



**“VALORACION DE LA INMUNIDAD CELULAR *IN VIVO* E *IN VITRO* EN LA TRANSFERENCIA SERICA A UN MODELO MURINO CON ESPOROTRICOSIS”**

Por

**CATALINA MARTINEZ RUVALCABA**

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(ÁREA DE INMUNOBIOLOGÍA)**

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS  
1999**

184735/021260  
P341  
EJ



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

**BIOL. CATALINA MARTINEZ RUVALCABA**

La presente es para informarle que su anteproyecto de tesis titulado "**Valoración de la Inmunidad Celular *in vivo* e *in vitro* por la transferencia serica a un modelo murino con esporotricosis**" se considera aceptado por el Consejo del Posgrado en Ciencias Biológicas. Se sugiere tome usted en cuenta las observaciones que se hicieron durante su presentación ante dicho Consejo y en caso necesario que realice las modificaciones oportunas.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptada como Directora del trabajo de Tesis

**M. en C. Blanca Miriam de Guadalupe Torres Mendoza**

y como asesores del mismo

**M. en C. Eduardo Vázquez Valls**

**M. en C. Luis Villa Manzanares.**

El comité tutorial que la apoyara y evaluara en su trabajo de Tesis de Maestría esta formado por las siguientes personas

**M. en C. Arturo Orozco Barocio**

**Dr. en C. Galina Zaitseva Petrovna**

Sin otro particular, agradecemos su presentación y dedicación y aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

**"Piensa y trabaja"**

**Dra. Anne Santerre**

**Coordinación del Posgrado en Ciencias Biológicas  
Las Agujas Nextipac, Zapopan Jal. A 21 de Febrero de 1996**

c.c.p. Coordinación del Posgrado

c.c.p. Tutor Principal y Asesores

**CUCBA**

**DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO**  
**EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS**  
**BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**  
**P R E S E N T E.**

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de tesis realizado por la **BIOL. CATALINA MARTINEZ RUVALCABA**, con el título: "**Valoración de la Inmunidad celular *in vivo* e *in vitro* en la transferencia sérica a un modelo murino con esporotricosis**", consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su disposición el escrito final para autorización de impresión y programación de fecha de examen de grado.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial salud.

**ATENTAMENTE**

**Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., a 10 de Febrero de 1999.**

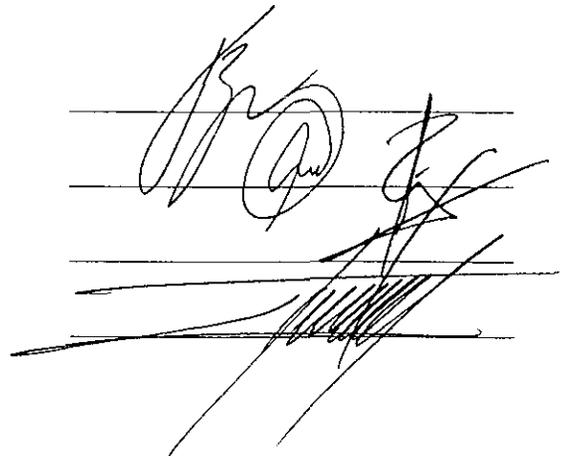
  
**M. EN C. BLANCA MIRIAM DE GUADALUPE TORRES MENDOZA**  
**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. EN C. GALINA ZAITSEVA PETROVNA**

**DR. EN C. ARTURO OROZCO BAROCIO**

**M. EN C. LUIS VILLA MANZANARES**

**M. EN C. EDUARDO VAZQUEZ VALLS**



c.c.p. Coordinación de Posgrado del CUCBA  
c.c.p. Tesista

## RESUMEN

La esporotricosis es una infección micótica crónica, causada por el hongo *Sporothrix schenckii*, con amplia distribución mundial, se encuentra asociada a personas inmunodeprimidas, en México se han reportado zonas endémicas como Jalisco.

Se desconoce el mecanismo de patogénesis de la esporotricosis, donde la variabilidad de la infección clínica indica que tiene un papel importante la respuesta inmune en la interacción huésped-parásito. Entre los estudios sobre la inmunidad en este padecimiento, se destaca: la disminución del proceso microbicida de la fagocitosis y la participación de la inmunidad celular en la actividad fungicida contra el hongo. Una alternativa del proceso de patogénesis de la esporotricosis que ha sido poco estudiado, es el efecto del suero (inmunidad humoral) sobre la inmunidad celular.

Esta tesis valoró el efecto del suero sobre la inmunidad celular, tanto *in vivo* como *in vitro*, con el empleo de transferencia sérica de ratones BALB/c con esporotricosis a ratones sanos o infectados.

Los resultados muestran que la inmunidad celular *in vitro*, con la adición de suero de ratones con esporotricosis en combinación con esporotricina disminuye significativamente ( $p \leq 0.001$ ) en ratones infectados, a diferencia de *in vivo*, donde el suero mostró una disminución no significativa.

## ABSTRACT

Sporotrichosis is a chronic mycosis caused by *Sporothrix schenckii*, with a world wide distribution and associate to persons immunocompromised. In Mexico, has been reported endemic area as State of Jalisco.

The pathogenic mechanism of sporotrichosis remains unknown, where the different clinical forms described for this mycosis indicates that the immune response has an important role in the interaction host-parasite. Among the studies about of the immunity in this disease, is emphasized the decrease of the mechanism of phagocytosis and normal cellular immune response in the fungicidal activity against the *S. schenckii*. An alternative in the pathogenesis of the sporotrichosis, poor studied, is effect of serum (humoral immunity) on cellular immunity. This thesis was evaluated *in vivo* and *in vitro*, the serum effect on cellular immunity, using the transfer of sera from BALB/c mice with sporotrichosis to control or infected mice. The results revealed that the *in vitro* cellular mediated immunity in the addition to serum mice with sporotrichosis, in combinated with *S. schenckii* antigen, diminishes significantly ( $p \leq 0.001$ ) in mice infected, this effect *in vivo* was different, where the serum addition, was not statistical significative.

CUCBA



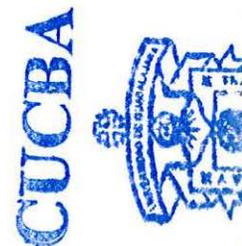
## **DEDICATORIAS**

**A mis padres:**

**Con cariño, por el apoyo otorgado que desde siempre me  
brindaron y por la formación académica heredada, gracias.**

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Blanca Torres Mendoza, por su esfuerzo y dedicación en la dirección de esta tesis, pero sobre todo por el apoyo brindado y por su amistad, mil gracias.



Al Dr. Eduardo Vázquez Valls, por la asesoría y apoyo otorgado para la realización de esta investigación.

Al Dr. Luis Villa Manzanares, por su asesoría en este trabajo.

**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA A CARGO DEL  
M. EN C. EDUARDO VAZQUEZ VALLS DE LA DIVISION DE  
INMUNOLOGIA EN EL CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA  
DE OCCIDENTE, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

## INDICE

	Pág.
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	3
1. Generalidades.....	3
2. Patogenicidad y virulencia.....	6
3. Diagnóstico.....	6
4. Tratamiento de la esporotricosis.....	7
5. Estudios inmunológicos.....	8
a) Inmunidad inespecífica.....	8
b) Inmunidad celular y humoral.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. ....	15
OBJETIVOS.....	16
HIPÓTESIS.....	17
MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
a) Programa de trabajo.....	18
b) Variables utilizadas.....	19
c) Material y equipo.....	19
d) Universo de trabajo.....	21
e) Técnicas y procedimientos.....	21
i. Preparación del antígeno de <i>S. schenckii</i> .....	21
ii. Obtención de la levadura de <i>S. schenckii</i> .....	22
iii. Inoculación de <i>S. schenckii</i> a ratones.....	23

iv.	Obtención del suero.....	23
v.	Transferencia sérica.....	23
vi.	Inmunidad celular <i>in vivo</i> .....	24
vii.	Inmunidad celular <i>in vitro</i> .....	25
viii.	Elisa para IL-1 $\beta$ .....	27
ix.	Grupos experimental y control.....	28
x.	Análisis estadístico.....	28
xi.	Población de ratones.....	28
	RESULTADOS.....	29
	DISCUSIÓN.....	52
	CONCLUSIONES.....	59
	SUGERENCIAS DEL ESTUDIO.....	60
	GLOSARIO.....	61
	BIBLIOGRAFÍA.....	62

CUCBA



## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

	Pág.
Fotografía 1	Esporotricosis linfangítica..... 34
Fotografía 2	Esporotricosis facial con diseminación superficial..... 34
Fotografía 3	Doble Inmuno difusión Esporotricina vs suero de conejo..... 35
Fotografía 4	Proliferación celular con la técnica espectrofotométrica de Mossman..... 35

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Inmunidad celular <i>in vivo</i> .....	36
Figura 2 Inmunidad celular <i>in vitro</i> .....	37
Figura 3 Preparación de la esporotricina (Método González-Ochoa).....	38
Figura 4 Obtención y condiciones de las muestras.....	39
Figura 5 Hipersensibilidad retardada al DNFB.....	40
Figura 6 Hipersensibilidad retardada a la esporotricina.....	41
Figura 7 Separación de células mononucleares.....	42
Figura 8 Proliferación celular estimulada con Concanavalina A.....	43
Figura 9 Hipersensibilidad retardada al DNFB en ratones transferidos con Ss o Si.....	44
Figura 10 Hipersensibilidad retardada a la esporotricina en ratones transferidos con Ss o Si.....	45
Figura 11 Proliferación de linfocitos murinos expuestos a Concanavalina A y a Ss o Si.....	46
Figura 12 Proliferación de linfocitos murinos con esporotricosis expuestos a Concanavalina A y a Ss o Si.....	47
Figura 13 Proliferación de linfocitos murinos expuestos a esporotricina y a Ss o Si.....	48
Figura 14 Proliferación de linfocitos murinos con esporotricosis expuestos a esporotricina y a Ss o Si.....	49
Figura 15 IL-1 $\beta$ de esplenocitos de ratones con esporotricosis.....	50



## LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Supresión e infiltrado inflamatorio en la valoración de la hipersensibilidad retardada al dinitrofluorobenceno en ratones BALB/c con esporotricosis transferidos con suero de ratones control (Ss) y con esporotricosis (Si)....	51
Cuadro 2. Supresión e infiltrado inflamatorio en la valoración de la hipersensibilidad retardada a la esporotricina en ratones BALB/c con esporotricosis transferidos con suero de ratones control (Ss) y con esporotricosis (Si).....	51

# INTRODUCCION

## INTRODUCCION

La esporotricosis es una infección micótica crónica cuyo agente causal es el hongo dimórfico *Sporothrix. schenckii*, el cual tiene una amplia distribución mundial (1). En países no desarrollados la incidencia del padecimiento es mayor, ya que esta relacionado con personas desnutridas o con gran compromiso inmune (1,2). Esta infección se encuentra asociada a campesinos o trabajadores de campo, ya que su agente causal es saprófito en plantas, árboles o tierra por lo que se le considera una enfermedad ocupacional (1). En México se han reportado zonas endémicas de esporotricosis como Jalisco y Michoacán (3).

Diversos estudios permiten evidenciar que en el mecanismo de patogénesis de la infección la resistencia inmune del hospedero participa en el desarrollo de la enfermedad (1), pero se desconocen muchos aspectos de la interacción hospedero–parásito.

Entre los hallazgos científicos sobre la respuesta inmune en la esporotricosis se encuentran los siguientes:

En el proceso microbicida de la fagocitosis: las células de pacientes con esporotricosis son incapaces de destruir al hongo (4), la mieloperoxidasa (MPO) se ve disminuida y la reducción del nitroazul de tetrazolio (NAT) se ve incrementada (5).

Se ha sugerido que la inmunidad celular participa en la actividad fungicida contra *S. schenckii*, y que en pacientes con esporotricosis está presente la hipersensibilidad retardada o tipo IV (1). En un modelo murino con esporotricosis,

la transferencia celular les confirió una mejor resistencia a la infección (6), lo anterior sugiere la implicación de los linfocitos T y su importancia en la defensa del hospedero; misma que se refuerza con la información sobre humanos con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), que presentan niveles disminuidos de linfocitos CD4+ (7).

La participación de la inmunidad celular en esta micosis está presente, pero no es suficiente ya que la enfermedad persiste y los macrófagos de individuos infectados no pueden destruir al hongo; los factores solubles han sido poco estudiados en esta patología, y es posible que estén presentes en el suero de pacientes con esporotricosis e influyan en la eficacia de la respuesta inmune celular contra *S. schenckii*.

