

# Conocimiento Actual de la Fagocitosis de *Histoplasma Capsulatum*

María Lucia Taylor, Blanca Rico Galindo, María Estela León Islas  
Facultad de Medicina, UNAM

## Resumen

*La histoplasmosis, por ser una parasitosis intracelular preferencial del sistema fagocítico mononuclear, constituye un modelo útil para el estudio del proceso fagocítico.*

*En este trabajo se revisan los resultados de la interacción fagocito/*Histoplasma capsulatum*, agente etiológico de la histoplasmosis, tanto en seres humanos como en animales. Además, se plantean las bases actuales del conocimiento de la fagocitosis de *Histoplasma* y se sugieren posibles investigaciones futuras sobre el comportamiento de la fagocitosis de este hongo.*

## Summary

*The histoplasmosis infection constitutes a useful model to study the phagocytic process due to its characteristic of intracellular parasitosis and its affinity for the phagocytic mononuclear system.*

*The results of the interaction between phagocytes and the etiological agent of histoplasmosis, the fungus *Histoplasma capsulatum*, are reviewed both in humans and in animals. Furthermore, the basic knowledge concerning *Histoplasma* phagocytosis is presented, and possible further research lines regarding the fungal phagocytic behaviour are suggested.*

En México, la histoplasmosis es un padecimiento que se presenta principalmente en zonas mineras productoras de oro y plata, donde el agente etiológico, el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, encuentra un medio adecuado para crecer en su forma infectante. Constituye uno de los prototipos más importantes de infecciones por hongos, y se caracteriza por la ubicación intracelular del parásito en las células del sistema fagocítico mononuclear.

La mayoría de las veces la infección tiene un curso clínico benigno, sin embargo, en hospederos susceptibles se establece y da origen a formas clínicas más graves produciendo con frecuencia la muerte. La susceptibilidad del hospedero se ha relacionado con alteraciones de la respuesta inmune, como inmunosupresiones o fallas en la actividad fagocítica. La virulencia de este parásito se asocia a su capacidad de sobrevivencia y multiplicación dentro de los fagocitos, particularmente en los macrófagos. Por ello, resulta de interés el estudio del proceso fagocítico representado por el binomio macrófago/*Histoplasma*, considerando que este fenómeno no es aislado y que depende del funcionamiento óptimo de la respuesta inmune.

Con el propósito de analizar y proponer nuevas investigaciones en este campo, se presenta la información existente sobre la fagocitosis del *Histoplasma capsulatum*.

## Participación de Polimorfonucleares (PMN)

Aunque no está claro el papel de los PMN en el proceso infeccioso producido por *Histoplasma*<sup>13</sup>, se ha observado que el sistema oxidativo de la mieloperoxidasa (MPO) tiene un efecto letal sobre las conidiosporas y las blastosporas de *H. capsulatum* y que la acción de esta enzima es más crítica sobre las blastosporas que sobre las conidias<sup>17</sup>.

Las proteínas catiónicas de los PMN también tienen efecto fungicida sobre *H. capsulatum*<sup>15, 18</sup>. Se ha aislado de los extractos de neutrófilos humanos por lo menos tres proteínas con acción anti-*Histoplasma*. Se desconoce el efecto de estas proteínas y se plantea que entran a los macrófagos y se dirigen al fagolisosoma<sup>18</sup>. Se ha especulado que las proteínas catiónicas y otras sustancias anti-fúngicas puedan adherirse a las levaduras de *H. capsulatum* favoreciendo su destrucción después de haber sido fagocitadas, o bien que estas sustancias puedan ser fagocitadas por los macrófagos e incorporadas después a los fagolisosomas<sup>18</sup>.

Otra enzima estudiada por su acción antifúngica es la lisozima, cuyo efecto no ha sido demostrado en esporas de *H. capsulatum*<sup>18</sup>.

