

## Artículo original

# Fagocitosis de *Actinomadura madurae* por macrófagos peritoneales murinos: estudio realizado por microscopia electrónica de transmisión

Alejandro Palma-Ramos,\* Laura Estela Castrillón-Rivera,\* Jorge Ismael Castañeda-Sánchez,\* Ana Rosa Muñoz Duarte,\* Felipe Mendoza Pérez,\* Carmen Padilla Desgarenes\*\*

## RESUMEN

**Introducción:** El micetoma por *Actinomadura madurae* es un proceso infeccioso crónico granulomatoso que se caracteriza por aumento de volumen en el sitio de la infección, tiene aspecto «abollonado» y es de consistencia pétrea. Hay pocas fístulas por las que drena un exudado filante que contiene granos blanquecinos (su tamaño varía de 1 a 5 mm) y componentes de la respuesta inmunitaria del huésped que incluyen queratinocitos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos y macrófagos. Su función es fagocitar y destruir microorganismos patógenos. **Objetivo:** Estudiar la relación huésped-parásito en infecciones producidas por *Actinomadura madurae* y observar si este patógeno es capaz de activar macrófagos peritoneales murinos *in vitro* mediante la técnica de microscopia electrónica de transmisión. **Material y métodos:** Inóculo: se utilizó la cepa de *Actinomadura madurae* ATCC 19425 que fue cultivada en caldo Yeme a 37 °C durante 15 días y ajustada a 300 x 10<sup>6</sup> UFC/mL. Ensayo de fagocitosis: se llevó a cabo adicionando 0.1 mL de la suspensión de *A. madurae* a una suspensión de macrófagos peritoneales murinos, los cuales se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%; se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (15, 30, 45 y 60 min), las cuales se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos 0.1 M, finalmente se incluyeron en resina. Las preparaciones se observaron en el microscopio electrónico Jeol 2000 EX. La activación celular se evidenció por la técnica de la fosfatasa ácida para microscopia electrónica. **Resultados:** Se observaron las diferentes etapas de la fagocitosis y la activación de los macrófagos así como la destrucción del microorganismo. **Conclusión:** *Actinomadura madurae* es fagocitada y destruida por los macrófagos peritoneales murinos *in vitro*.

**Palabras clave:** *Actinomadura madurae*, fagocitosis, actinomycetoma.

## ABSTRACT

**Introduction:** The mycetoma cause for *Actinomadura madurae*, is a chronic granulomatous infectious process characterized by volume increase and «killed»-like stony consistency, during the infection few draining filamentous exudate fistulas could be observed, the exudate contains grains whose size varies from 1 to 5 mm. Within the grains there are components of the host immune response, including keratinocytes, neutrophils, mast cells, eosinophils and macrophages which can engulf and destroy pathogens. **Objective:** To study the host-pathogen interaction in murine peritoneal macrophages when these are infected with *Actinomadura madurae* in order to know if this pathogen is able to activate the murine peritoneal macrophages *in vitro* this interaction was observed by transmission electron microscopy technique. **Material and methods:** Inoculum, *Actinomadura madurae* strain ATCC 19425, was grown in broth Yeme at 37 °C for 15 days a 300 x 10<sup>6</sup> CFU/mL solution was used to infect macrophages. The phagocytosis assays were performed using 0.1 mL of the solution work to infect murine peritoneal macrophages, cells were incubated at 37 °C in a CO<sub>2</sub> atmosphere at 5%, after different times (15, 30, 45 and 60 min), aliquots were taken and fixed with 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1 M cacodilatos buffer cells were included in resin to finally observe them by the electron microscope Jeol EX 2000. To test the cellular activation we used the phosphatase acid technique and observed in the electron microscope. **Results:** During host-pathogen interaction different stages of phagocytosis and macrophage activation were observed as well as the destruction of *A. madurae*. **Conclusion:** *Actinomadura madurae* is engulfed and destroyed by murine peritoneal macrophages *in vitro*.