CUCBA



# ANTECEDENTES

## ANTECEDENTES

La esporotricosis es una infección micótica cosmopolita de los tejidos cutáneos, subcutáneos y linfáticos, que en países no desarrollados su incidencia es mayor, ya que está relacionada con pacientes desnutridos o inmunodeprimidos (1,3). *S. schenckii* se ha encontrado de manera saprófita sobre madera de minas, túneles y en la forma natural se encuentra asociado a plantas, arboles y tierra (1,3,8). El hongo se aísla de suelos, restos vegetales y otros (3,9,10); frecuentemente se encuentra en estaciones lluviosas y calientes o frías y secas (3); puede crecer a temperatura de 15°C en una atmósfera húmeda mayor al 90% (3,8), como en el caso de minas (8). El hongo afecta con más frecuencia a campesinos, jardineros, floristas, carpinteros (3) y ocasionalmente a trabajadores de laboratorio (11), por lo que también se considera una enfermedad ocupacional. En general, la infección se adquiere por inoculación traumática a nivel cutáneo en la forma micelial, la cual es infecciosa para el hombre, rara vez es extracutánea o sistémica, afectando pulmones, huesos o articulaciones (3,12).

El periodo de incubación post-inoculo es de 7 días a 3 meses. La forma fija se presenta de un 20-30% de los pacientes, se localiza en el sitio del inoculo y se caracteriza por la infiltración de una placa semilunar eritematosa, verrugosa o ulcerada. La forma linfangítica es la más frecuente (Fotografía 1), se presenta en un 70-75%, el chancro de inoculación es un nódulo indoloro de coloración púrpura que sufre necrosis central, pudiendo ulcerarse, durando semanas o meses, el cual persiste o cicatriza al mismo tiempo que aparecen lesiones nodulares o gomas eritematosas que siguen el trayecto de los vasos linfáticos. Cualquier forma clínica localizada puede curar espontáneamente o persistir durante meses o años,

pudiendo ser punto de partida para las lesiones diseminadas (Fotografía 2) y en algunos casos ser resistente al tratamiento (3). En pacientes con evolución linfangítica es raro que la infección se disemine por vía sanguínea a otras partes del organismo (13). La esporotricosis diseminada es relativamente rara y se ha reportado en pacientes con deficiencia inmune celular como SIDA provocada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (7,14,15).

*S. schenckii* crece en la forma micelial en agar dextrosa Sabouraud de 20°C a 25°C, en la forma levaduriforme en agar sangre y cerebro corazón de 35°C a 37°C (3). Se ha sugerido que la temperatura de crecimiento de *S. schenckii* interviene en el desarrollo clínico, y reportado que los hongos aislados de formas cutáneas fijas (n=8) y linfocutánea y extracutánea (n=26) crecen a 35°C y 35-37°C respectivamente (16); sin embargo, Albornoz y cols, no encontraron tal diferencia en las formas fijas (n=20), ya que obtuvieron crecimiento en ambas temperaturas (17). Recientemente con una muestra mayor (n=90) Dixon y cols., observaron en hongos aislados del ambiente y de formas clínicas localizadas, que los primeros se desarrollan mejor a 35°C (98%), y los recolectados de casos clínicos el 100% lo hizo a 37°C, mientras que solo el 42% lo hizo a 35°C (18). Así mismo, Dixon y cols. encontraron virulentas a todas aquellas cepas que crecen a 37°C (19).

*S. schenckii* en cultivo micológico, desarrolla colonias de 3 a 5 días, las cuales al principio son pequeñas, blancas y carecen de micelio algodonoso aéreo, posteriormente adquieren un aspecto húmedo, rugoso y membranoso, variando en el color de crema a verde. El examen microscópico muestra hifas delgadas de 1-2  $\mu\text{m}$ , ramificadas y septadas, portadoras de conidios los cuales están dispuestos en los extremos dando la imagen de "Duraznos en Floración". En su reproducción

sexual los conidios se caracterizan por ser piriformes, ovoides o esféricos, adquiriendo forma redondeada y pared gruesa en cultivos viejos (3,20).

El período de germinación de los conidios de *S. schenckii* es de 12 h, a 25°C *in vitro* (21), donde los iones calcio ( $Ca^{++}$ ) participan importantemente en este proceso (22).

Los elementos micóticos de *S. schenckii* en tejidos humanos rara vez son evidentes, pudiendo aparecer de tres maneras diferentes como son: elementos naviculares que miden de 3-5  $\mu m$ , cuerpos asteroides que engloban a la espora de material eosinofílico e hifas septadas (23). Los cuerpos asteroides son característicos de cortes histológicos, ya que se observan en la mayoría de los pacientes infectados, aunque no son específicos de *S. schenckii*; estos no son bien entendidos y al parecer se forman de la interacción con elementos de la respuesta inmune, constituyendo la levadura de un cuerpo central basófilo, rodeado de extensiones radiales eosinofílicas de aproximadamente 10  $\mu m$  (3). Se ha propuesto que los rayos están formados por complejos antígeno-anticuerpo, complemento y componentes tisulares (13,24). De la cápsula, existen evidencias opuestas, pues mientras que algunos autores piensan que es un artefacto del proceso de la fijación de los tejidos en formol, localizado alrededor de la espora (24), otros sostienen que se constituye de mucopolisacárido y de un complejo de proteínas-mucopolisacáridos (25).

## **PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA.**

Algunos factores influyen en el desarrollo de las infecciones micóticas, como son la variabilidad genética, su adherencia a los tejidos del hospedero, toxinas, enzimas (26), factores ambientales, temperatura de incubación, el CO<sub>2</sub>, potencial redox y factores nutricionales entre otros (27); además de la participación que puedan tener estos, en el caso específico de *S. schenckii*. El micelio es la forma infectante y la levadura el agente patogénico, este dimorfismo permite la adaptación en la interacción hospedero-parásito e induce las diferentes formas clínicas (28,29).

Algunos autores reportan que la patogénesis de cepas aisladas de la naturaleza es baja, sugiriéndose que se incrementa después de varios pasajes a través de animales, se ha profundizado en este aspecto, y apoyado que *S. schenckii* tiene una virulencia definida la cual es característica de la especie, ya que cuando se aíslan cepas que muestran características micológicas típicas de *S. schenckii*, son patogénicas para el hombre, sin necesidad de pasajes previos en animales (10). Los estudios de tipificación de ADN de los aislados del medio ambiente relacionados con los aislados clínicos, ofrecen una oportunidad para estudiar la filogenia de *Sporothrix spp.* y quizá puedan ayudar a determinar como y por qué ciertas líneas de hongos logran ser virulentas (30).

## **DIAGNOSTICO.**

En el diagnóstico de la esporotricosis, el cultivo de lesiones es un método adecuado; el uso de la microscopia de cortes histológicos teñidos con ácido peryódico de Schiff y tinción de plata, muestran levaduras esféricas, fusiformes,

CUCBA



alargadas o en forma de cigarro; otro método es la microscopia de fluorescencia con anticuerpos específicos contra *S. schenckii* (1).

Las pruebas serológicas con utilización de anticuerpos son útiles al inicio de la infección (31,32), encontrando anticuerpos contra *S. schenckii* en suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes (33). Las reacciones de hipersensibilidad retardada son positivas en personas con esporotricosis, aunque se ha encontrado positiva en individuos sanos de regiones endémicas en los que su presencia se ha asociado a infecciones no severas (34).

Se han empleado técnicas de biología molecular en estudios recientes para diferenciar cepas y especies por tipificación de ADN a partir de aislados clínicos y ambientales; y como herramienta en la investigación de problemas epidemiológicos de infecciones micóticas, los que pueden ser difíciles de resolver por técnicas tradicionales (30).

### **TRATAMIENTO DE LA ESPOROTRICOSIS.**

El tratamiento de elección para las formas localizadas de este padecimiento, descubierto empíricamente desde 1912, es el yoduro de potasio (KI), que se administra vía oral en una solución saturada y con dosis progresivas administrando de 3 a 6 g al día, dividido en tres dosis, el tratamiento debe mantenerse durante 1 o 2 meses después de que hayan desaparecido las lesiones (3,35). Se han realizado estudios para encontrar el mecanismo de acción del KI en la esporotricosis, fortaleciéndose el concepto de que éste actúa modulando la reacción inflamatoria y la respuesta inmune, aunque a la fecha se desconoce cual es el mecanismo exacto de acción del KI en ésta micosis; se ha

descrito que el KI no tiene una acción directa sobre la levadura, existen evidencias en la respuesta inmune inespecífica de que el bloqueo de radicales libres disminuye con la participación del KI y se desconoce si tiene algún efecto sobre la inmunidad celular y humoral (36).

### **ESTUDIOS INMUNOLOGICOS.**

Basados en las diferentes formas clínicas que produce *S. schenckii*, así como en la regresión espontánea de la enfermedad, se muestra una diversidad de respuesta del hospedero, que evidencia que en la patogénesis de la enfermedad, la interacción de las defensas del hospedero con el hongo es determinante, razón por la cual se han realizado estudios científicos de esta relación, para definir aquellos procesos que participan en forma eficiente en la actividad fungicida y aquellos que muestran incapacidad para limitar o eliminar la infección.

### **INMUNIDAD INESPECIFICA.**

Los sistemas microbicidas en los polimorfonucleares (PMN's) de humanos (4) y PMN's de gerbiles ambos con esporotricosis (5), muestran una disminución en la actividad de la MPO con respecto a sus controles sanos.

En lo referente al proceso microbicida de la fagocitosis, se ha sugerido, en la esporotricosis y en otras enfermedades micóticas, que es el primer mecanismo de defensa contra el hongo, los PMN's son la principal línea de defensa del hospedero contra la infección de *S. schenckii* (37); en un estado temprano de la esporotricosis, los tejidos muestran infiltración celular predominante de PMN's; en

un estado tardío presenta una zona supurativa central infiltrada de estos (38), y en la periferia una zona de células linfoides y plasmáticas.

Histopatológicamente, las lesiones de piel inducidas experimentalmente en ratón sano muestran características similares al humano (39). Por otra parte, en el ratón normal la fragmentación del hongo inicio entre las primeras 12 y 24 h; mientras que en el ratón nu/nu (atímico, deficiente en la respuesta inmune celular) fue rara con una acumulación de abundantes PMN's, los autores indican que los PMN's carecen de actividad en el ratón desnudo (40).

En el granuloma por esporotricosis, los PMN's y macrófagos a la ingestión de blastosporas forman vacuolas, incrementando su tamaño, estos fagocitos que a la vez son ingeridos por otros macrófagos o PMN's, que después de 3 a 4 meses muestran viabilidad y ultraestructura celular, son incapaces de destruir al microorganismo (41). Lo anterior se apoya con los estudios *in vitro* de PMN's de pacientes con esporotricosis, que revelan que estos no destruyen al hongo y la fagocitosis disminuye (4). Es importante mencionar que los PMN's de personas sanas sí son capaces de destruir al hongo (4,42).

La temperatura se ha utilizado como paliativo en el tratamiento de la esporotricosis, por lo que se sugirió que quizá actuaba a nivel de fagocitosis; se demostró en individuos sanos *in vitro*, que la fagocitosis de levaduras de *S. schenckii* por PMN's no se observa incrementada al aumentar éste parámetro a 40°C, aunque sí disminuye significativamente la tasa de germinación, concluyendo que las levaduras fagocitadas son más sensibles a la hipertermia (43).

Los principales componentes de la pared celular de *S. schenckii* incluyen el péptido-polisácarido ramnomanosa (44,45,46); un glucano insoluble, constituido

por residuos  $\beta$ -1,6-D-glucosa, con ramificaciones unidas a intervalos frecuentes por enlaces  $\beta$ -1,3-, y un soluble manana (o manano), este polímero de D-manosa con enlaces  $\alpha$ -1,6- y con ramificaciones  $\alpha$ -1,2 y  $\alpha$ -1,3 (47), entre otros glicopolisacáridos (45), los cuales también se encuentran presentes en el líquido extracelular, tanto en la fase micelial como en la fase levaduriforme (48). El pretratamiento de macrófagos con azúcares simples (manosa, ramnosa y galactosa), inhibe la unión y la ingestión de levaduras de *S. schenckii*, pero no afecta la de partículas de látex o de eritrocitos de carnero, lo que sugiere que los macrófagos peritoneales de ratón presentan receptores a estos antígenos (45), que son utilizados para valorar reacciones cutáneas de hipersensibilidad y reactividad serológica (44,45,49).

Los PMN's de individuos sanos *in vitro*, al ponerse en contacto con el sobrenadante de cultivo de *S. schenckii*, el cual contiene componentes antigénicos, son capaces de liberar los radicales libres: hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y el singlete de oxígeno ( $\text{O}^{\cdot}$ ) como una respuesta microbicida (50). La quimioluminiscencia (QL) es un método utilizado para valorar el singlete de oxígeno que es liberado ante estímulos antigénicos en el proceso microbicida oxidante en la fagocitosis, la cual en ratones inmunizados con *S. schenckii*, al estimular con la levadura *in vitro*, presenta una reducción severa de la intensidad de QL. Los PMN's estimulados con un antígeno extraño mostraron una producción mayor de QL que los estimulados con *S. schenckii* (51).

En la esporotricosis experimental de gerbiles, se eleva la reducción del colorante NAT por PMN's; la tinción reacciona con el anión superóxido; producto del

CUCEBA



metabolismo oxidativo de los fagocitos el cual se reduce a formazan, mostrando que parte de este metabolismo puede estar dañado; esta elevación se espera cuando existe un proceso infeccioso activo (4,5).