### Participación de Macrófagos.

La importancia de los macrófagos en la infección histoplasmosa se evidencia administrando sílice, un agente tóxico para macrófagos, que aumenta la gravedad del cuadro infeccioso promoviendo la diseminación del hongo en ratones infectados<sup>30</sup>. Se conoce que existen variaciones en el comportamiento antifúngico de los macrófagos, dependiendo de su procedencia: animales normales o infectados; diferentes especies; distintas localizaciones (alveolares, peritoneales, circulantes, etcétera). Se ha visto que la estancia intrafagocítica inhibe la síntesis de proteínas de *Histoplasma*<sup>19</sup>. Se ha observado que los extractos lisosomales de macrófagos alveolares de conejo son capaces de inhibir el crecimiento y la síntesis de proteínas del hongo<sup>2</sup>. Se propone que este efecto involucra la inhibición selectiva del transporte de aminoácidos a través de la membrana de la célula fúngica, debido a alteraciones en la permeasa general y en las permeasas específicas de varios aminoácidos<sup>2</sup>. Con respecto a diferencias de especie, existen estudios en macrófagos alveolares de conejo<sup>2</sup>, así como en histiocitos de ranas y de ratones normales<sup>12</sup>, donde se ha determinado la ausencia de muerte del hongo en condiciones intramacrofágicas y su tiempo de generación intracelular, el cual es de 11-24 hrs a temperatura de 25-37°C<sup>10-12</sup>.

### Interacción Linfocitos T - Macrófagos.

El destino de las levaduras de *H. capsulatum* en los macrófagos de animales inmunizados fue inicialmente descrito por Hill y Marcus<sup>8</sup>, quienes encontraron una inhibición del crecimiento de *Histoplasma*. Calderone y Peterson<sup>2</sup> y Howard<sup>14-16</sup> observaron que los macrófagos de ratones normales, cultivados en presencia de linfocitos obtenidos del exudado peritoneal de ratones inmunizados con dosis subletales de *Histoplasma*, eran capaces de inhibir el crecimiento del hongo. En otra serie de experimentos, WuHsieh y Howard<sup>32</sup> lograron activar macrófagos de animales normales con linfocinas obtenidas de linfocitos de animales inmunizados con *Histoplasma*, de mostrando ausencia del crecimiento intramacrofágico del hongo. Finalmente estos autores, a partir de linfocinas obtenidas de un hibridoma de células T, identificaron al interferón gamma como una de las linfocinas más eficaces en la activación de los macrófagos, capacitándolos para eliminar al *Histoplasma*<sup>21,33</sup>. Estas observaciones apoyan el papel de la interacción linfocitos T - macrófagos en la respuesta inmune celular contra la histoplasmosis.

Existen dudas acerca del funcionamiento de esta interacción, así como de los cambios moleculares y fisiológicos que sufren el fagocito y el parásito. ¿Por qué hay restricción del crecimiento del parásito pero no muerte intracelular? ¿Cuáles son los componentes del hongo que influyen en los distintos pasos de su fagocitosis? Algunos datos sobre la fagocitosis de *Histoplasma* están relacionados con estos problemas básicos. Sánchez y Carbonell<sup>28</sup> encontraron que los macrófagos de animales normales e inmunes fagocitan mejor las levaduras del hongo que los protoplastos de éstas, lo cual sugiere una participación de la pared celular en la estimulación fagocítica.

En la actualidad no ha sido identificada la presencia de componentes o productos del hongo capaces de promover alteraciones directas o indirectas en las células, tejidos u órganos del hospedero, sin embargo, es posible que algunos componentes y/o estructuras del parásito desempeñen un papel en el reconocimiento y la activación de sistemas propios del hospedero.

### Virulencia y fagocitosis.

Howard<sup>15,17</sup> determinó niveles de catalasa en cepas de *Histoplasma* y estableció una relación entre virulencia y niveles de la enzima, sugiriendo que el parásito podría escapar de la muerte intrafagocítica, de manera semejante a como ocurre con el *Staphylococcus aureus*. No obstante, las determinaciones de niveles de catalasa fueron muy contradictorias en las cepas de *Histoplasma* con diferentes grados de virulencia<sup>18</sup>, razón por la cual este parámetro no se considera útil para definir su patogenicidad.

En hongos, particularmente en la histoplasmosis, se ha planteado que la capacidad de defensa del hospedero y el grado de patogenicidad de la cepa dependen del tiempo de transformación de la fase micelial a la fase levaduriforme en el interior de las células fagocíticas. Todo indica que esta conversión dimórfica *in vivo* desempeña un papel crítico en la resolución de la infección, puesto que la fase micelial es más fácilmente eliminada. Este planteamiento se fundamenta en el estudio de Kimberlin *et al.*<sup>23</sup>, quienes encontraron que la conversión de la fase micelial a la levadura empieza a las 7 hrs y se completa a las 72 hrs de incubación a 37°C en macrófagos alveolares de ratones.

