sistema mieloperoxidasa) en los polimorfonucleares neutrófilos de pacientes con hanseniasis virchowiana reaccional, en tanto que otros autores han hecho referencia a la acción de la diamino-difenilsulfona sobre la capacidad citotóxica de los neutrófilos<sup>23</sup>.

El presente trabajo se orienta a determinar la existencia o no de alteraciones en los sistemas enzimáticos mieloperoxidasa-dependiente y mieloperoxidasa-independiente de los neutrófilos de pacientes hansenianos, de acuerdo a la capacidad que presentan los mismos para lisar cepas de *Candida albicans* y *Candida pseudotropicalis*, respectivamente.

## 2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Pacientes estudiados

Fueron estudiados 43 pacientes hansenianos (19 virchowianos quiescentes; 12 virchowianos reaccionales y 12 tuberculoides quiescentes) en tratamiento en el Sanatorio Nacional "B. Sommer", de General Rodríguez, República Argentina. Los mismos fueron diagnosticados y clasificados por medios clínicos, histopatológicos, bacteriológicos e inmunológicos. Todos los pacientes quiescentes se encontraban bafo tratamiento sulfónico en el momento de efectuado el estudio, en tanto que los pacientes reaccionales recibían también Talidomida. Como grupo control fueron estudiados 15 individuos Banos, no contactantes con pacientes hansenianos, sin infecciones bacterianas, virales o micóticas en curso en el momento del estudio.

### 2.2 Levaduras utilizadas

Las cepas de *Candida albicans* utilizadas en este estudio fueron desarrolladas en el laboratorio del Centro de Estudios Fisiopatológicos y Clínicos (CEFYC) de Luján (B), República Argentina. La de *Candida pseudotropicalis* provino del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de París, y fué conservada por sucesivos repiques en el CEFYC. Ambas cepas fueron cultivadas en medio de Sabouraud a 37° durante 24 hs. y resuspendidas en medio TC 199 (Grand Island Biological Co., Grand Island, New York, USA) en una concentración de  $1 \times 10^8$ /ml, con adición de 0.1 ml de suero humano AB rH positivo.

### 2.3 Fagocitosis y lisis

La técnica utilizada fué la descripta por Giuntoli *et al.*<sup>10</sup>. La misma se basa en la propiedad que presentan los polimorfonucleares de adherir al vidrio y en la capacidad de tomar la coloración<sup>16</sup> de Giemsa presentada por las Candidas fagocitadas pero no destruidas, en tanto que las lisadas no toman dicha coloración<sup>18</sup>. Los leucocitos obtenidos por punción venosa fueron incubados sobre portaobjetos de vidrio en contacto con las suspensiones de *Candida albicans* durante una hora en atmósfera húmeda a 37°C, y coloreados inmediatamente con Giemsa.

Para evaluar la fagocitosis se determina el número de levaduras fagocitadas por 100 neutrófilos. La lisis de las Candidas fué expresada como el porcentaje de candidas lisadas (imagen fantasma) en relación a las que fueron fagocitadas.

## 3 RESULTADOS

Los resultados se expresan en las tablas 1 y 2. El análisis estadístico de los mismos se efectuó aplicando el test de la varianza, concluyéndose que no existen diferencias significativas entre

TABLA 1 — Número de levaduras fagocitadas cada 100-neutrófilos

GRUPO	<i>C. albicans</i>	<i>C. pseudotropicalis</i>
Virchowianos quiescentes (N = 19)	$\bar{X} = 183 \pm 24$ XM = 254 Xm = 141	$\bar{X} = 180 \pm 28$ XM = 225 Xm = 138
Virchowianos reaccionales (N = 12)	$\bar{X} = 196 \pm 29$ XM = 231 Xm = 130	$\bar{X} = 186 \pm 20$ XM = 209 Xm = 146
Tuberculoides (N = 12)	$\bar{X} = 174 \pm 22$ XM = 204 Xm = 148	$\bar{X} = 177 \pm 19$ XM = 209 Xm = 148
Testigos sanos (N = 15)	$\bar{X} = 183 \pm 31$ XM = 254 Xm = 140	$\bar{X} = 182 \pm 31$ XM = 232 Xm = 133