En otros procesos de la respuesta inmune inespecífica, se ha reportado que los PMN's de pacientes con esporotricosis, mostraron un incremento en la actividad quimiotáctica a la esporotricina, pero no a otros derivados bacterianos no específicos. Además se ha reportado que el sistema del complemento puede ser activado por *S. schenckii* para producir actividad quimiotáctica (50). En pacientes con esporotricosis los niveles del factor C3 del complemento se encuentran normales (52), aunque en individuos sanos expuestos a *S. schenckii* la vía alterna del complemento se activa.

#### **INMUNIDAD CELULAR Y HUMORAL.**

Se ha destacado la importancia de la inmunidad celular en el mecanismo de defensa contra las infecciones micóticas (53), observándose que los hongos pueden inducir una respuesta antigénica específica, la cual puede ser expresada tanto en forma positiva por la inmunidad mediada por células o por anticuerpos, como negativamente en un fenómeno supresivo (54).

En el caso específico de la esporotricosis localizada en humanos, la hipersensibilidad retardada tipo IV es positiva a los antígenos de *S. schenckii* (34,55) y la transformación blastoide es normal cuando se estimula con fitohemaglutinina (52); aunque ésta última contra concanavalina A (Con A), en un modelo murino con la forma sistémica de la enfermedad, se reduce entre la cuarta

y sexta semana posteriores al desafío, así como disminuye la hipersensibilidad retardada *in vivo* contra *S. schenckii* (2).

En ratones atímicos (nu/nu) o irradiados, se incrementa la susceptibilidad a la diseminación de esporotricosis (39) y el trasplante de timo les confiere una mayor resistencia a la infección (56).

En ratones con la inmunidad modificada, el desarrollo de la lesión cutánea por esporotricosis fue lento en irradiados (inmunidad celular y humoral disminuida); en el ratón nu/nu (inmunidad celular deficiente) la lesión fue más pequeña; en estos dos grupos, se observó una gran cantidad de levaduras presentes a nivel tisular y un menor número de neutrófilos; y en ratones tratados con ciclofosfamida la lesión fue mayor que en ratones nu/nu, pero al día 12 fue similar en todos los grupos (39).

En cobayos con esporotricosis se determinaron las poblaciones celulares de linfocitos T y B a nivel tisular, donde las células B mostraron un aumento (38%) con respecto a las células de sangre periférica (25%), a la inversa de las células T que mostraron una disminución a nivel tisular (48%) con respecto a la sanguínea (76%), lo que sugiere un papel importante de la inmunidad humoral (38), aunque al parecer no es eficiente por que tampoco limita la infección. En este estudio, la muestra fue pequeña y se requieren más evidencias, pero sugiere que los linfocitos T son importantes en el mecanismo de defensa contra la esporotricosis, ya que su disminución en la lesión localizada, permiten la presencia de la enfermedad.

En los últimos años ha aumentado la prevalencia de las micosis debido al incremento de pacientes inmunodeprimidos, por causas como SIDA, neoplasias y

transplantes (57). Estos pacientes son probables candidatos a desarrollar micosis oportunistas (58). En pacientes con SIDA, los cuales presentan una disminución en los niveles de linfocitos CD4+ y anergia a la esporotricina se presenta la esporotricosis en la forma diseminada (7), a diferencia de las personas sin VIH, que padecen esporotricosis en forma localizada o linfocutánea, y la hipersensibilidad retardada tanto *in vivo* como *in vitro* está presente (2). Lo anterior sugiere la importancia de las células T en el mecanismo de defensa del hospedero contra esta infección.

La transferencia de células esplénicas en gerbiles con esporotricosis mostró una disminución de la fagocitosis pero la actividad microbicida se elevó, con una pérdida de la hipersensibilidad retardada al dinitrofluorobenceno (DNFB) y una elevación en la formación de placas de hemólisis, logrando que la infección sistémica inducida, se limite a localizada (6).

Por otro lado, se han transferido células esplénicas de ratones inmunizados *in vivo* con *S. schenckii*, lo que permitió adquirir resistencia a la infección, a diferencia de la transferencia de las mismas células pero de ratones no inmunizados (59).

El papel del macrófago como célula efectora de la inmunidad celular, fue evaluado al activar macrófagos con picibanil (OK-432), observándose una mayor resistencia a la infección por vía endovenosa en ratones BALB/c y al contrario, la inhibición con carreginina, mostró un daño en la resistencia a la enfermedad. El hongo fue destruido intracelularmente por macrófagos peritoneales tratados con picibanil o inmunizados, pero no por los normales. Lo anterior sugiere que los macrófagos activados, juegan un papel crucial en la resistencia contra *S. schenckii* en el ratón (59).

En la inmunidad humoral, la producción de anticuerpos en pacientes con esporotricosis se encuentra en los niveles normales (52).

Se ha probado el papel del suero en la esporotricosis, observándose que este sobre la levadura, es incapaz de destruir al hongo, pero al combinarse con los PMN's se observa un 50% de fagocitosis, con un 80% de levaduras muertas (42).

La información científica existente hasta la fecha remarca que la disminución de la inmunidad celular está presente en el desarrollo de la lesión, aunque al parecer las funciones generales de los linfocitos T se mantienen normales y la inmunidad mediada por células B, aunque aparentemente normal o aumentada en la esporotricosis no colabora en el proceso de limitación de la enfermedad, por lo que se ha sugerido que participan otros factores presentes en la inmunidad humoral o en el suero que suprimen la respuesta inmune celular o inespecífica contra *S. schenckii*.

# PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La esporotricosis es un padecimiento donde la respuesta inmune tiene una gran implicación en la interacción hospedero-parásito. En la esporotricosis se ha evidenciado la participación de la inmunidad celular, la cual en la forma localizada no es suficiente, porque la enfermedad persiste.

A la fecha se desconoce cual es el factor que influye en la inmunidad para poder evitar la esporotricosis. La fagocitosis es ineficiente contra *S. schenckii*; la inmunidad celular está presente y es normal, pero al parecer no colabora en la destrucción del hongo; finalmente la inmunidad mediada por células B está aumentada en número, normal en su producción de anticuerpos pero no mejora el proceso infeccioso. Existe evidencia de que los niveles de citocinas presentes en el suero estén mediados por factores séricos como las mananas, complejos inmunes o factores solubles supresores que alteran la capacidad de respuesta de las células T para ofrecer una respuesta inmune eficiente contra *S. schenckii*

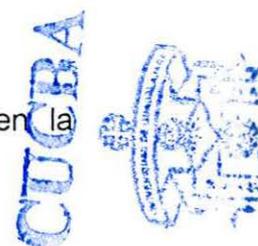
Por lo anterior y en virtud de que actualmente se carecen de estudios que muestren el papel del suero en la esporotricosis, este estudio tiene como objetivo dilucidar si el suero de ratones con esporotricosis tiene efecto supresor sobre la respuesta inmune celular específica contra *S. schenckii*

# OBJETIVOS

## OBJETIVOS

### GENERAL:

Determinar el efecto del suero de ratones BALB/c con esporotricosis en la respuesta inmune celular *in vivo* e *in vitro*.



### ESPECÍFICOS:

1. Valorar la inmunidad celular *in vivo* contra *S. schenckii* y contra DNFB en un modelo murino, expuesto al suero de ratones BALB/c con esporotricosis.
2. Cuantificar la inmunidad celular *in vitro* en linfocitos murinos expuestos al suero de ratones BALB/c con esporotricosis y estimulados con el antígeno de *S. schenckii* o Concanavalina A.

# HIPOTESIS

## HIPÓTESIS

La transferencia *in vivo* o *in vitro* de suero de ratones BALB/c con esporotricosis a un modelo murino, disminuye la inmunidad celular *in vivo* e *in vitro*.

**MATERIAL  
Y  
METODOS**

## MATERIAL Y METODOS

### PROGRAMA DE TRABAJO

El estudio se dividió en tres etapas:

- I. La preparación y obtención del antígeno de *S. schenckii* (esporotricina) por el método de González-Ochoa (55), el cual se utilizó posteriormente para valorar la inmunidad celular tanto *in vivo* como *in vitro*.
- II. Obtención del suero que se utilizó para la transferencia sérica. El suero se obtuvo tanto de ratones sanos, denominado suero de ratones sanos (**Ss**); como de ratones inoculados una única vez con levaduras vivas de *S. schenckii*, denominado suero de ratones infectados (**Si**); de estos últimos, el suero se obtuvo a los 30 días después de la inoculación con la levadura de *S. schenckii*, tiempo en que se formaron gránulos testiculares que en el cultivo micológico son positivos a *S. schenckii*, confirmando laboratorialmente la presencia de la enfermedad.
- III. La transferencia sérica se realizó en dos formas:
  - a) *In vivo*: Cada día durante 6 días, a ratones sanos y a ratones inoculados con *S. schenckii*, se les administró suero tanto de ratones sanos como de ratones con esporotricosis. A los 15 días, tiempo suficiente para desarrollar una respuesta inmune, se valoró la respuesta de hipersensibilidad retardada contra un antígeno inespecífico (DNFB) y con un antígeno específico (esporotricina) (fig. 1).

b) *In vitro*: Se realizó la transferencia sérica, en el cultivo de linfocitos obtenidos a partir de ratones sanos o inoculados con *S. schenckii*, sustituyendo el suplemento de suero fetal que debe llevar el medio en el que proliferan las células, por el suero obtenido de los ratones. Dichos cultivos fueron expuestos al antígeno de *S. schenckii* (esporotricina) por 48 h valorándose la respuesta inmune celular mediante pruebas de proliferación, se utilizó como control una curva de proliferación con Con A (fig.2).

### VARIABLES UTILIZADAS

#### INDEPENDIENTE:

- Transferencia sérica.

#### DEPENDIENTES:

- Inmunidad celular *in vivo* (pruebas de hipersensibilidad retardada)
- Inmunidad celular *in vitro* (pruebas de proliferación celular)

### MATERIAL Y EQUIPO

Cultivo micológico: Agar dextrosa Sabouraud, infusión cerebro corazón, agar cerebro corazón, solución salina fisiológica, portaobjetos, cubreobjetos, tubos de vidrio, asa de nicromo, estufa de cultivo.

Esporotricina: 4 cepas diferentes de *S. schenckii*, caldo dextrosa Saboraud, asa de nicromo, estufa de cultivo a 25°C, frascos de 1000 ml para cultivo, membranas para diálisis, papel filtro Whatman del número 2, membranas millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ , acetato de sodio, azida de sodio, alcohol etílico absoluto, embudos de vidrio, soporte universal, pera de decantación, agitador magnético y centrifuga refrigerada.

Separación celular, cultivo e inmunización: Ficoll-hypaque ( $\delta = 1.083$ ) medio de cultivo RPMI-1640 suplementado (RPMIs) con: aminoácidos no esenciales (0.1%), l-glutamina (0.1%), piruvato de sodio (0.1%), antibióticos: penicilina 1000 U/ml  $\mu\text{g/ml}$  y estreptomina 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , suero fetal de ternera (10%); azul tripano (0.2%), amortiguador de fosfatos, tubos de vidrio, tubos cónicos, portaobjetos, cubreobjetos, pipetas graduadas, pipetas Pasteur, cajas de petri, cámara de Neubauer, micropipetas, centrifuga refrigerada, microscopio de luz y microscopio de epifluorescencia.

Inmunidad celular:

a) Hipersensibilidad retardada: DNFB, acetona, aceite de oliva, formol al 10%, colorantes para tinción de hematoxilina y eosina, micropipeta graduable, navajas de rasurar, micrómetro Mitutoyo, jeringas, esporotricina, tijeras, bisturi y microscopio de luz.

b) Proliferación celular: Medio RPMIs, esporotricina, Con A, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2y1)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma M2128); alcohol

isopropílico ácido, micropipetas graduables, estufa de cultivo VWR Scientific 2100 con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C y espectrofotómetro METROLAB 330.

Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).

Equipo de inmunoensayo enzimático (ELISA) para IL-1 $\beta$  (RD Systems®), equipo para lavado de microplacas de ELISA y espectrofotómetro marca BerinHg.

#### **UNIVERSO DE TRABAJO.**

Se utilizaron 400 ratones BALB/c machos entre 8 y 12 semanas de edad, en las condiciones establecidas por el Bioterio del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS.

#### **TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.**

##### **PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO DE *S. schenckii*.**

En la preparación del antígeno (esporotricina), por el método de González Ochoa (54) que se obtuvo para probar la hipersensibilidad retardada, se utilizaron 4 cepas de *S. schenckii*, de las cuales, tres de ellas fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE), las cepas 6039, 6041 y 6042 y la última aislada de una lesión localizada de un paciente de Jalisco y proporcionada por el Dr. Luis Villa Manzanares del Hospital de

Especialidades (CMNO). Las cepas de *S. schenckii*, se cultivaron durante 2 a 3 meses en caldo Sabouraud a 25°C, se obtuvo la formación de una película de micelio. Se filtró, en un principio con papel Whatman estéril y posteriormente con membranas millipore de poro 0.22 µm. El sobrenadante se dializó contra agua destilada estéril a 4°C con agitación constante durante 24 h y se concentró por evaporación. Se precipitó 4 o 5 veces con acetato de sodio y alcohol etílico absoluto y el precipitado (esporotricina) fue lavado por centrifugación (fig. 3). Por el método de Antrona, se cuantificó la concentración de carbohidratos presentes en la esporotricina, y se ajustó a 1 mg/ml para su uso en la pruebas de hipersensibilidad retardada y proliferación celular (60).