**Key words:** *Actinomadura madurae*, phagocytosis, actinomycetoma.

\* Laboratorio de Inmunopotenciadores. Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Ciudad de México.

\*\* Laboratorio de Micología, Centro Dermatológico «Dr. Ladislao de la Pascua», Secretaría de Salud. Ciudad de México.

## INTRODUCCIÓN

El micetoma es un proceso infeccioso crónico, granulomatoso, causado por actinomicetos (actinomicetomas) y eumicetos (eumicetomas); en nuestro medio los actinomicetos son más frecuentes y de éstos *Nocardia brasiliensis* ocupa el primer lugar, seguido de *Actinomadura madurae*.<sup>1,2</sup>

El primer caso de *Actinomadura* fue descrito en África por Vincent en 1884. Senegal, Somalia, India, Rumania y Venezuela se consideran países endémicos. En 1949 Lavalley y cols. publicaron el primer caso en México. En nuestro país *Actinomadura madurae* representa 10% de los casos.<sup>2</sup> En un estudio realizado en el Centro Dermatológico «Dr. Ladislao de la Pascua» en 42 años (de 1956 a 1998) hubo 732 casos, de ellos 71 (9.6%) correspondieron a *Actinomadura madurae* con predominio en el sexo femenino (2:1), se identificaron tres focos importantes: el centro occidental que abarca los estados de Guanajuato, Michoacán, Jalisco y Querétaro; el centro meridional, Guerrero, Puebla y Oaxaca; y el tercero en el occidente de Hidalgo.<sup>2</sup> El hábitat natural de *Actinomadura madurae* es la tierra y los vegetales, cuando se produce un traumatismo que ocasiona pérdida de continuidad de la piel, se facilita el ingreso del agente causal al organismo. Por sus actividades laborales los campesinos, jardineros y amas de casa con actividades en el campo están más expuestos a adquirir la infección. Es más frecuente en mujeres adultas entre 20 y 40 años de edad,<sup>3</sup> generalmente se localiza en el pie y puede afectar toda su superficie; sin embargo, en estos casos la región de la planta se ve afectada de manera característica. Las localizaciones extrapodales son poco frecuentes.<sup>3,4</sup>

Clínicamente se caracteriza por aumento de volumen, con aspecto «abollonado» de consistencia pétreo. Hay pocas fístulas por las que drena exudado filante que contiene granos blanquecinos que se perciben a simple vista y su tamaño varía de 1 a 5 mm. Suele haber infección bacteriana sobreagregada de las fístulas por *Staphylococcus aureus*, en cuyo caso el exudado se torna purulento. Este micetoma inicialmente es asintomático y en su proceso evolutivo hacia la cronicidad puede causar dolor. El agente causal es osteofílico, aunque en menor grado que *N. brasiliensis*. La afectación ósea se distingue por lesiones líticas en sacabocado, denominadas «geodos», que pueden dañar todos los huesos del pie; es posible que haya artrodesis de las articulaciones con limitación de los movimientos e incapacidad para la deambulación.<sup>2,4</sup> El diagnóstico se establece por examen directo mediante la observación del grano, que

se caracteriza por ser grande, blanquecino, blando, de bordes cartográficos y con fleco en la periferia. Los granos son un conglomerado de filamentos microsifonados adheridos por el cemento de unión, compuesto por un polisacárido ácido sulfatado que les da cohesión, lo que les confiere su aspecto característico.<sup>5</sup>

En el estudio histopatológico se observan granos multilobulados con bordes festoneados, borde periférico que se tiñe intensamente con hematoxilina y centro pálido; estos granos están rodeados por franjas de largos flecos constituidos de filamentos frecuentemente bifurcados, eosinófilos.<sup>6</sup>

En eumicetomas causados por *Madurella mycetomatis* se han detectado tres tipos de reacción inflamatoria.<sup>7</sup> La reacción tipo I se caracteriza por una zona de neutrófilos que rodean al grano, una zona intermedia de macrófagos, células gigantes y una zona periférica que contiene linfocitos y células plasmáticas. La reacción tipo II no tiene la zona de neutrófilos y el grano está rodeado por macrófagos y células gigantes. La reacción tipo III consiste en un granuloma epitelioides discreto, con células gigantes de Langhans sin granos bien formados.<sup>8</sup>