Interesados en la fagocitosis de *Histoplasma* desarrollamos una serie de investigaciones en el laboratorio. Establecimos las condiciones óptimas de infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratones normales de

la cepa singénica BALB/c utilizando células levaduriformes del hongo, y caracterizamos la dosis resolutive y no resolutive de la infección<sup>29</sup>. Estudiamos el fenómeno por microscopía electrónica de transmisión y los resultados señalaron que en los primeros tiempos de infección existen pocas células del hongo dentro de los macrófagos, mientras que en los tiempos más largos, de 3 a 24 hrs, los macrófagos tienen mayor cantidad de parásitos en su interior<sup>29</sup>. El marcaje con isotiocianato de fluoresceína de *Histoplasma* y de *Mycobacterium tuberculosis*, utilizando este último como cepa de referencia, durante una infección continua por 24 hrs, mostró la presencia del hongo en todos los tiempos de infección, en tanto que la cantidad de *Mycobacterium* fue escasa; esto sugiere una ingestión más rápida de este microorganismo, debido al apagamiento de su fluorescencia una vez ingerido el parásito. Estos datos apoyan el planteamiento de que la ingestión de *Histoplasma* es más lenta que la de *Mycobacterium*. Los estudios con microscopía electrónica de transmisión y barrido (Fig. 1) confirman estos hallazgos. En este trabajo se utilizó la línea celular de macrófagos J774.2 sincronizando la infección a 40°C por 1 h, lo cual permite la adherencia de las levaduras del hongo y uniforma el número de partículas a ser ingeridas. Los resultados obtenidos indican que la óptima internalización del hongo se

lleva a cabo en un período de 15 a 30 min y que aun a los 60 min existen levaduras adheridas en la membrana de los macrófagos; además, la capacidad de adherir o internalizar levaduras es independiente de la dosis de hongo utilizada<sup>24</sup>.

### Unión Fagosoma-Lisosoma

Dada la capacidad de sobrevivir dentro del macrófago y considerando que desconocemos los mecanismos de escape del *Histoplasma*, planteamos investigar la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma, que es común en otros microorganismos intracelulares como *Coccidioides immitis*, *Nocardia asteroides*, *Chlamydia psittaci*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Toxoplasma gondii*<sup>1,3,6,7,22</sup>. En un trabajo previo, Dumont y Robert<sup>4</sup>, inoculando intraperitonealmente levaduras del hongo en hamsters, observaron por microscopía electrónica que a los 5 y 30 min después de la infección ya se identifican fusiones de fagosomas y lisosomas; a medida que avanza el tiempo de infección las fusiones disminuyen. En tiempos más largos de infección identificaron dos tipos de vacuolas fagocíticas, unas que carecen de fosfatasa ácida, lo que indica ausencia de fusión fagolisosomal, y otras que contienen esta enzima, lo que sugiere la fusión. La observación de