CUCBA



Una vez preparada una cantidad suficiente de esporotricina (20 ml), se valoró la especificidad de ésta, inmunizando subcutáneamente a un conejo con levaduras de *S. schenckii* con adyuvante completo de *Freund's*, una vez por semana durante cuatro semanas; en la quinta semana se obtuvo sangre por punción cardiaca, se separó el suero y se utilizó como antisuero (anticuerpos policlonales) para hacer pruebas de doble inmunodifusión contra la esporotricina, observando líneas de identidad entre la esporotricina preparada y el antisuero de conejo (fotografía 3) (61).

#### **OBTENCIÓN DE LEVADURA DE *S. schenckii*.**

La levadura de *S. schenckii* se obtuvo por resiembra en caldo cerebro corazón a 37°C por 24 h, posteriormente se filtró en papel Whatman No. 2 y

se lavó con solución salina fisiológica estéril y contó en cámara de Newbauer, ajustándose al volumen requerido para la inoculación de ratones.

#### **INOCULACION DE *S. schenckii* A RATONES.**

Se inocularon grupos de ratones con  $1 \times 10^6$  levaduras vía intraperitoneal (ip) y a los 30 días se consideraron ratones infectados con esporotricosis para utilizarse tanto para medir la inmunidad celular *in vivo* e *in vitro*, como para obtener el Si.

#### **OBTENCIÓN DEL SUERO.**

De ratones sanos como de ratones inoculados con *S. schenckii*, se obtuvo sangre por punción cardíaca, previa anestesia con éter etílico; posteriormente se separó el suero por centrifugación a 2,000 rpm durante 10 minutos, se filtro con membranas de poro 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro, se hicieron alícuotas del suero de 2 ml y se almaceno a  $-20^\circ\text{C}$ , para su uso posterior en las pruebas tanto *in vivo* como *in vitro*.

#### **TRANSFERENCIA SÉRICA.**

Para valorar la inmunidad celular *in vivo*, el Ss y el Si obtenido se transfirió a grupos de ratones sanos e inoculados con *S. schenckii*, lo anterior se llevó a cabo administrándoles ip 0.5 ml de suero de ratón sano o 0.5 ml de suero de ratón con esporotricosis diariamente durante 6 días. Se incluyó un grupo control de ratones sin transferencia sérica (fig. 4).

### **INMUNIDAD CELULAR *in vivo*.**

Se determinó la respuesta celular *in vivo* de hipersensibilidad retardada al DNFB como antígeno diferente de *S. schenckii* y a un antígeno específico del mismo (esporotricina), tanto en ratones BALB/c sanos como inoculados con *S. schenckii* y transferidos o no con el suero obtenido de los ratones sanos y con esporotricosis (fig.1).

#### **➤ Valoración de la inmunidad celular *in vivo* al DNFB.**

Para medir la hipersensibilidad retardada a DNFB (62) a cada ratón de los grupos antes mencionados, se rasuró un área de 2 X 2 cm de la piel del abdomen, para inducir la primera sensibilización al aplicar 20  $\mu$ l de solución 0.5% (p/v) de DNFB en una mezcla de acetona y aceite de oliva en una proporción 4:1 el día cero. Después de 24 h (día 1) se repitió la aplicación (segunda dosis sensibilizadora). Al 5to. día, a partir de la segunda dosis (el séptimo día global), se midió el grosor del pabellón auricular (basal) con un micrómetro de precisión (Mitutoyo) y se aplicó en ese sitio 10  $\mu$ l de DNFB al 0.2% (p/v) en el solvente antes mencionado (dosis reveladora). Se midió el grosor del pabellón auricular a las 48 h (noveno día), y se tomaron cortes de tejido del pabellón auricular sensibilizado que se fijaron en formol al 10% y se procesaron para estudio histológicos con hematoxilina y eosina (fig. 5), para valorar la reacción inflamatoria que se clasificó en grados de menor a mayor a través de 5 cruces.

➤ **Valoración de la inmunidad celular *in vivo* a la esporotricina.**

Para medir la hipersensibilidad retardada a la esporotricina a cada grupo antes mencionado, el séptimo día se retó con esporotricina subcutáneamente en el cojinete plantar posterior izquierdo y el grosor fue medido con un micrómetro de precisión (Mitutoyo) a las 48 h (día 9). Posteriormente, por dislocación cervical se sacrificaron los animales seccionando el cojinete plantar (63), el cual se fijó en formol al 10% para su estudio histológico con la tinción de hematoxilina y eosina (fig. 6).

El porciento de supresión se midió con la siguiente fórmula (64):

$$\% \text{ Supresión} = \left( \frac{\text{Incremento del grosor del pabellón auricular} \times 100}{\text{Incremento del grosor del pabellón auricular del ratón control.}} \right)$$

**INMUNIDAD CELULAR *in vitro*.**

Obtención de linfocitos esplénicos: Los ratones sanos e inoculados con *S. schenckii*, fueron sacrificados por dislocación cervical. En condiciones estériles se obtuvo el bazo que se homogeneizó con un amortiguador de fosfatos para luego separar los linfocitos por gradientes de densidad con Ficoll-hypaque ( $\delta = 1.083$ ) estéril (fig. 7) (65).

➤ **Prueba de viabilidad.** La viabilidad celular de los linfocitos obtenidos fue mayor al 95% y se determinó por microscopia óptica utilizando la tinción de exclusión con azul tripano al 0.2% (66).

➤ **Prueba de proliferación celular.** Los linfocitos obtenidos se contaron en cámara de Neubauer, se ajustó la concentración a  $4 \times 10^6$  células y colocándolas en tubos de vidrio con un volumen final de 0.5 ml de RPMIs; su proliferación se estimuló al exponerlos a:

1. Antígeno de *S. schenckii* (esporotricina) 10  $\mu\text{g/ml}$  (**E10**) y 50  $\mu\text{g/ml}$  (**E50**).
2. Con A (2.5 y 5  $\mu\text{g/ml}$ ), como antígeno distinto a *S. schenckii* y para establecer un control de proliferación.

Estos grupos a su vez se estimularon con:

- a) Suero al 10% obtenido de ratones sanos.
- b) Suero al 10% obtenido de ratones inoculados con *S. schenckii*.
- c) Sin suero.

Los linfocitos se cultivaron durante por 48 h en una incubadora a  $37^\circ\text{C}$  con una atmósfera húmeda al 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, se aplicó la técnica espectrofotométrica modificada de Mossman (67,68,69) para valorar la proliferación celular, que consistió en colocar sobre los tubos de cultivo 50  $\mu\text{l}$  de MTT (el cual fue disuelto en un buffer de fosfatos 5 mg/ml), se incubo en condiciones de cultivo durante 4 h, por centrifugación se obtuvo el botón celular y se bloqueo la reacción con alcohol isopropílico ácido, valorando la proliferación celular espectrofotométricamente a 570 nm (fig.8 y fotografía 4).

## ELISA PARA IL-1 $\beta$

En una microplaca de 96 pozos de fondo plano con el antígeno de IL-1 $\beta$  fijado se depositaron 50  $\mu$ l de diluyente de la muestra con 50  $\mu$ l de la muestra o los controles negativos (2) y positivos (3), se incubó a temperatura ambiente, en la oscuridad por 120 minutos, posteriormente se lavaron tres veces con un amortiguador de fosfatos para eliminar el material no fijado. Paso siguiente, se agregó 100  $\mu$ l del conjugado de IL-1 $\beta$  de ratón (anticuerpo contra IL-1 $\beta$  con la enzima peroxidasa de rabano) , se tapó e incubó nuevamente a temperatura ambiente en la oscuridad por 120 minutos, posteriormente se lava con el amortiguador de fosfatos y se deposita un volumen de 100  $\mu$ l del sustrato (cromogeno tetrametil benzidina y estabilizador peroxido de hidrogeno 1:1) preparado 5 minutos antes de la reacción, incubándose por 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente se detiene la reacción con 100  $\mu$ l de ácido clorhídrico 1N. Se determinó la densidad óptica en el espectrofotómetro a 570 nm. Se gráfico una curva de concentración y se determinaron las concentraciones de cada muestra en pg.

Los experimentos *in vitro* se realizaron por triplicado en dos experimentos independientes con 5 ratones para cada grupo y para cada experimento.

Los experimentos *in vivo* se realizaron por triplicado en experimentos independientes con 5 ratones para cada grupo y para cada experimento.

## GRUPO EXPERIMENTAL

1. Ratones sanos con suero infectado, para demostrar que este tiene la capacidad de disminuir la inmunidad celular tanto *in vivo* como *in vitro*.

## GRUPOS CONTROL

1. Ratones sanos con Ss, para mostrar el efecto sobre la inmunidad celular del suero sobre las células sanas.
2. Ratones Infectados con Sa, para observar la competencia de la inmunidad celular en animales infectados.
3. Ratones Infectados con Si, con la finalidad de comparar con el grupo 2 de ratones infectados con Ss, y demostrar si el Si disminuye la respuesta inmune celular en comparación con los grupos donde se utilizó Ss.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

La técnica utilizada para comparar fue t de student (70), considerando un 95% de confianza. Los resultados se graficaron con la media  $\pm$  error estándar.

## POBLACION DE RATONES UTILIZADA:

Obtención de suero: De cada ratón se obtuvieron 0.5 ml de suero, se requirieron entre 100 y 125 ml totales. Se ocuparon 250 ratones.

Ratones para proliferación celular (5 ratones por 5 grupos) =25. Por triplicado =75.

Ratones para prueba de hipersensibilidad retardada: (5 ratones por 5 grupos) =

25. Por triplicado = 75.

# RESULTADOS

## RESULTADOS

### I. PRUEBAS *in vivo*.

#### A) HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA AL DINITROFLUOROBENCENO

La respuesta de hipersensibilidad retardada al DNFB en ratones con esporotricosis transferidos con Ss se observó ligeramente disminuida en un 6%, equivalente a 0.155  $\mu\text{m}$ , con respecto a los ratones sanos transferidos con Ss que tuvieron un grosor de 0.165  $\mu\text{m}$  (fig. 9, cuadro 1).

La valoración de los ratones con esporotricosis transferidos con Si (0.155 (m) no mostró una diferencia significativa con respecto al grupo de ratones sanos transferidos con Si (0.159  $\mu\text{m}$ ) (fig. 9).

#### B) HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A LA ESPOROTRICINA.

Una vez preparada la esporotricina por el método de González-Ochoa, (55) se probó su especificidad por el método de doble inmunodifusión (61), mostrando una línea de identidad entre el suero de conejo inmunizado con *S. schenckii* y la esporotricina preparada.

La esporotricina se diluyó a diversas concentraciones y se aplicó a ratones con esporotricosis, obteniendo la mejor respuesta de hipersensibilidad a la

concentración de 1 mg/ratón, que fue la utilizada para las pruebas *in vivo* de hipersensibilidad retardada tipo IV (62).

Los resultados muestran un aumento en la hipersensibilidad retardada a la esporotricina en ratones con esporotricosis (0.105  $\mu\text{m}$ ), misma que se incrementa significativamente ( $p \leq 0.05$ ) al transferir a los ratones con Si (0.115  $\mu\text{m}$ ) (fig. 10).

El Si en los ratones sanos, disminuye de manera significativa la hipersensibilidad retardada a la esporotricina ( $p < 0.001$ ), al compararlo con el grupo con esporotricosis y Si (fig. 10). Lo anterior, indujo una supresión del grupo control sano con Si que fue del 16% con respecto a los de esporotricosis con Si (Cuadro 2).

El porcentaje de supresión mostrado en los ratones sanos con Si y Ss, fue de 7 y 3% respectivamente (cuadro 2); mostrando una diferencia significativa contra el ratón control sin suero (0.159  $\mu\text{m}$ ) (fig. 10).

En la figura 10 se muestran los resultados de la hipersensibilidad entre los grupos de ratones con esporotricosis y Si (0.115  $\mu\text{m}$ ), contra los grupos que disminuyeron con esporotricosis sin suero (0.105) y con esporotricosis con Ss (0.104  $\mu\text{m}$ ), la cual muestra una diferencia estadísticamente significativa de  $p \leq 0.05$  (fig. 10).

## II. PRUEBAS *in vitro*.

### A) Porcentaje de Proliferación a Concanavalina A en ratones sanos.

La respuesta proliferativa de los linfocitos esplénicos murinos expuestos a Con A 2.5  $\mu\text{g}$  (313%) y 5  $\mu\text{g}$  (328%), mostró un incremento significativo al ser estimulados tanto con Ss (434% y 442% respectivamente), como con Si (484% y 449% respectivamente) ( $p \leq 0.05$ ) (fig. 11).

La administración de Si no mostró disminución del porcentaje de proliferación en ninguno de los casos con Con A (fig. 11).

Cabe hacer notar, que las células control con Si, sin ningún otro estímulo, mostraron un aumento significativo ( $p \leq 0.001$ ) en el porcentaje de proliferación (437%), al compararse con las células control sin Si (fig. 11).