Mediante el uso de técnicas de inmunohistoquímica se evidenció que en la reacción tipo I, la zona que rodea al grano, dio positiva para CD15 (neutrófilos); la zona II fue positiva para CD68 (macrófagos) y CD3 (linfocitos T); mientras que la zona III contiene células positivas para CD20 (linfocitos B). Asimismo, se demostró la existencia de IgG, IgM y complemento en la superficie de los granos y en los filamentos que rodean al grano. Los neutrófilos y macrófagos recluidos en la lesión por el complemento participan en el ataque al grano.

La tarea de la respuesta inmunitaria innata de la piel consiste en movilizar rápidamente los componentes de la respuesta del huésped, incluidos los queratinocitos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos y macrófagos. Estas células expresan una gran variedad de patrones de reconocimiento, como los receptores tipo Toll y receptores a manosa, que son activados por componentes de microorganismos patógenos.<sup>9</sup>

Los macrófagos son células del sistema mononuclear fagocítico (SMF) que se originan en la médula ósea como monoblastos y luego se diferencian en promonocitos y monocitos. Pertenecen a la serie mielocítica. De la médula ósea emigran y se localizan al interior y fuera de los órganos linfáticos, su periodo de vida y fenotipo dependen de su origen y microambiente, algunos de ellos pueden diferenciarse en células dendríticas.

Estas sorprendentes células constituyen la segunda población celular del sistema inmunitario y son parte crucial de la inmunidad innata. Son capaces de

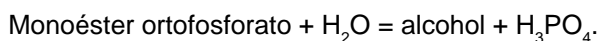
secretar más de 100 productos biológicamente activos y poseen más de 100 receptores de superficie celular, sus funciones van desde actividades arcaicas evolutivamente como la fagocitosis, hasta actividades muy evolucionadas como la presentación de antígenos. Así, en la actualidad se considera que intervienen en tres funciones preponderantes del hospedero: inflamación-regeneración de tejidos, procesos inmunológicos y homeostasis.<sup>10</sup>

Para ello llevan a cabo siete funciones: 1) Fagocitosis de microorganismos y algunas células. 2) Eliminación de células viejas, detritus y cuerpos extraños. 3) Regulación de hematopoyesis. 4) Interacción bidireccional con linfocitos. 5) Presentación de antígenos para montar respuesta inmunitaria específica. 6) Secreción de más de 100 productos biológicamente activos. 7) Actividad antitumoral.

Tradicionalmente se considera que para que los macrófagos logren su plena actividad deben pasar de un estado de reposo a un estado de activación por señales, primero de INF- $\gamma$  y luego una segunda señal dada por el lipopolisacárido (LPS). Desde el punto de vista funcional las células del SMF se dividen en dos grandes grupos: macrófagos tipo 1 (M1) y macrófagos tipo 2 (M2).

El tratamiento con INF- $\gamma$  o LPS induce macrófagos M1 que se consideran proinflamatorios y secretan TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 y promueven la generación de linfocitos Th1, especies reactivas de oxígeno derivadas de óxido nítrico y pueden destruir células tumorales; mientras que el tratamiento con IL-4 o IL-13 induce M2, los cuales secretan interleucinas antiinflamatorias como la IL-10 y factor de crecimiento semejante a la insulina, promueven la regeneración de tejidos y angiogénesis. Es importante tener en cuenta que estas células pueden cambiar de fenotipo, por ejemplo la fagocitosis de células en apoptosis por macrófagos de tipo M1 los desactiva y puede transformarse en macrófagos tipo M2.<sup>11,12</sup>