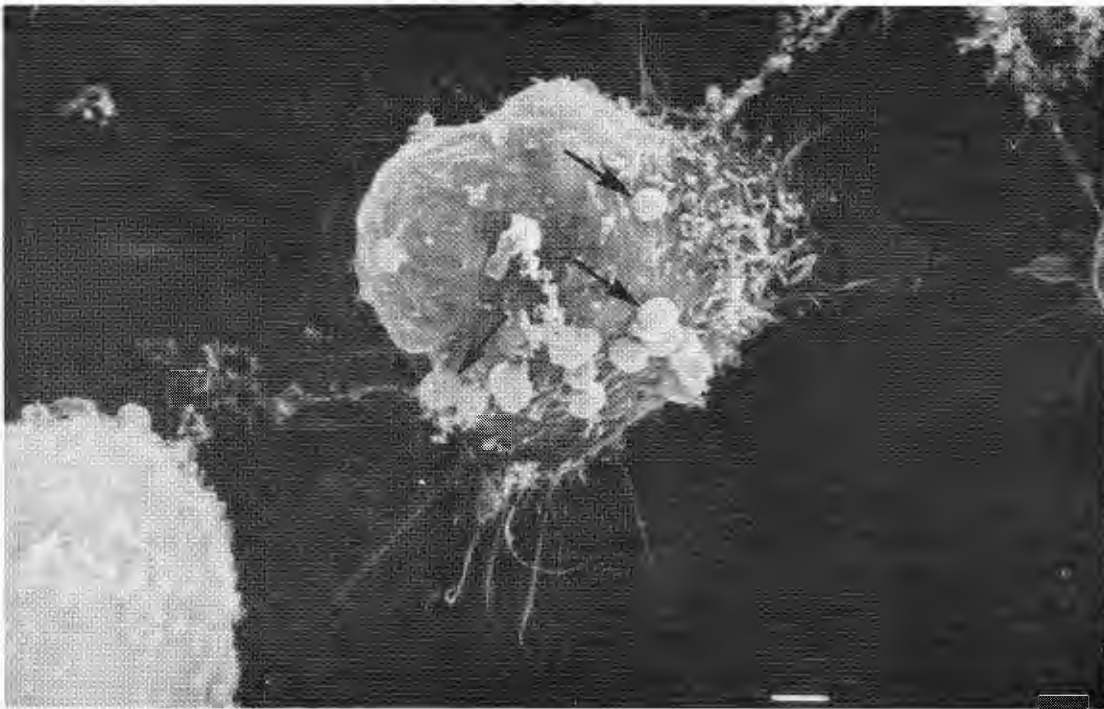


Fig. 1. Fotomicrografía de macrófagos de la línea celular J774.2 infectados con *H. capsulatum* en un tiempo de fagocitosis de 15 minutos. Se utilizó una dosis de  $5 \times 10^7$  levaduras/  $1 \times 10^6$  macrófagos. La barra representa 1 micra. Las flechas indican levaduras adheridas. Fotografía tomada por la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina, U.N.A.M.

estos últimos fagosomas les permitió proponer que la enzima proviene de fagocitos alterados que fueron fagocitados junto con el hongo, y que por lo tanto, la mayoría de los hongos se multiplican dentro de los fagosomas y son continuamente refagocitados. Estos hechos dejan entre dicho la fusión fagosoma-lisosoma en macrófagos infectados con *H. capsulatum*. El destino del hongo en estas células no es su destrucción; hay datos que confirman su sobrevivencia y multiplicación en tales circunstancias. Estos hallazgos sugieren que el mecanismo de inhibición de la fusión fagolisosomal pudiera estar operando cuando la infección no se resuelve.

Nuestros resultados, utilizando el marcaje de lisosomas de macrófagos con naranja de acridina, muestran fusiones fagosoma-lisosoma en macrófagos peritoneales de ratones infectados con el hongo<sup>5</sup>. Sin embargo, el índice de fusión es menor a medida que aumenta la dosis y el tiempo de infección. Al utilizar la línea celular de macrófagos J774.2, encontramos una marcada diferencia en la frecuencia de fusión fagolisosomal con respecto a las células vivas y muertas de *Histoplasma*, mientras que los experimentos realizados con cepas de *Histoplasma* de distinta virulencia no mostraron diferencias en el comportamiento de ambas cepas con respecto a la promoción de fusiones fagolisomales<sup>5</sup>.

Patiño *et al.*<sup>27</sup>, utilizando levaduras de *Histoplasma* opsonizadas y siguiendo el destino del hongo marcado por la técnica de inmunoperoxidasa, encontraron que después de 6 hrs de fagocitosis había liberación de antígeno de pared en el interior de los fagolisomas, el cual parecía estar asociado a la membrana de los fagolisomas. Sin embargo, los autores utilizaron una dosis muy baja de infección, razón que justifica la presencia de fusiones.

Recientemente, Von Behren *et al.*<sup>31</sup>, plantearon que la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma no es un factor primario para la sobrevivencia de *Histoplasma capsulatum* dentro del macrófago. Empleando macrófagos peritoneales de ratón tratados con naranja de acridina encontraron un 41% de inhibición de la fusión para levaduras vivas y 81% para levaduras muertas, mientras que por microscopía electrónica, utilizando el marcaje del lisosoma con fosfatasa ácida, los resultados fueron antagónicos a los encontrados con naranja de acridina. Estos autores se apoyan en los resultados de microscopía electrónica para sugerir la ausencia de inhibición de fusiones fagolisomales en macrófagos infectados con *Histoplasma*, pero hay que tomar en cuenta que esta técnica y la utilización de una población heterogénea de macrófagos, como los

peritoneales, tienen limitaciones similares a las descritas por Dumont y Robert<sup>4</sup>, quienes observaron que muchas de las fusiones procedían de macrófagos parasitados que habían sido refagocitados.