### B. Porcentaje de Proliferación a la Concanavalina A en ratones con esporotricosis.

El porcentaje de proliferación en los linfocitos esplénicos de ratones con esporotricosis y estimulados con Con A fue de 311% y 327% cuando se utilizaron las concentraciones de 2.5  $\mu\text{g}$  y 5  $\mu\text{g}$  respectivamente, este aumentó significativamente ( $p \leq 0.001$ ) al agregar Ss (467% y 475% respectivamente) y Si (536% y 584% respectivamente) (fig. 12).

Al comparar la proliferación de linfocitos sin Con A pero con Ss (591%) y Si (606%), se observó una disminución ( $p \leq 0.001$ ) cuando se agregó Con A, tanto a la concentración de 2.5  $\mu\text{g}$  como de 5  $\mu\text{g}$  (fig. 12).

### **C. Porcentaje de Proliferación a la Esporotricina en ratones sanos.**

Al estimular las células de ratones sanos con la esporotricina a concentraciones de E10 (10  $\mu\text{g}$ ) y E50 (50  $\mu\text{g}$ ), el porcentaje de proliferación tuvo un aumento significativo a 614% y 661% respectivamente, con respecto a los grupos control sano sin suero (100%), con Ss (352%) o con Si (437%) ( $p \leq 0.001$ ) (fig. 13).

Las células sanas con Si (437%) mostraron un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de proliferación ( $p \leq 0.001$ ) con respecto al grupo con Ss (352%) (fig. 13).

No existe diferencia significativa en los porcentajes de proliferación entre los grupos con suero: SsE10 (686%), SsE50 (716%), SiE10 (733%) y SiE50 (750%) (fig. 13).

### **D. Porcentaje de Proliferación a la Esporotricina en ratones con esporotricosis.**

En los resultados se observa una disminución significativa ( $p \leq 0.001$ ) en todos los grupos de linfocitos de ratones con esporotricosis estimulados con esporotricina tanto E10 (713%) como E50 (688%), al comparar contra el resto de los grupos

que se adiciono Ss o Si, con una proliferación de: 591% con Ss , 625% Ss+E10, 524% Ss+E50, 606% Si, 580% Si+E10 y 385% Si+E50 (fig. 14).

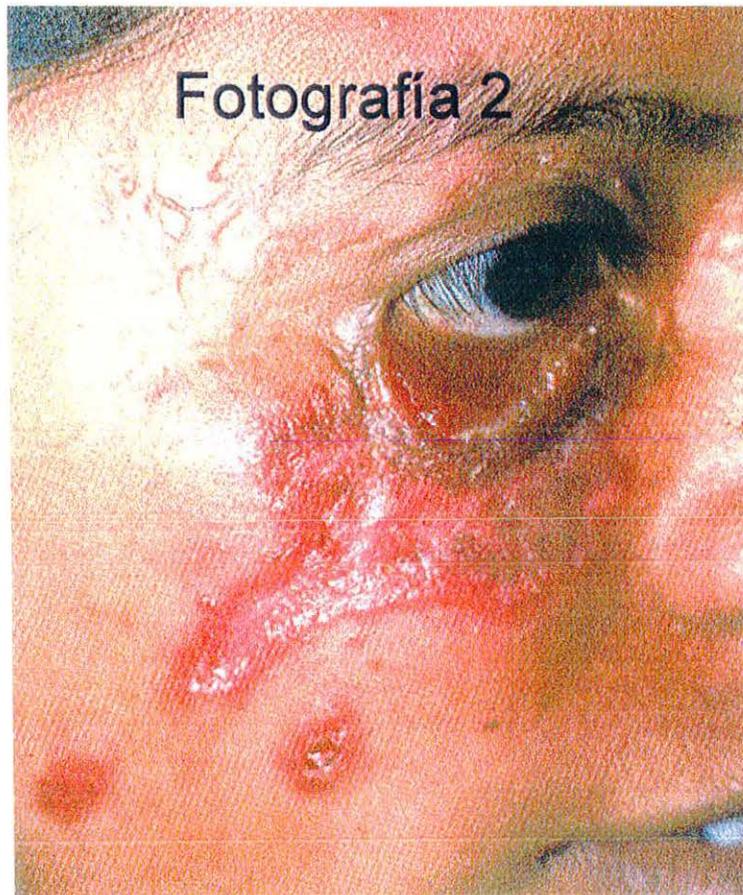
#### **OTROS ESTUDIOS ADICIONALES:**

La cuantificación de IL-1 $\beta$  en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos de ratones con esporotricosis, estimulados con esporotricina y transferidos únicamente con Si, mostraron un nivel de IL-1 $\beta$  mayor a 400 pg/ml (fig. 15).

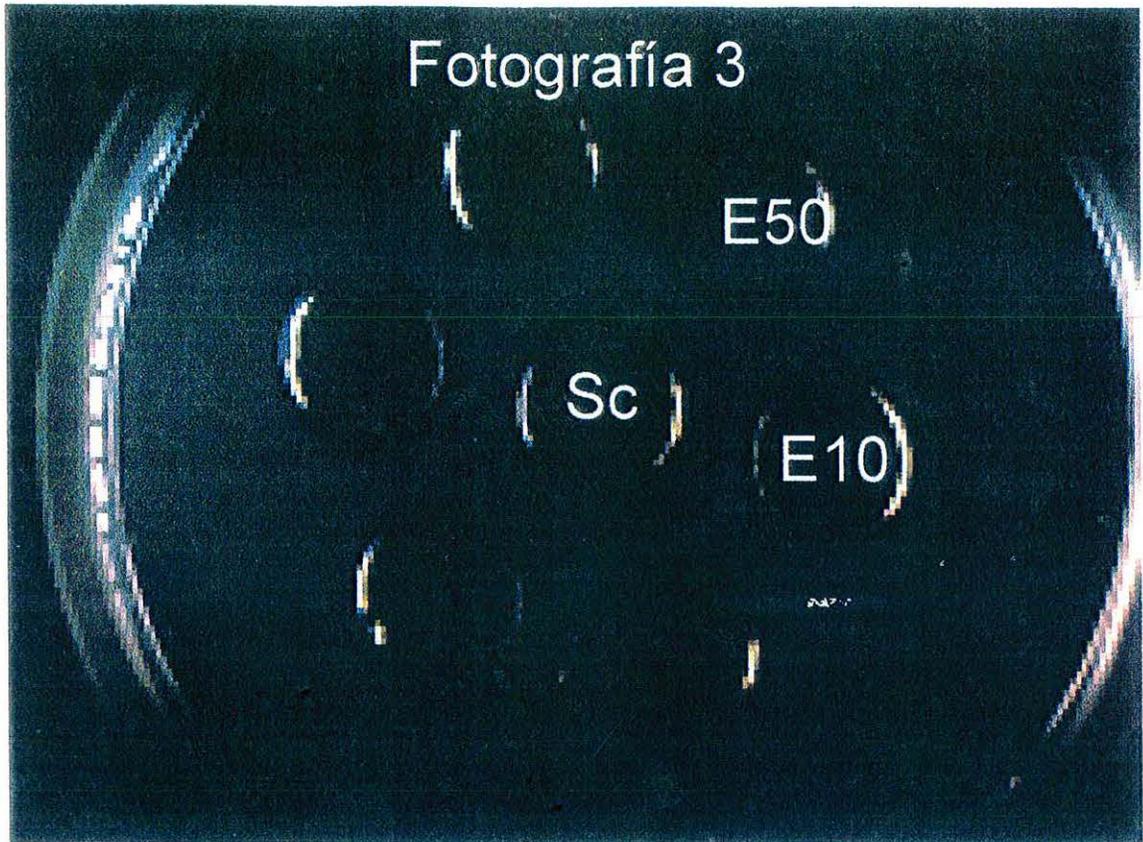
# FOTOGRAFIAS



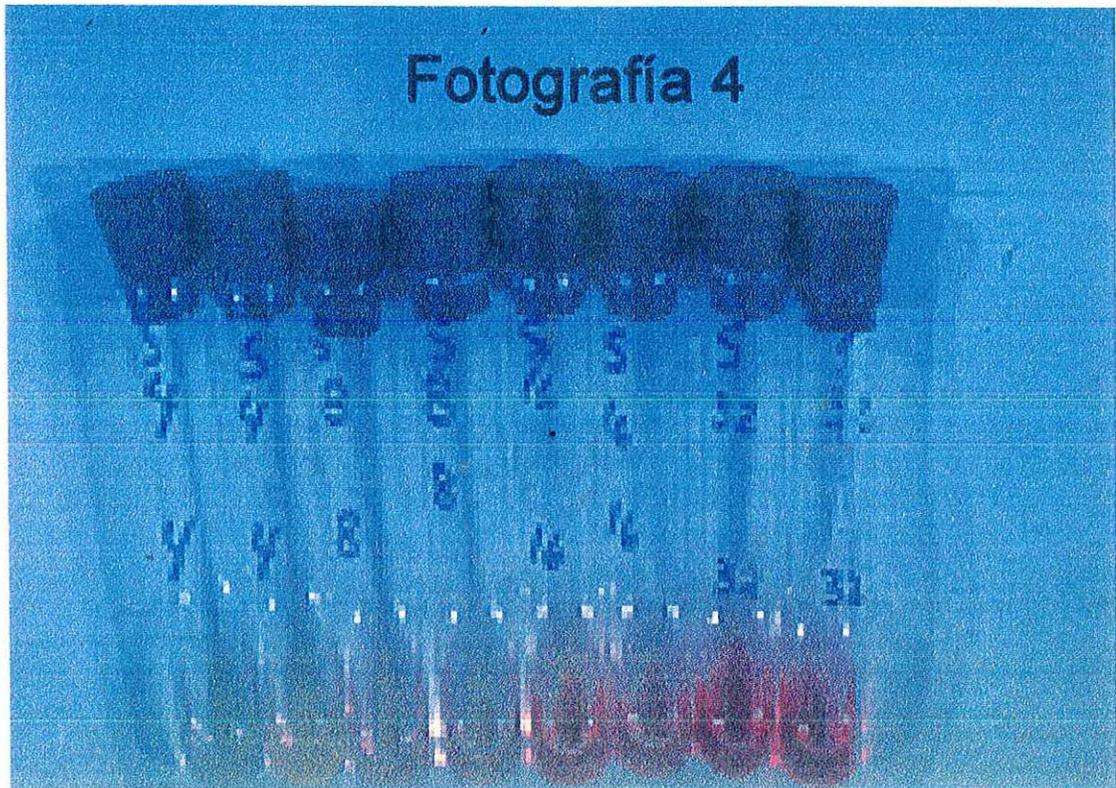
Esporotricosis linfangítica Arenas R.:Micología Médica Ilustrada Ed. Mc Graw Hill México 1993:177.



Esporotricosis facial con diseminación superficial. Arenas R.:Micología Médica Ilustrada Ed. Mc Graw Hill México 1993:179.



Doble Inmuno Difusión Esporotricina (E10 y E50) vs suero de conejo (Sc)



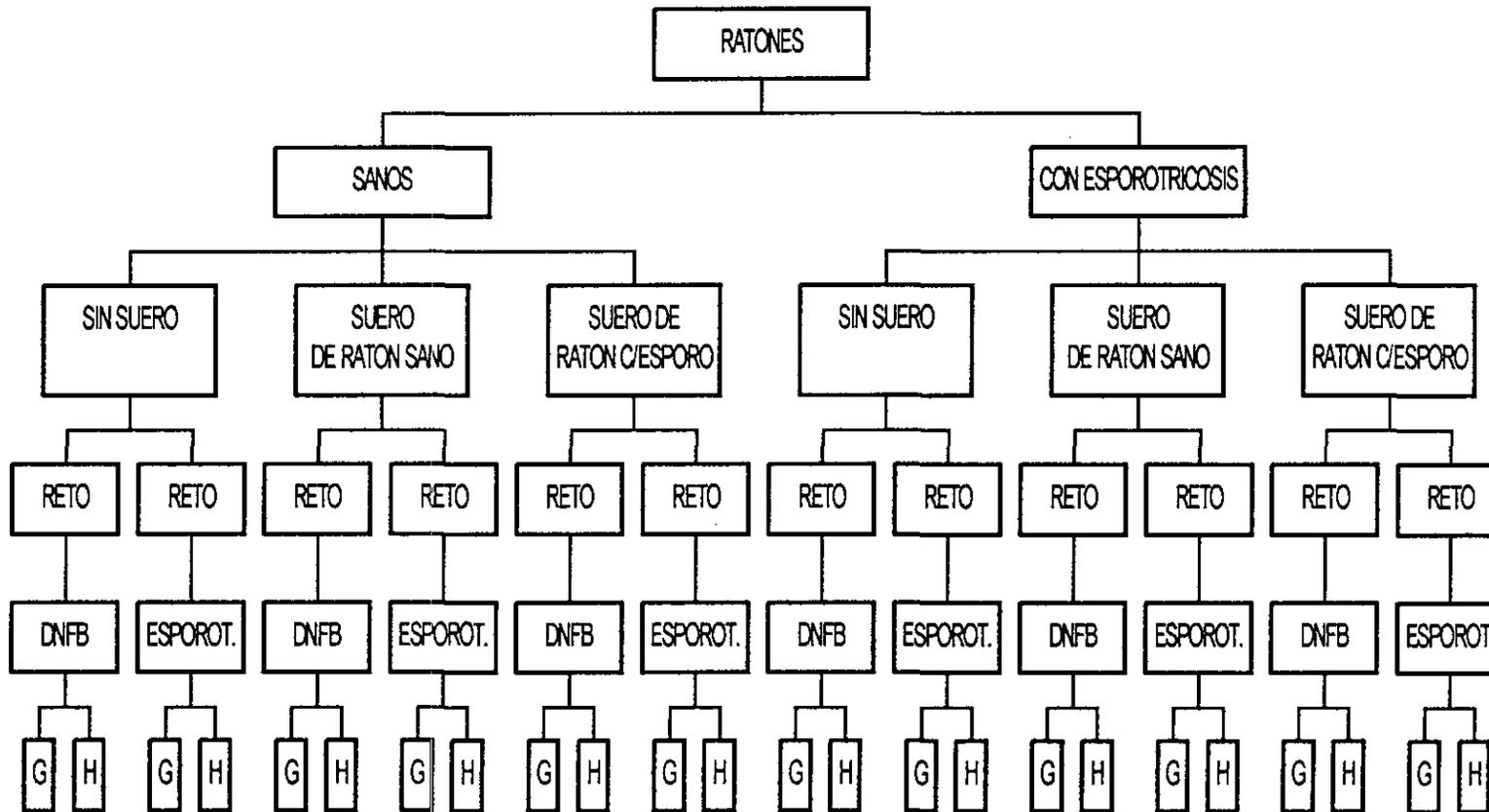
Proliferación celular con la técnica espectrofotométrica de Mossman