La activación de los macrófagos en el proceso fagocítico conduce a la destrucción del material endocitado y entre los principales mecanismos citotóxicos se encuentra la fosfatasa ácida (FA) que comprende un conjunto de enzimas ampliamente repartidas en el organismo que pertenecen al grupo de las fosfatasas. Las fosfatasas ácidas son enzimas hidrolíticas que pertenecen al grupo de las fosfomonoesterasas que a pH 5.0 actúan en los ésteres del ácido fosfórico, liberando alcohol y fosfato inorgánico como producto de la reacción.<sup>13,14</sup> La FA cataliza la siguiente reacción:



Se almacena en los lisosomas y funciona cuando éstos se unen a los endosomas. Se considera la FA un marcador lisosómico.<sup>15</sup> Esta enzima se encuentra en polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos, fibroblastos y linfocitos<sup>16</sup> y está relacionada con procesos de lisis celular,<sup>17,18</sup> queratinización,<sup>19-21</sup> metabolismo de huesos,<sup>22</sup> inflamación<sup>23</sup> y en la síntesis y degradación de colágeno.<sup>24</sup>

### Objetivo

Estudiar mediante el uso de la técnica de microscopia de transmisión la capacidad de activación de macrófagos peritoneales murinos infectados *in vitro* con *Actinomadura madurae*.

### MATERIAL Y MÉTODOS

**Inóculo.** Se utilizó la cepa de *Actinomadura madurae* ATCC 19425, se cultivó en caldo Yeme a 37 °C durante 15 días, se ajustó al tubo 1 del nefelómetro de McFarland (300 x 10<sup>6</sup> UFC/mL) en solución salina, se disgregó con perlas de vidrio durante 30 minutos, se centrifugó y resuspendió en el mismo volumen de medio RPMI 1640.

**Fagocitosis.** Se tomaron ratones Balb/c hembras de 21 g de peso, a los cuales se les inocularon 5 mL de medio RPMI 1640 (Caisson REF:RPL 03-500 mL *made in USA*) intraperitoneal, se extrajeron alrededor de 3 mL de suspensión celular y se lavaron por tres ocasiones con solución salina de Alsever, las células se ajustaron aproximadamente a 100 x 10<sup>3</sup> células/mL en medio RPMI suplementado con suero de ternera (HyClone cat SH30071.02 Logan Utah USA) al 10%, en tubos de 15 mL para cultivo de células se colocó 1 mL de la suspensión de células y se agregaron 0.1 mL de una suspensión de *A. madurae*, se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (15, 30, 45 y 60 min), se lavaron con solución salina y se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en *buffer* de cacodilatos 0.1 M.

**Técnica de microscopia electrónica, fijando con glutaraldehído y tetróxido de osmio (OsO<sub>4</sub>), se incluyen en resina y se observan en el microscopio electrónico Jeol 2000 EX.**

Una vez obtenidas las células se fijaron inmediatamente con glutaraldehído al 2.5% en *buffer* de cacodilatos 0.1 M por 45 min a 37 °C, se lavaron tres veces con *buffer* de cacodilatos 0.1 M dejando 10 min entre cada ocasión, se adicionó OsO<sub>4</sub> al 1% en el mismo *buffer* durante 30-60 min a temperatura ambiente, se hizo un lavado

tres veces con *buffer* de cacodilatos 10 min en cada ocasión y se deshidrató en concentraciones crecientes de alcohol etílico comenzando con 50, 60, 70, 80, 90% y absoluto por 10 min cada uno, luego por tres alcoholes absolutos 10 min cada uno, se realizó la preinclusión en resina Spurr a temperatura ambiente colocando primero en alcohol-resina V/V durante dos horas y después en alcohol-resina 1 + 3 por dos horas, después en resina sola durante dos horas, se hicieron tres cambios de resina al 100%. La inclusión se llevó a cabo en resina Spurr polimerizándose en estufa a 60 °C durante 24-48 horas. Todos los bloques se cortaron en el ultramicrotomo E tipo 7011704 Reichert-Jung, se montaron secciones de tono plateado a amarillo claro sobre rejillas de 400 Mesh sin membrana de soporte. El postcontraste se realizó con uranil acetato saturado en alcohol metílico y posteriormente en citrato de plomo, las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico Jeol 2000 EX.<sup>25</sup>