### Receptores y Fagocitosis de Histoplasma.

La información acerca de la facilitación del proceso fagocítico de *Histoplasma* por agentes opsonizantes es contradictoria. Se ha descrito que el anticuerpo específico no tiene efecto en la ingestión y en la digestión intracelular del parásito<sup>8</sup>. Sin embargo, Holland<sup>9</sup> ha observado que los neutrófilos y monocitos humanos requieren de factores séricos para ingerir y matar levaduras de *H. capsulatum*. Además se ha encontrado que los anticuerpos anti-pared incrementan la ingestión de levaduras del hongo<sup>28</sup> y también se ha visto que *H. capsulatum* es capaz de activar la vía alterna del complemento<sup>26</sup>, hecho que podría comprometer receptores para C3b en la fagocitosis del hongo.

Nuestro grupo de investigación ha estudiado los cambios que ocurren en los receptores de la membrana celular de los macrófagos durante diferentes tiempos de fagocitosis del hongo opsonizado con IgG anti-*Histoplasma*, observando una cinética de internalización distinta a la del hongo sin opsonizar, lo que sugiere la importancia de los receptores para Fc de estas inmunoglobulinas (Fig. 2). El trabajo se realizó con macrófagos de la línea celular J774.2, estudiando la presencia de receptores Fc en los diferentes tiempos de fagocitosis del hongo mediante 3 técnicas distintas: marcaje de las proteínas de membrana del macrófago con <sup>125</sup>I, ELISA indirecta utilizando una IgM anti-IgG acoplada a la peroxidasa y formación de rosetas para eritrocitos de carnero cubiertos con hemolisina<sup>27</sup>.

En vista de las grandes incógnitas que aun quedan por resolver en el campo de la fagocitosis de este hongo, consideramos que en la actualidad los estudios deben perseguir los siguientes objetivos:

- 1) identificar los receptores que participan en el fenómeno fagocítico y determinar el papel que juega cada uno de ellos; 2) identificar el papel que juega el complemento; 3) diseñar experimentos de fagocitosis empleando la forma infectante del hongo (fase micelial) y así poder observar la velocidad y las condiciones necesarias para la transformación del hongo a la fase levaduriforme y<sup>4</sup> realizar experimentos *in vivo* que permitan comprobar la existencia de los fenómenos observados *in vitro* para poder extrapolar los resultados a la infección histoplas-