# FIGURAS

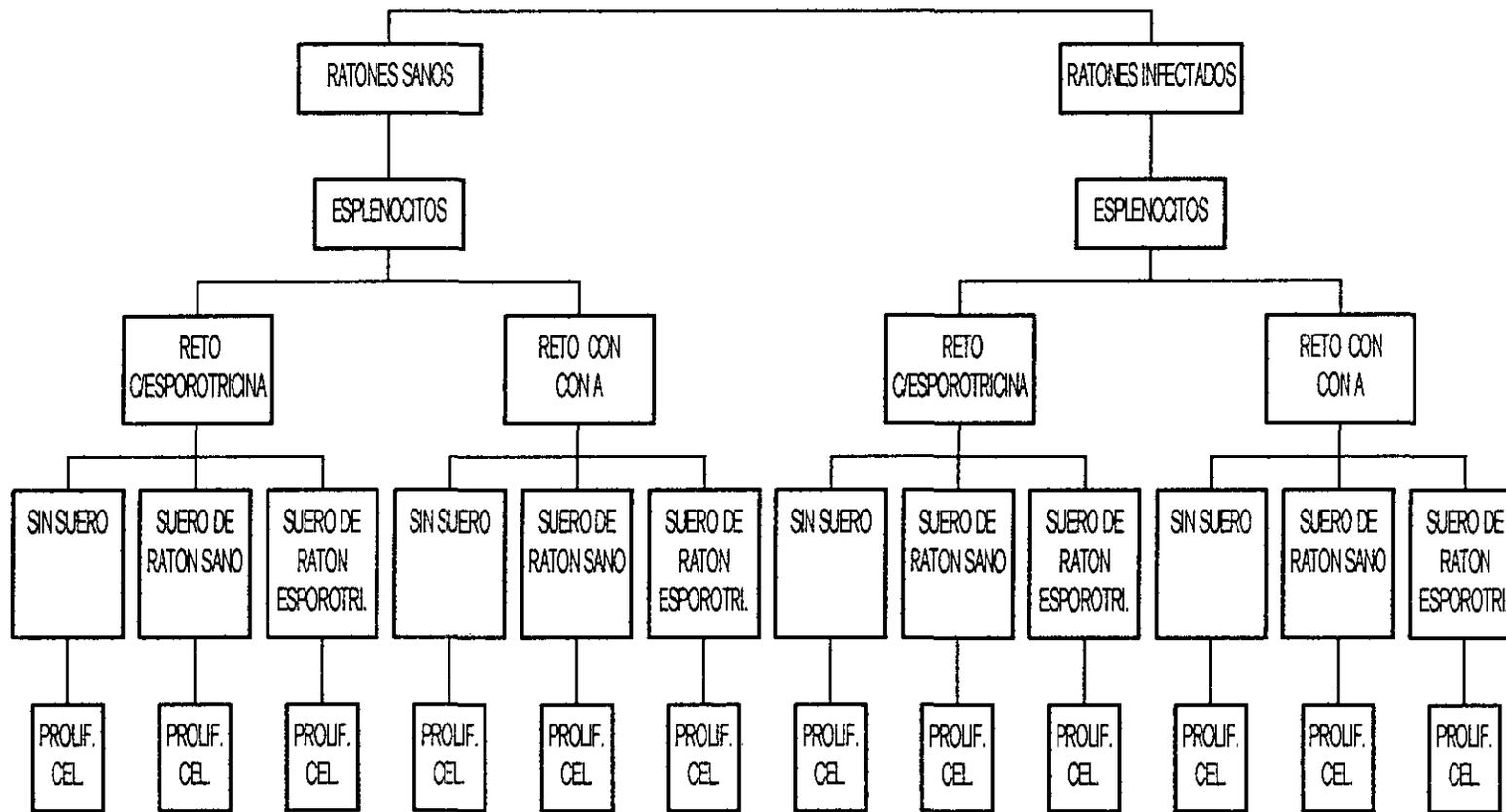
CUCBA



**Fig. 1**  
**INMUNIDAD CELULAR *in vivo***



**Fig. 2**  
**INMUNIDAD CELULAR *in vitro***



**Fig. 3**  
**PREPARACION DE LA ESPOROTRICINA**  
**(METODO GONZALEZ -OCHOA)**

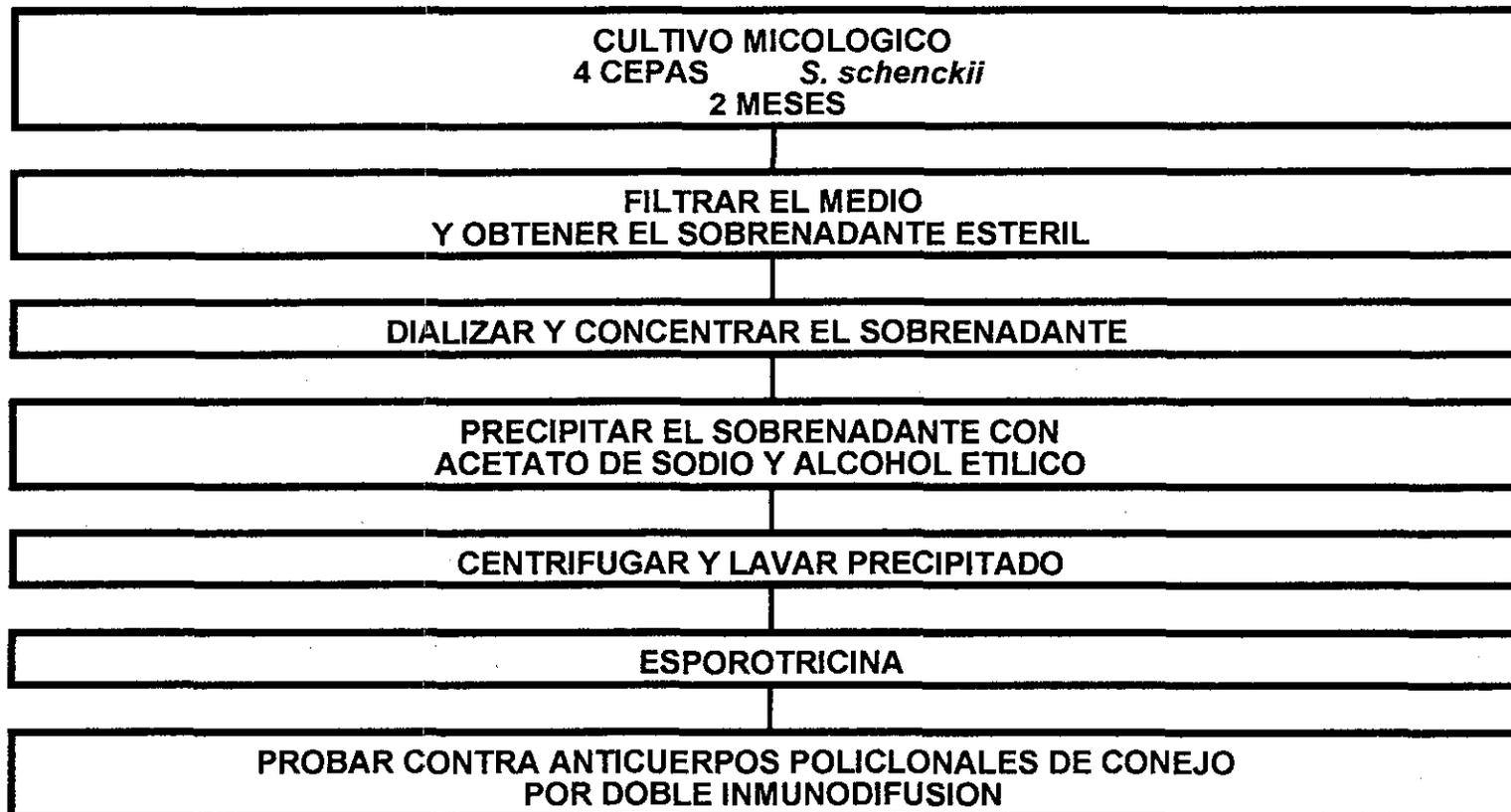


Fig. 4  
 OBTENCION Y CONDICIONES DE LAS MUESTRAS

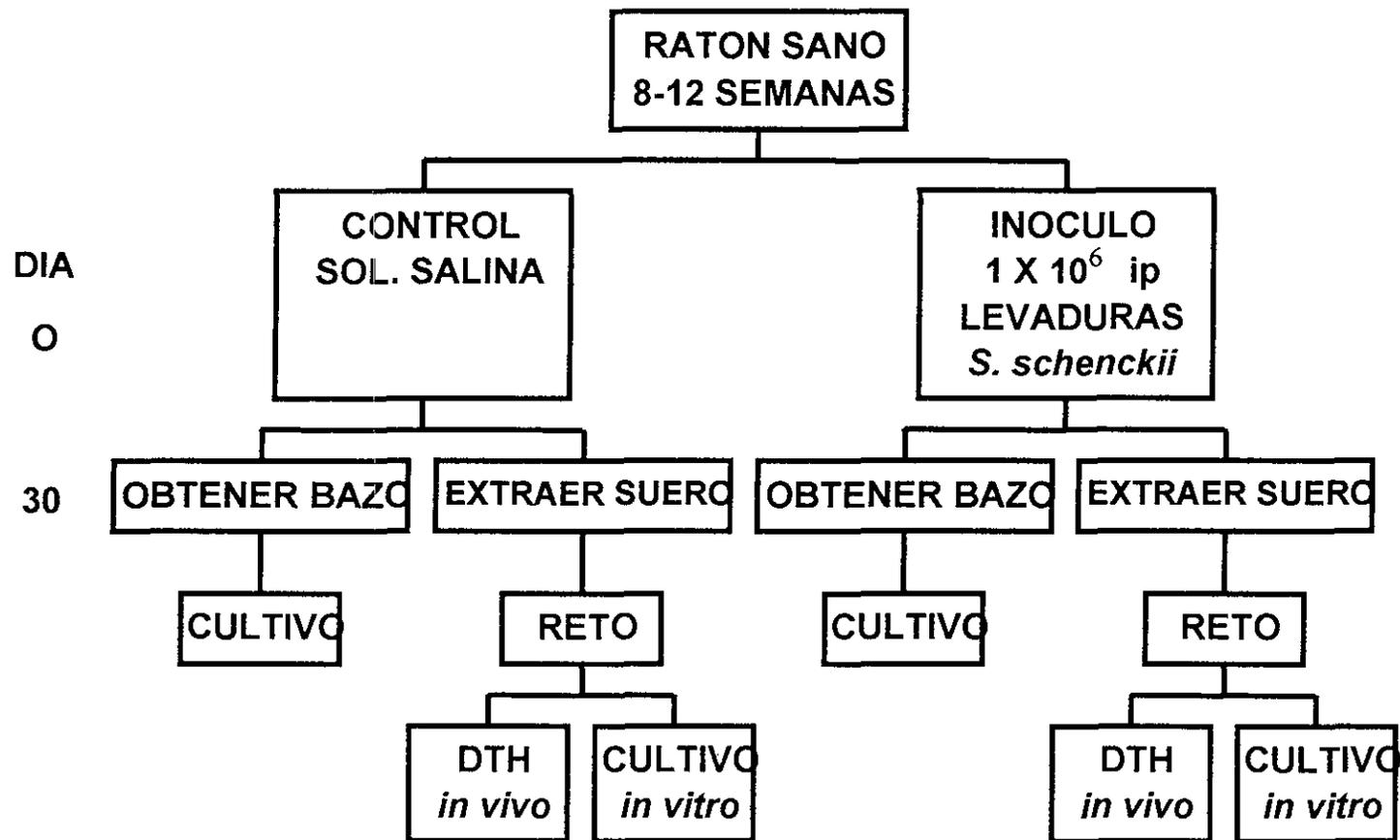


Fig. 5  
HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA AL DNFB

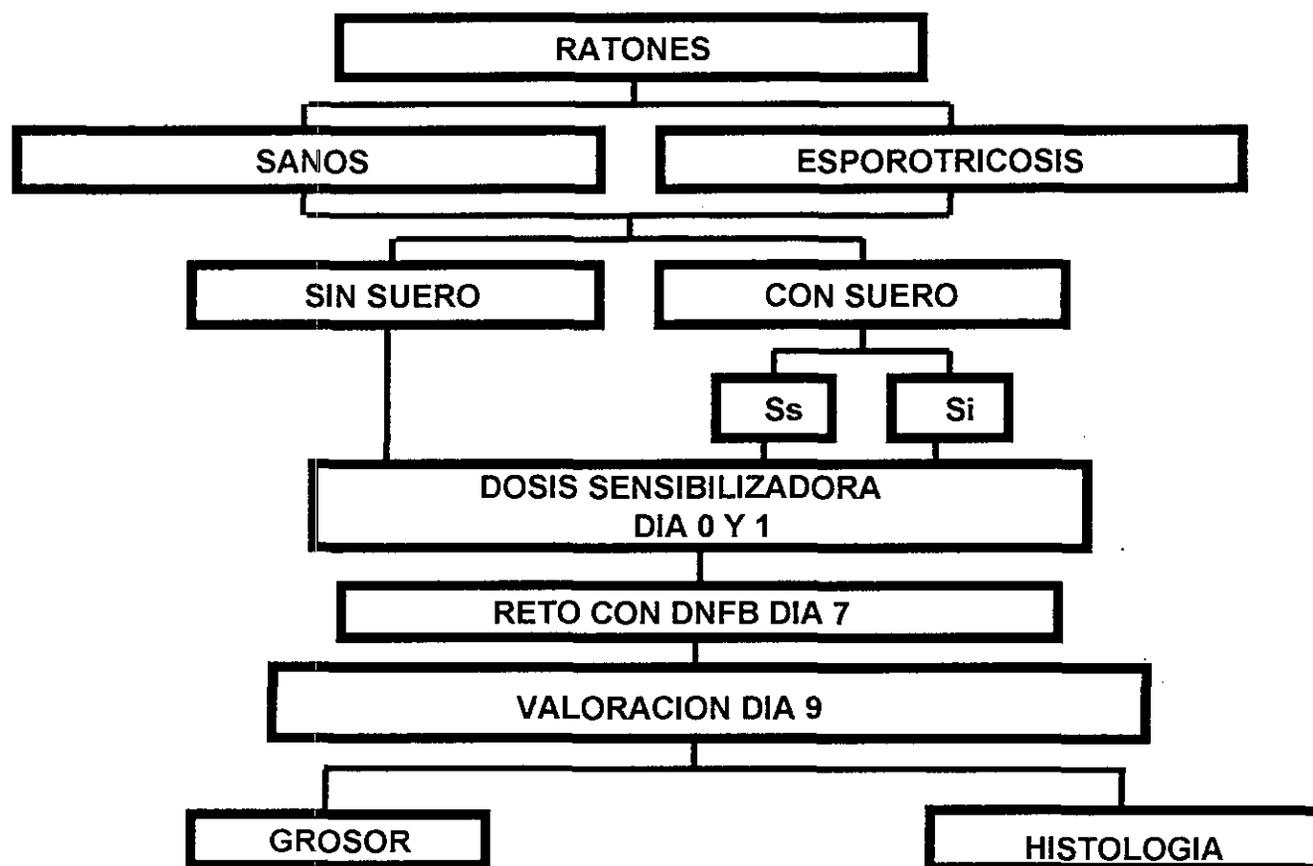
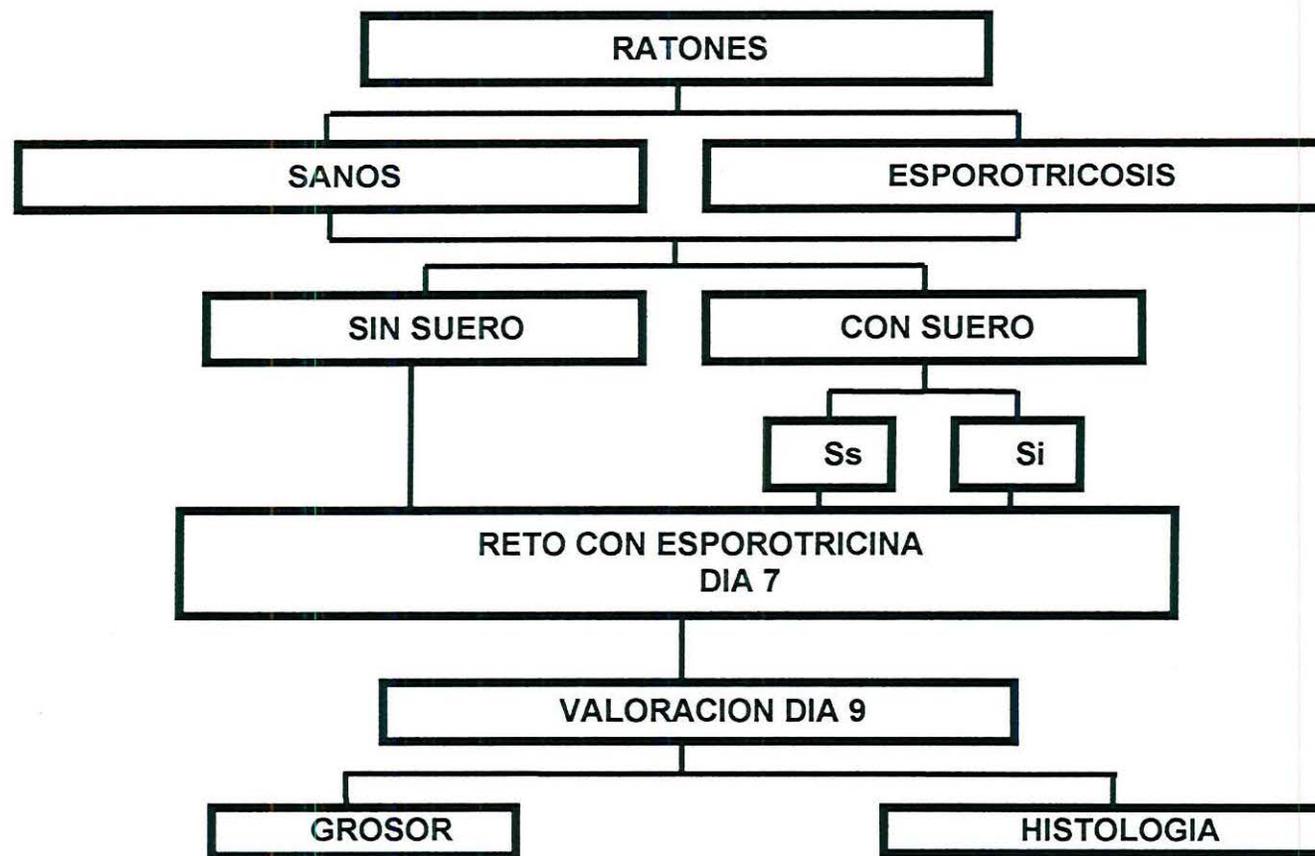


Fig. 6  
HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA  
A LA ESPOROTRICINA



**Fig. 7**  
**SEPARACION DE CELULAS MONONUCLEARES**

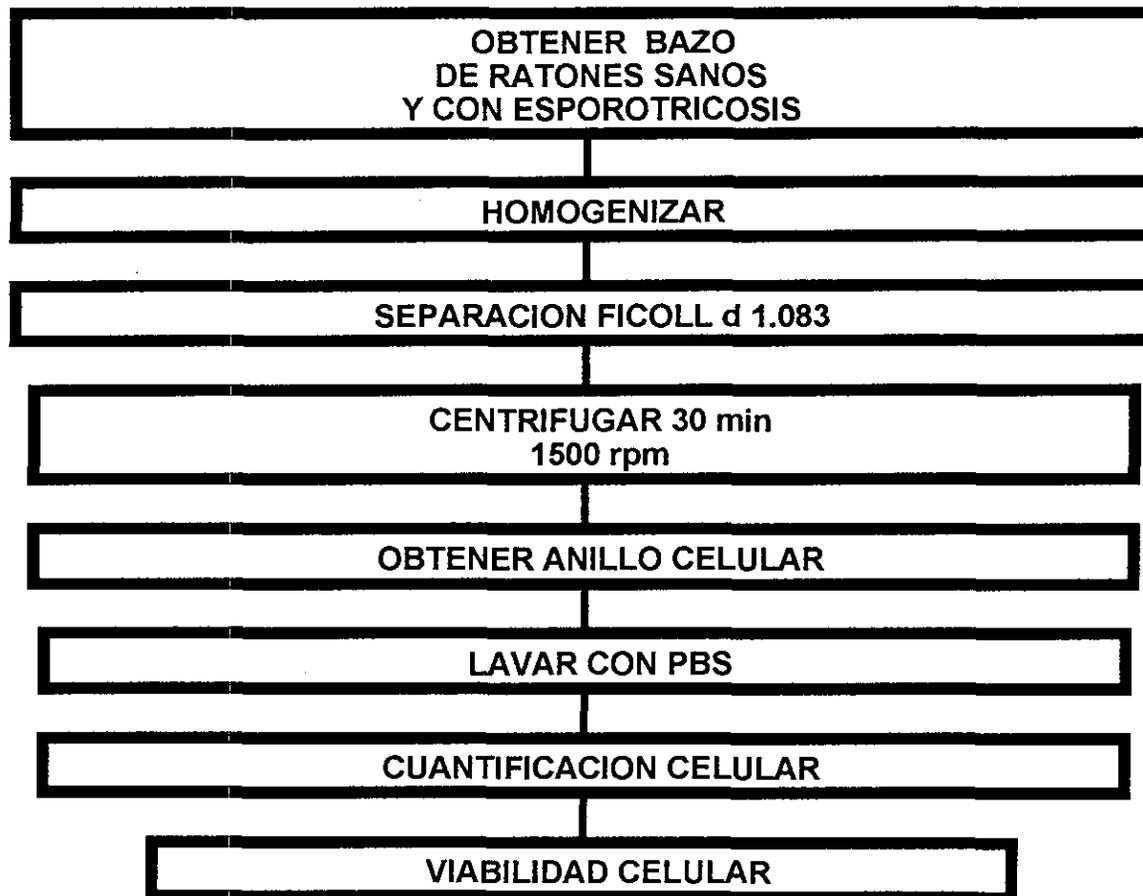
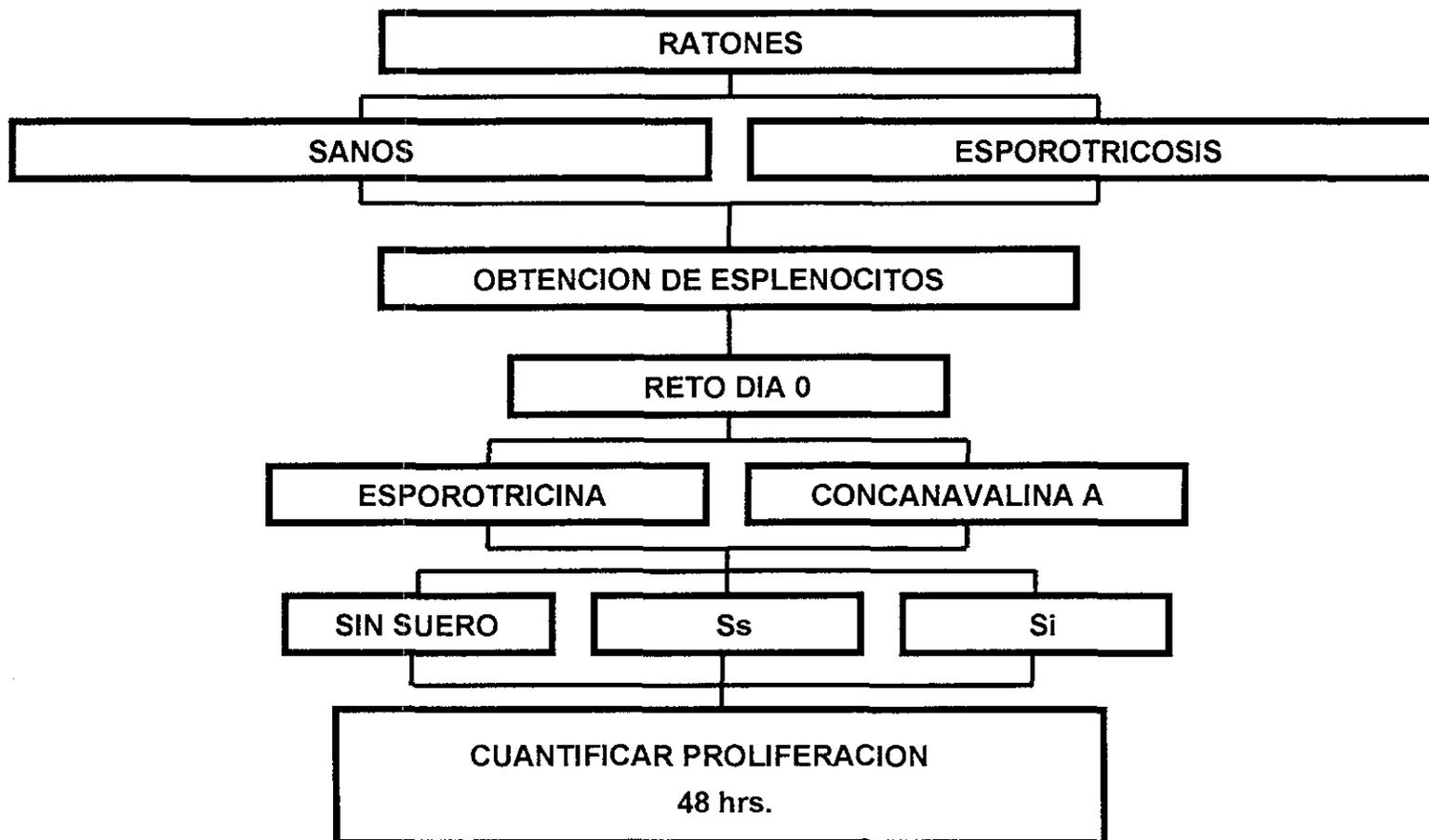
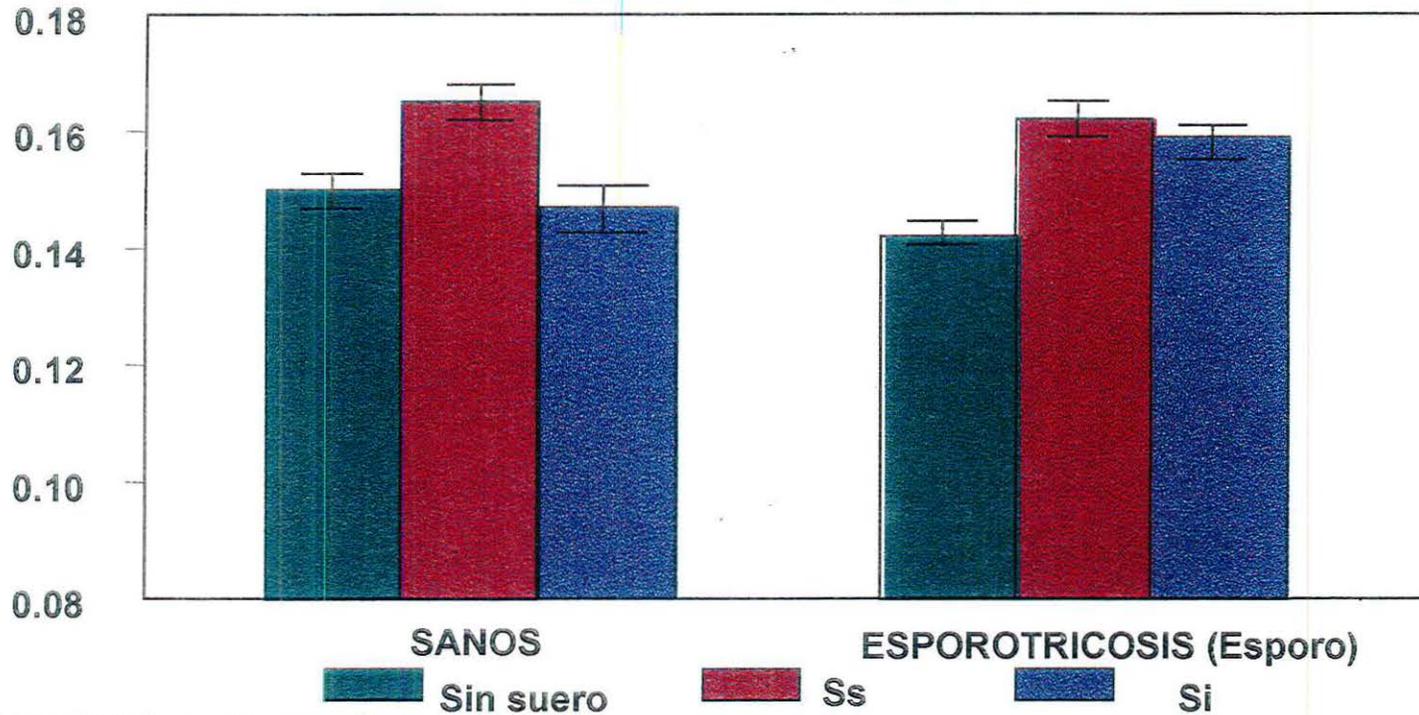