#### Técnica de fosfatasa ácida para microscopia electrónica

Se inyectó por vía intraperitoneal un lote de ratones hembras Balb/c con un mililitro de una suspensión que contiene *A. madurae* en solución salina ajustada al tubo 1 de McFarland ( $300 \times 10^6$  UFC/mL) previamente tratadas con formalina, se inocularon por vía intraperitoneal, posteriormente se hicieron lavados peritoneales a los 3, 5, 10, 15 y 20 min. Una vez obtenidas las células se fijaron inmediatamente con glutaraldehído al 2.5% en *buffer* de cacodilatos 0.1 M con pH de 7.2 por 20 min a 4 °C, se lavaron tres veces con *buffer* de cacodilatos 0.1 M por 10 min en cada ocasión, se cambió el *buffer* por *buffer* de Tris-maleato pH de 5.2 a 4 °C y se incubó con el sustrato ( $\beta$ -glicerofosfato) por una hora a 37 °C, se lavó tres veces con *buffer* Tris-maleato por 10 min en cada ocasión, luego se lavó con *buffer* de cacodilatos con pH de 7.2 toda la noche a 4 °C, posteriormente se fijó con tetróxido de osmio al 1% durante 30-60 min a temperatura ambiente, se lavó tres veces con *buffer* de cacodilatos 10 min en cada ocasión y se deshidrató en concentraciones crecientes de alcohol etílico, comenzando con 50, 60, 70, 80, 90% y absoluto por 10 min cada uno, después por tres alcoholes absolutos 10 min cada uno, se realizó la preinclusión en resina Spurr a temperatura ambiente colocando primero en alcohol-resina V/V durante dos horas y luego en alcohol-resina 1 + 3 por dos horas, después en resina sola durante dos horas, se hicieron tres cambios de resina al 100%. La inclusión se llevó a cabo en resina Spurr polimerizándose en estufa a 60 °C durante 24-48 horas. Todos los

bloques se cortaron en el ultramicrotomo E tipo 7011704 Reichert-Jung, se montaron secciones de tono plateado a amarillo claro sobre rejillas de 400 Mesh sin membrana de soporte. El postcontraste se realizó con uranil acetato saturado en alcohol metílico y posteriormente en citrato de plomo, las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico Jeol 2000 EX.<sup>25</sup>

## RESULTADOS

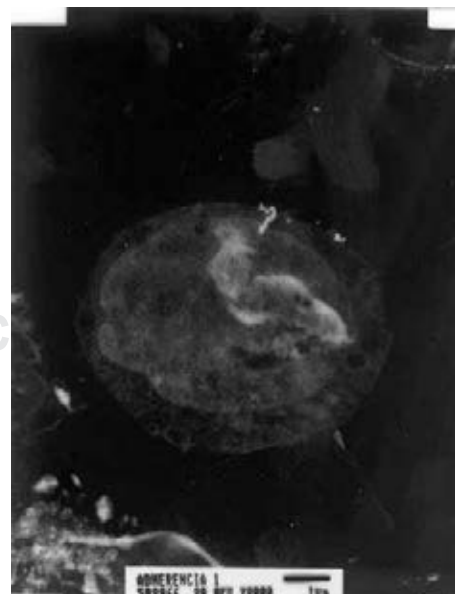
Se estudió la fagocitosis de *A. madurae* por macrófagos peritoneales de ratón Balb/c hembras *in vitro*, se tomaron alícuotas de los macrófagos infectados a los 15, 30 y 60 minutos para observar las diferentes etapas de la fagocitosis, como la adherencia, penetración, formación del fagosoma y la activación de la célula para la muerte y destrucción del microorganismo fagocitado.

En la primera etapa se estudiaron macrófagos murinos sin infectar, en la que se detectó el núcleo, mitocondrias y lisosomas, como se muestra en la **figura 1**.

La siguiente etapa de estudio es la adherencia del microorganismo a las células fagocíticas, que ocurrió a 15 minutos aproximadamente de la infección (**Figura 2**).