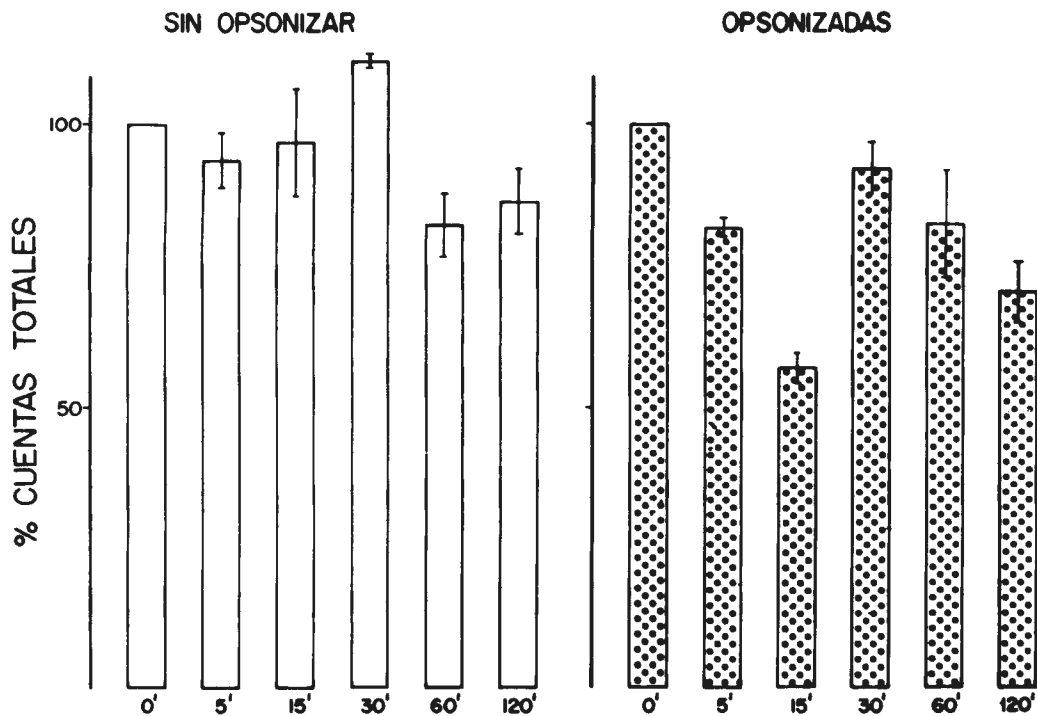


Fig. 2. Cuentas totales de las proteínas membranales de los macrófagos marcados con  $^{125}$ I por la técnica de la lactoperoxidasa-glucosa oxidasa durante la infección con levaduras de *H. capsulatum*. Se utilizaron levaduras opsonizadas con IgG específica y sin opsonizar. Las cuentas de  $^{125}$ I fueron corregidas en función de la cantidad de macrófagos dada por las cuentas de  $^3$ H-timidina.

mosa.

Actualmente estamos interesados en establecer la importancia de los receptores para Fc, C3b y para manosa-

fucosa en la fagocitosis de *Histoplasma*. Consideramos que el último debe desempeñar un papel crítico en la fagocitosis de *H. capsulatum* ya que las levaduras del hongo contienen galactomananas en la pared celular.

#### Referencias

1. Beaman, L. and Holmberg, C.A.: *In vitro* response of alveolar macrophages to infection with *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* 28: 594-600, 1980.
2. Calderone, R.A. and Peterson, E.M.: Inhibition of amino acid uptake and incorporation into *Histoplasma capsulatum* by lysosomal extract from rabbit alveolar macrophages. *J. Reticuloendothelial. Soc.* 26: 11-19, 1979.
3. Davis Scibienski, C. and Beaman, B.L.: Interaction of alveolar macrophages with *Nocardia asteroides*: Immunological enhancement of phagocytosis, phagosome-lysosome fusion and microbicidal activity. *Infect. Immun.* 30: 578-587, 1980.
4. Dummt, A. and Robert, A.: Electron microscopic study of phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* by hamster peritoneal macrophages. *Laboratory Invest.* 23: 278-286, 1970.
5. Espinosa Shoelly, M. E., Goodsaid, F., Iturbe Ramirez, R. and Taylor, M.L.: Fagocitosis de *Histoplasma capsulatum*: Detección defusión fagosoma-lisosoma. Resúmen VI Congreso Nacional de Inmunología, 6-9 octubre 1985, México, D.F. pg. 060, 1985.
6. Friis, R.R.: Interactions of L cells and *Chlamydia psittaci*: entry of the parasite and host response to its development, *J. Bacteriol.* 111: 706-710, 1972.
7. Goren, M.B., D'Arcy-Hart, P., Young, M.R. and Armstrong, J.A.: Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*; *Pathology* 73: 2510-2514, 1976.
8. Hill, G.A. and Marcus, S.: Study of cellular mechanisms in resistance to systemic *Histoplasma capsulatum* infection. *J. Immunol.* 85: 6-13, 1960.
9. Holland, P.: Circulating human phagocytes and *Histoplasma capsulatum*: Ultrastructural observations: In: *Histoplasmosis*. Ajello, L., Chick, E.W., Furcolow M.L. (Eds) Proceedings of the Second National Conference, Thomas, Springfield, 111 pp. 580-583, 1971.
10. Howard, D.H.: Intracellular behaviours of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* 87: 33-38, 1964.
11. Howard, D.H.: Intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* 89: 518-523, 1965.
12. Howard, D.H.: Effect of temperature on the intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* 93: 438-444, 1967.
13. Howard, D.H.: Fate of *Histoplasma capsulatum* in guinea-pig polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 8: 412-419, 1973.
14. Howard, D.H.: Further studies on the inhibition of *Histoplasma capsulatum* within macrophages from immunized animals. *Infect.*