TABLA 2 — Porcentaje de levaduras lisadas por neutrófilos

GRUPO	<i>C. albicans</i>	<i>C. pseudotropicalis</i>
Virchowianos quiescentes (N = 19)	$\bar{X} = 27\% \pm 4$ XM = 33% Xm = 20%	$\bar{X} = 24\% \pm 5$ XM = 34% Xm = 16%
Virchowianos reaccionales (N = 12)	$\bar{X} = 28\% \pm 4$ XM = 34% Xm = 23%	$\bar{X} = 25\% \pm 4$ XM = 31% Xm = 20%
Tuberculoides (N = 12)	$\bar{X} = 26\% \pm 4$ XM = 31% Xm = 20%	$\bar{X} = 24\% \pm 3$ XM = 31% Xm = 19%
Testigos sanos (N = 15)	$\bar{X} = 27\% \pm 5$ XM = 33% Xm = 20%	$\bar{X} = 25\% \pm 4$ XM = 30% Xm = 15%

la actividad fagocitaria y lítica de los neutrófilos de pacientes hansenianos y de testigos canos ( $p > 0.2$ ) así como entre los distintos grupos de pacientes estudiados ( $p > 0.3$ ), tanto para la *C. albicans* como para la *C. pseudotropicalis*.

#### 4 DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos en este trabajo se desprende que la capacidad fagocitaria y lítica de los polimorfonucleares neutrófilos frente a *C. albicans* y *C. pseudotropicalis* es similar en los pacientes hansenianos y en los individuos sapos.

Coincidiendo con lo observado por Gohman-Yahr et al.<sup>13, 15</sup> mediante otras técnicas, no parece haber incidencia de la diamino-difenilsulfona y la talidomida en el mecanismo enzimático de los polimorfonucleares, contrastando con lo descrito por otros autores en referencia a los macrófagos<sup>1,3</sup>.

La capacidad de los neutrófilos de pacientes hansenianos para lisar *C. albicans* fué referida anteriormente por

Drutz & Cline<sup>6</sup>, y se ve confirmada con el presente estudio. Estévez et al.<sup>9</sup> refieren una alteración de los mecanismos mieloperoxidasa — independientes en los monocitos de pacientes hansenianos, expresada por la disminución de la lisis de *C. pseudotropicalis*. Los resultados antes expuestos parecen indicar que dicha alteración no se halla presente en los polimorfonucleares. Por lo tanto, de existir algún compromiso del sistema fagocitario en pacientes hansenianos, el mismo residiría en la función macrofágica. Esto coincidiría con el rol preponderante adjudicado por otros autores<sup>22</sup> a los mononucleares en los mecanismos defensivos frente a infecciones micóticas. Una prioridad similar de los macrófagos pareciera existir en las infecciones micobacterianas<sup>20</sup>, tanto desde el punto de vista de procesamiento del antígeno como en su presentación al linfocito T<sup>9</sup>. Todo esto otorga coherencia a la existencia de una alteración inmunológica específica frente al *M. leprae*, junto a una adecuada capacidad fagocitaria y lítica de los polimorfonucleares neutrófilos.

ABSTRACT — The phagocytosis and lysis of **Candida albicans** and **Candida pseudotropicalis** by human neutrophils were examined in 43 hanseniasis patients (19 quiescent virchowians, 12 reactional virchowians and 12 tuberculoid patients) and 15 healthy subjects. The purpose of this study was to determine whether neutrophils from hanseniasis patients were altered in their enzyme systems myeloperoxidase-dependent (tested by lysis of *Candida albicans*) and myeloperoxidase-independent (tested by lysis of *Candida pseudotropicalis*). The results indicate that polymorphonuclear neutrophils of hanseniasis patients had a similar candidacidal activity that human normal neutrophils ( $p > 0.2$ ) in their myeloperoxidase-dependent and myeloperoxidase-independent systems. The enzymatic system activity is also similar in all the clinical forms of hanseniasis ( $p > 0.3$ ).

**Key words:** Phagocytosis. Lysis. **Candida albicans**. **Candida pseudotropicalis**. Neutrophils.

#### REFERENCIAS

- 1 ABALOS, R.M.; TOLENTINO, J.G.; BUSTILLO, C.C. Histochemical study of *Erythema Nodosum Leprosum* (ENL) lesions. Int. J. Lepr., 42(4) : 385-391, 1974.
- 2 BARBIERI, T.A. & CORREA, W.M. Human macrophage culture: the leprosy prognostic test (LPT). Int. J. Lepr., 85(3):377-381, 1967.
- 3 BARRANCO, V.P. Inhibition of lysosomal enzymes by dapsone. Arch. Dermatol., 110(4) :563-566, 1974.