#### Adherencia:

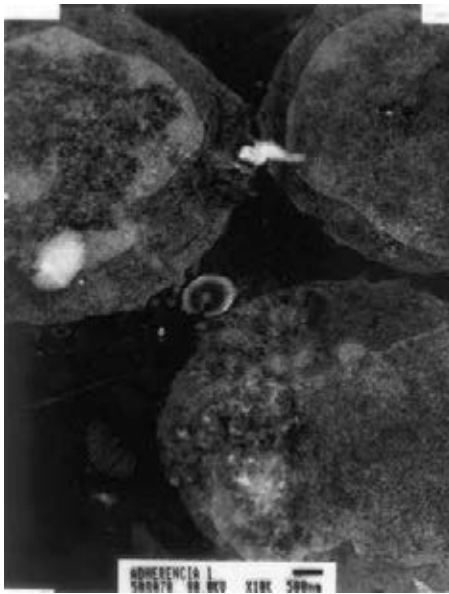
Micrografía electrónica de un macrófago peritoneal de ratón Balb/c en contacto con el microorganismo (*Actinomadura madurae*).



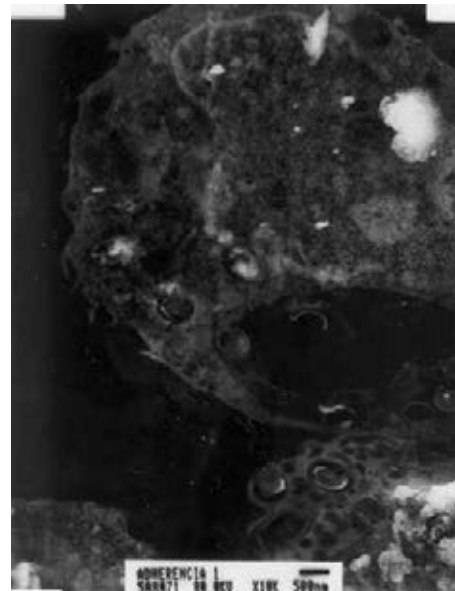
**Figura 1.** Macrófago peritoneal murino sin infectar.

La siguiente etapa de estudio es la endocitosis, con la formación de una vacuola endocítica (fagocítica) como se muestra en la **figura 3**.

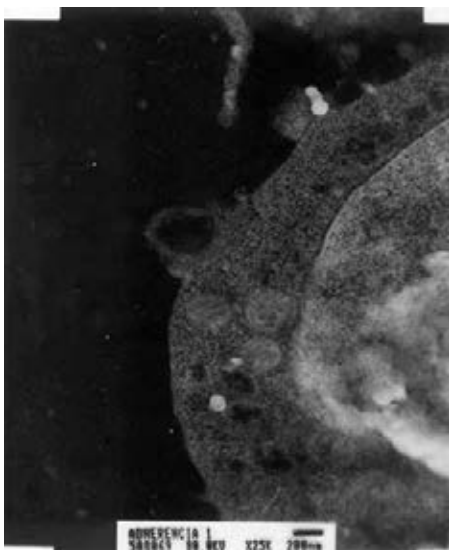
A 30 y 60 minutos de la infección, podemos observar la presencia de varios fagolisosomas con *Actinomadura madurae* en su interior (**Figura 4**).



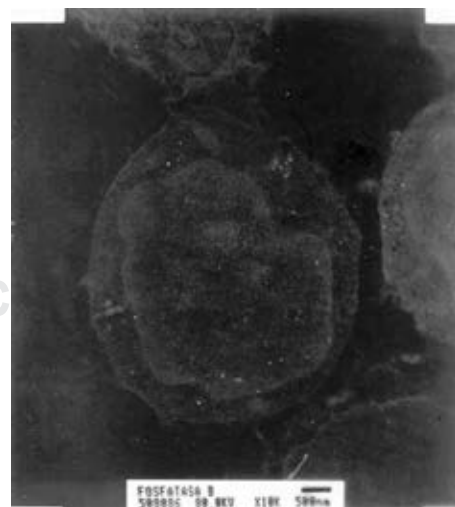
**Figura 2.** Adherencia de *Actinomadura madurae* a los macrófagos peritoneales murinos.