- Immun. 8: 577-581, 1973.
15. Howard, D.H.: The role of phagocytic mechanisms in defense against *Histoplasma capsulatum*. In: Mycosis Scientific Publications No. 304. Pan American Health Organization, Washington D.C., pp. 50-59, 1975.
  16. Howard, D.H.: Experiments on lymphocyte mediated cellular immunity in murine histoplasmosis. Infect. Immun. 16: 226-231, 1977.
  17. Howard, D.H.: Comparative sensitivity of *Histoplasma capsulatum* conidiospores and blastospores, to oxidative antifungal systems. Infect. Immun. 32: 381-387, 1981.
  18. Howard, D.H. and Dabrowa, N.: Antifungal systems derived from phagocytic cells. In: Human and Animal Mycology: Proceedings of the 8th Congress of ISHAM. Ed Baxter, M. Massey University, Palmerston North, New Zealand. pp. 82-87, 1982.
  19. Howard, D.H. and Otto, V.: Protein synthesis by phagocytized yeast cells of *Histoplasma capsulatum*. Sabouraudia 7: 186-190, 1969.
  20. Howard, D.H. Otto, V. and Gupta, R.K.: Lymphocyte-mediated cellular immunity in histoplasmosis, Infect. Immun. 4: 605-610, 1971.
  21. Howard, D.H. and Wu-Hsieh, B.: Gamma-interferon activatid intra cellular inhibition of *Histoplasma capsulatum*. Abstracts 9th International Congress ISHAM May-19-29, Atlant, Georgia, USA. pp. S5-5, 1985.
  22. Jones, T.C. and Hirsch, J.G.: The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusión with phagocytic vacuoles containing living parasites. J. Exp. Med. 136: 1173-1194, 1972.
  23. Kimberlin, C.L., Hariri, A.R., Hempel, H.O. and Goodman, N.L.: Interactions between *Histoplasma capsulatum* and macrophages from normal and treated mice: Comparison of the mycelial and yeast phases in alveolar and peritoneal machophages. Infect. Immun. 34: 6-10, 1981.
  24. León, M.E., Zepeda, A., Oliva, E., Barrios, R. y Taylor, M.L.: Cinética *in vitro* de la infección sincronizada de *Histoplasma capsulatum* en macrófagos de ratón. Resumen II Congreso Nacional de Micología, 25-29 noviembre; Oaxtepec, Morelos, p. 20, 1986.
  25. Patino, M.M., Hansen, J.T. and Graybill J.R.: Immunocytochemical staining of *Histoplasma capsulatum* at the electron microscopic level. Mycopathologia 94: 157-161, 1986.
  26. Ratnoff, E.D., Pepple, J.M. and Winkelstein, J.A.: Activation of the alternative complement pathway by *Histoplasma capsulatum* Infect. Immun. 30: 147-149, 1980.
  27. Rico Galindo, B.: Fagocitosis de *Histoplasma capsulatum*: papel de los receptores membranales de macrófagos en el proceso fagocítico. Tesis Maestría en Ciencias Biomédicas (Inmunología). Fac. Medicina. División Estudios de Posgrado, México, D.F. 1987.
  28. Sánchez, S.B.D. and Carbonell, L.M.: Immunological studies in *Histoplasma capsulatum*. Infect. Immun. 11: 387-394, 1975.
  29. Taylor, M.L., Rico Galindo, B., Benítez, M.T., Díaz Sánchez, G., Castro, A.M., Polito Alarcón, G. and Toriello, C.: Infección *in vitro* de *Histoplasma capsulatum* en macrófagos paritoneales de ratón. Bol. Soc. Mex. Mic. 19: 327-342, 1984.
  30. Von Behren, L.A., Chaudhary, S., Khardoni, N., Rabinovich, S., Shu, M.D. and Tewari, R.P.: Effect of silica on the susceptibility of mice to experimental histoplasmosis. J. Reticuloendothel. Soc. 34: 99-111, 1983.
  31. Von Behren, L.A., Rabinovich, S. and Tewari, R.P.: Evaluation of phagosome-lysosome fusion in mouse peritoneal machophages after exposure to yeast cells of *Histoplasma capsulatum*. Abstract 9th International Congress of ISHAM, may 19-24 Atlanta, Georgia, USA. pp. R10-4, 1985.
  32. Wu-Hsieh, B. and Howard, D.H.: Inhibition of growth of *Histoplasma capsulatum* by lymphokine stimulated macrophages. J. Immunol. 132: 2593-2597, 1984.
  33. Wu-Hsieh, B., Zlotnik, A. and Howard, D.H. T-cell hybridoma produced lymphokine that activates macrophages to suppress intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. Infect. Immun. 43: 380-385, 1984.