- 4 BEIGUELMAN, B. Fate of *Mycobacterium leprae* in macrophages. *Int. J. Lepr.*, 89(4) :896-897, 1971.
- 5 BOYDEM, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, 116:463-466, 1962.
- 6 DRUTZ, D.J. & CLINE, M.J. Polymorphonuclear leukocyte and macrophage function in leprosy. *int. J. Lepr.*, 88(3):362-363, 1970.
- 7 ESTEVEZ, M.E. & SEN, L. Capacidad funcional de los monocitos humanos normales: una simple técnica para su exploración. *Sangre*, 28:870-876, 1978.
- 8 ESTEVEZ, M.E.; SEN, L.; VALDEZ, R.; BALISA, L.M. Defective blood mononuclear phagocyte function in patients with leprosy. *Int. J. Lepr.*, 47(4) :575-579, 1979.
- 9 FLIESS, E.L. Posible origen de la inmunodeficiencia en la hanseniasis virchowiana. *Hansen. Int.*, 3(2) :141-150, 1978.
- 10 GIUNTOLI, J.; ESTEVEZ, M.E.; SEN, L.; PESTALVER, J. Deficiencia funcional de los polimorfonucleares en los enfermos con Talasemia myor. *Medicina*, 88:836-836, 1978.
- 11 GODAL, T. & REES, R.J.W. Fate of *Mycobacterium leprae* in macrophages of patients with lepromatous or tuberculoid leprosy. *Int. J. Lepr.*, 38 (4) :439-441, 1970.
- 12 GOIHMAN-YAHR, M.; CONVIT, J.; RODRIGUEZ OCHOA, G. N.B.T. test in lepromatous leprosy. *Lancet*. 2(7826) :456-457, 1973.
- 13 GOIHMAN-YAHR, M.; CONVIT, J.; RODRIGUEZ OCHOA, G.; ARANZAZU, N.; VILLALBA PIMENTEL, L.; OCANTO, A.; GOMEZ, M.E. Significance of neutrophil activation in reactional lepromatous leprosy: effects of thalidomide *in vivo* and *in vitro* Activation in adjuvant disease. *Int. Arch Allerg. Appl. Immunol.*, 57:317-332, 1978.
- 14 GOIHMAN-YAHR, M.; RODRIGUEZ OCHOA, G.; ARANZAZU, N.; CONVIT, J. Polymorphonuclear activation in leprosy. I. Spontaneous and endotoxin-stimulated reduction of nitroblue tetrazolium: effects of serum and plasma on endotoxin-induced activation. *Clin. Exp. Immunol.*, 20: 257-264, 1975.
- 16 GOIHMAN-YAHR, M.; RODRIGUEZ OCHOA, G.; ARANZAZU, N.; PINARDI, M.E.; GOMEZ, M.E.; OCANTO, A.; CONVIT, J. *In vitro* activation of neutrophils by suspensions of *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr.*, 47(4) :570-574, 1979.
- 16 GOLDE, D.W.; TERRITO, M.; FINLEY, T.N.; CLINE, M.J. Defective lung macrophages in pulmonary alveolar proteinosis. *Ann. Intern. Med.*, 85: 304-309, 1976.
- 17 KLEBANOFF, S.J. & HAMON, C.B. Role of myeloperoxidase mediated antimicrobial systems in intact leukocytes. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 12:170-174, 1972.
- 18 LACE, J.K.; TAN, J.S.; WATANABUNAKORN, C. An appraisal of the nitroblue tetrazolium reduction test. *Am. J. Med.*, 58:686-694, 1975.
- 19 LEHRER, R.I. Measurement of candidacidal activity of specific leukocyte types in mixed cell populations. I. Normal, myeloperoxidase-deficient and chronic granulomatous disease neutrophils. *Infect. Immun.*, 2:42-47, 1970.
- 20 MIRANDA, R.N. Celula ativa fagocitária da lepra. *Pub. Cent. Eat. Leprol.*, 16 (1) :70-73, 1976.
- 21 PETERSON, P.K.P.; VERHOEF, D.; SCHMELING, D.; QUIE, P.G. Kinetics of phagocytosis and bacterial killing by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Infect. Dis.*, 186:602-609, 1977.
- 22 SCHUIT, K.E. Phagocytosis and intracellular killing of pathogenic yeasts by human monocytes and neutrophils. *Infect. Immun.*, 24(3) :932-938, 1979.
- 23 STENDAHL, O.; MOLIN, L.; DAHLGREN, G. The inhibition of polymorphonuclear leukocyte cytotoxicity by dapsone. *J. Clin. Invest.*, 62:2142-20, 1978.