**Figura 4.** Formación de fagolisosoma con *Actinomadura madurae* a los 60 minutos.



**Figura 3.** Adherencia y endocitosis de *Actinomadura madurae* a los macrófagos peritoneales murinos.



**Figura 5.** Observación de la activación de los macrófagos peritoneales murinos por *Actinomadura madurae* por la técnica de la precipitación de la fosfatasa ácida en el fagolisosoma.



**Figura 6.** Acercamiento para observar la precipitación de la fosfatasa ácida en el fagolisosoma del macrófago murino activado con *Actinomadura madurae*.

Se observaron microorganismos dentro de fagosomas. Por otra parte, la reacción de la fosfatasa ácida dentro de los fagolisosomas es positiva (se aprecia precipitación) indicando la activación de la célula.

## DISCUSIÓN

Una de las primeras líneas de defensa que muestra el huésped al ser infectado por un microorganismo como *Actinomadura madurae* son los macrófagos presentes en la piel, los cuales son capaces de destruir o disminuir microorganismos agresores al ser activados por éstos, de tal manera que al estudiar a los micetomas producidos por *Actinomadura madurae* estas células son especialmente esenciales al principio de la infección y con menor presencia, pero no menos importantes, durante la evolución de la enfermedad, ya que las células en mayor cantidad en los actinomictomas son los polimorfonucleares neutrófilos y algunos macrófagos.

Nos dimos a la tarea de estudiar una de estas poblaciones celulares (macrófagos peritoneales murinos) y así saber qué tan eficiente es en la destrucción de *Actinomadura madurae* y el porqué de la implantación de la enfermedad.

Llevamos a cabo la fagocitosis *in vitro* y la observamos a diferentes tiempos, en los primeros 15 minutos detectamos la adherencia del microorganismo y la

penetración del mismo por los macrófagos, como se muestra en las **figuras 2 y 3**.

Se observaron las fases de adherencia, endocitosis y formación del fagosoma durante la infección del macrófago *in vitro* con *Actinomadura madurae*.

En la **figura 4** pueden apreciarse varios fagosomas en los macrófagos que revelan la presencia del microorganismo.

Para saber si los macrófagos fueron activados por el *Actinomadura madurae* fagocitado se aplicó la técnica de precipitación de la fosfatasa ácida adaptada a microscopía electrónica de transmisión y dentro de los fagosomas observamos la presencia de un precipitado, de tal forma que podemos manifestar que la célula sí ha sido activada y es capaz de destruir al microorganismo.

## CONCLUSIÓN

*Actinomadura madurae* es fagocitada y destruida por los macrófagos peritoneales murinos *in vitro*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Lavallo P, Welsh O, Saúl A, Macotela-Ruiz E. Epidemiology of mycetoma in Mexico: study of 2105 cases. *Gac Med Mex*. 1992; 128: 477-481.
2. Lavallo-Aguilar P, Padilla-Desgarennes MC, Pérez-Gutiérrez J, Rivera I, Reynoso-Rangel S. Micetomas por *Actinomadura madurae* en México. *Rev Cent Dermatol Pascua*. 2000; 9: 19-24.
3. Jerez R, Schafer F, Fich F, García P, León P, González S. Micetoma actinomicótico por *Actinomadura madurae*. *Rev Chil Infectol*. 2012; 29: 459-463.
4. Padilla DC, Guardado DV. Micetoma por *Actinomadura madurae* en un paciente con tuberculosis pulmonar. Comunicación de un caso. *Dermatología Rev Mex*. 2009; 53:145-149.
5. Palma RA, Castrillón RL, Padilla DC, Rosas HLL, Márquez C. Purificación y determinación de la estructura de los polisacáridos que forman el cemento de unión en granos de actinomictomas ocasionados por *Actinomadura madurae* y *Nocardia brasiliensis*. *Dermatología Rev Mex*. 2006; 50: 165-173.
6. Bonifaz A, González-Silva A, Albrandt-Salmerón A, Padilla Mdel C, Saúl A, Ponce RM. Utility of helical computed tomography to evaluate the invasion of actinomycetoma; a report of 21 cases. *Br J Dermatol*. 2008; 158: 698-704.
7. El Hassan AM, Fahal AH, Veress B. Cell phenotypes, immunoglobulins and complement in lesions of eumycetoma caused by *Madurella mycetomatis*. *J Sudanese Dermatology*. 2006; 4: 2-5.
8. Fahal AH, el Toun EA, el Hassan AM, Mahgoub ES, Gumaa SA. The host tissue reaction to *Madurella mycetomatis*: new classification. *J Med Vet Mycol*. 1995; 33: 15-17.
9. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 197-216.
10. Ochoa-Carrillo FJ, Bravo-Cuellar A. Los macrófagos, ángeles o demonios. *GAMO*. 2013; 12: 1-3.

11. Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol.* 2008; 180: 2011-2017.
12. Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 948098.
13. Santana A, Lemes A, Bolaños B, Parra A, Martín M, Molero T. Citoquímica de la fosfatasa ácida: Consideraciones metodológicas. *Rev Diagn Biol.* 2001; 50: 89-92.
14. Guija E, Soberón M, Haak-Mares H. Mecanismo de acción de las fosfatasas ácidas de bajo peso molecular. *An Fac Med.* 2007; 68: 356-362.
15. Cimasoni G. *Crevicular fluid updated*. New York: S. Karger; 1983. p. 111.
16. English D, Martin M, Harvey KA, Akard LP, Allen R, Widlanski TS et al. Characterization and purification of neutrophil ecto-phosphatidic acid phosphohydrolase. *Biochem J.* 1997; 324: 941-950.
17. De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol.* 1966; 28: 435-492.
18. Olea MT, Nagata T. Simultaneous localization of 3H-thymidine incorporation and acid phosphatase activity in mouse spleen: EM radioautography and cytochemistry. *Cell Mol Biol.* 1992; 38: 115-122.
19. Itoiz ME, Carranza Jr. FA, Cabrini RL. Histotopographic distribution of alkaline and acid phosphatases in periodontal tissues of laboratory animals. *J Periodontol.* 1964; 35: 470-475.
20. Cabrini RL, Carranza FA Jr. Histochemical distribution of acid phosphatase in human gingiva. *J Periodontol.* 1958; 29: 34-37.
21. Perry DK, Stevens VL, Widlanski TS, Lambeth JD. A novel ecto-phosphatidic acid phosphohydrolase activity mediates activation of neutrophil superoxide generation by exogenous phosphatidic acid. *J Biol Chem.* 1993; 268: 25302-25310.
22. Krane SM, Potts JT Jr. *Skeletal remodeling and factors influencing bone and bone metabolism*. In: Harrison's principles of internal medicine. 9th ed. 1980.
23. Larman L. A comparative enzyme histochemical study of hydantoin induced hyperplastic and normal human gingiva. *Proc Finn Dent Soc.* 1977; 73 Suppl 1: 1-27.
24. Yajima T. Acid phosphatase activity and intracellular collagen degradation by fibroblasts *in vitro*. *Cell Tissue Res.* 1986; 245: 253-260.
25. Lewis PR, Knight DP. *Cytochemical staining methods for electron microscopy*. The Netherlands: Elsevier Sc. Pub.; 1992. pp. 107-109.

Correspondencia:

M. en C. Alejandro Palma Ramos  
Departamento de Sistemas Biológicos  
de la Universidad Autónoma Metropolitana,  
Unidad Xochimilco.  
Calzada Del Hueso Núm. 1100, Col. Villa Quietud,  
Del. Coyoacán, 04960, Ciudad de México.  
Tel: 54-83-7000, ext. 3622.  
E-mail: alpalma@correo.xoc.uam.mx