Fig. 8  
PROLIFERACION CELULAR ESTIMULADA CON  
ESPOROTRICINA O CON CONCANAVALINA A



GROSOR PABELLON AURICULAR A LAS 48 h ( $\mu\text{m}$ )

Fig. 9  
HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA AL  
DNFB  
EN RATONES TRANSFERIDOS CON Ss o  
Si



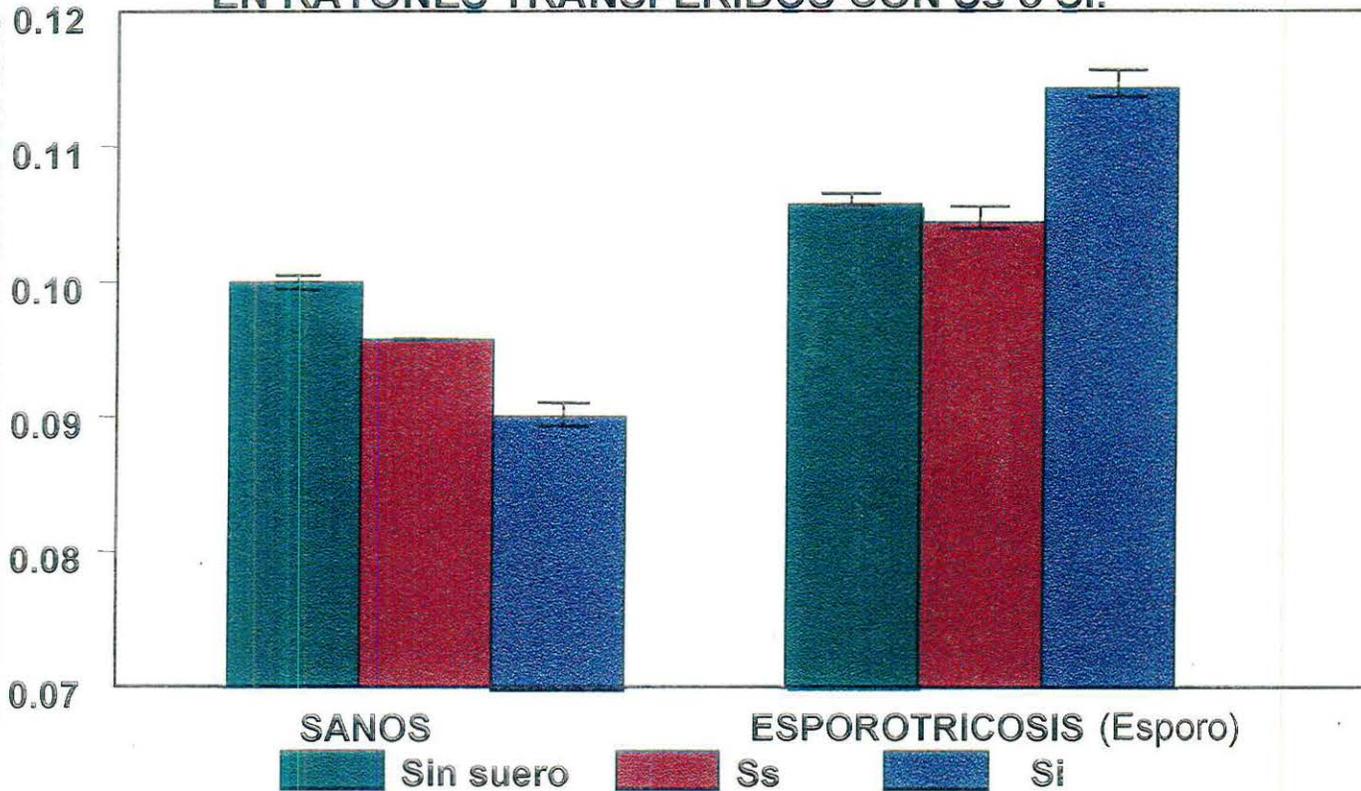
$p < 0.005$  CTL Ss vs Esporo Ss.

$p < 0.05$  CTL Ss vs CTL Si, Esporo Si.

n = 5 ratones por grupo en 3 experimentos independientes.

GROSOR COJINETE PLANTAR A LAS 48 h ( $\mu\text{m}$ )

Fig. 10  
HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A LA ESPOROTRICINA  
EN RATONES TRANSFERIDOS CON Ss o Si.



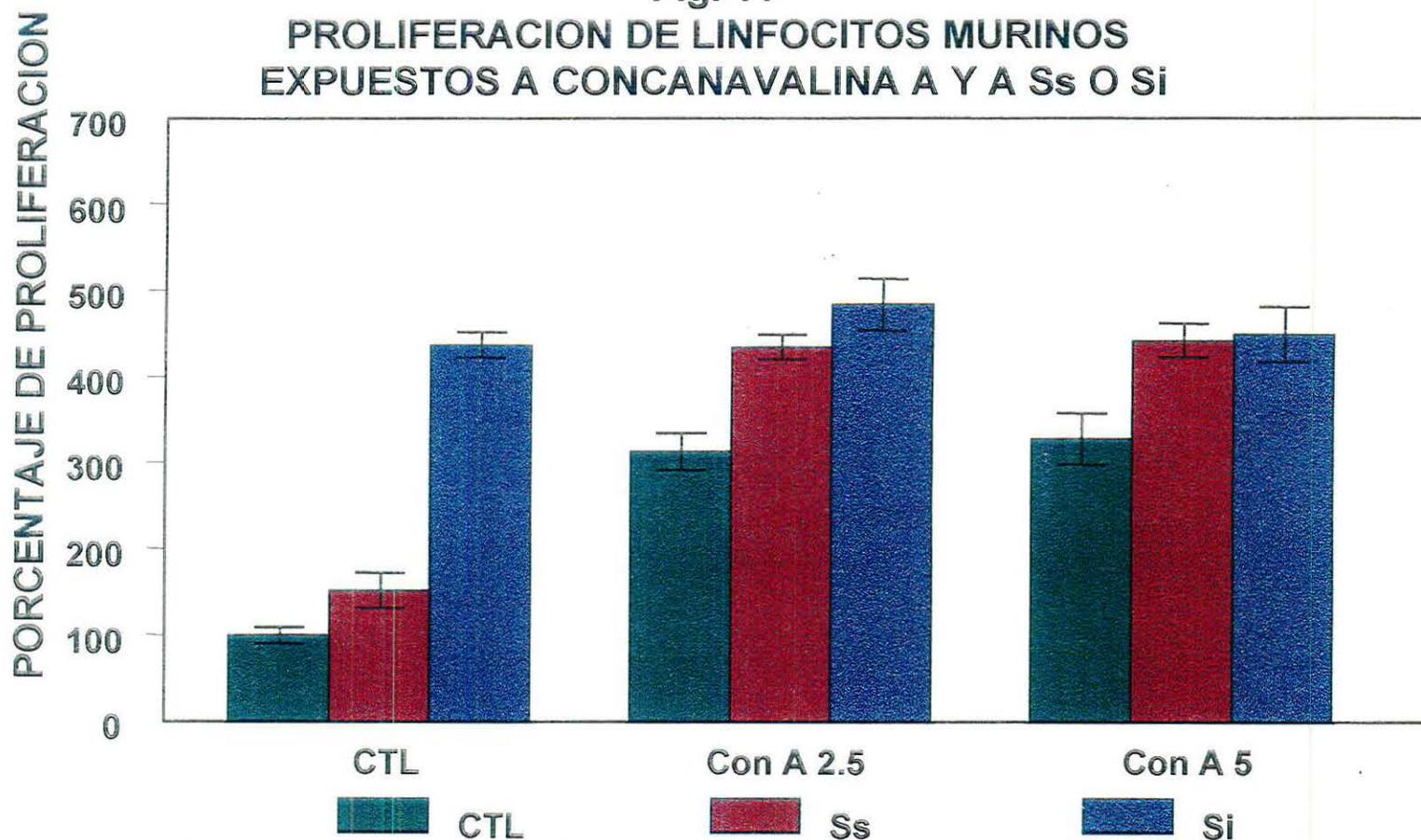
$p < 0.005$  CTLSi vs Esporo, Esporo Ss, Esporo Si.

$p < 0.05$  CTLss vs CTLSi, Esporo, Esporo Si.

$p < 0.05$  Esporo Si vs Esporo, Esporo Ss.

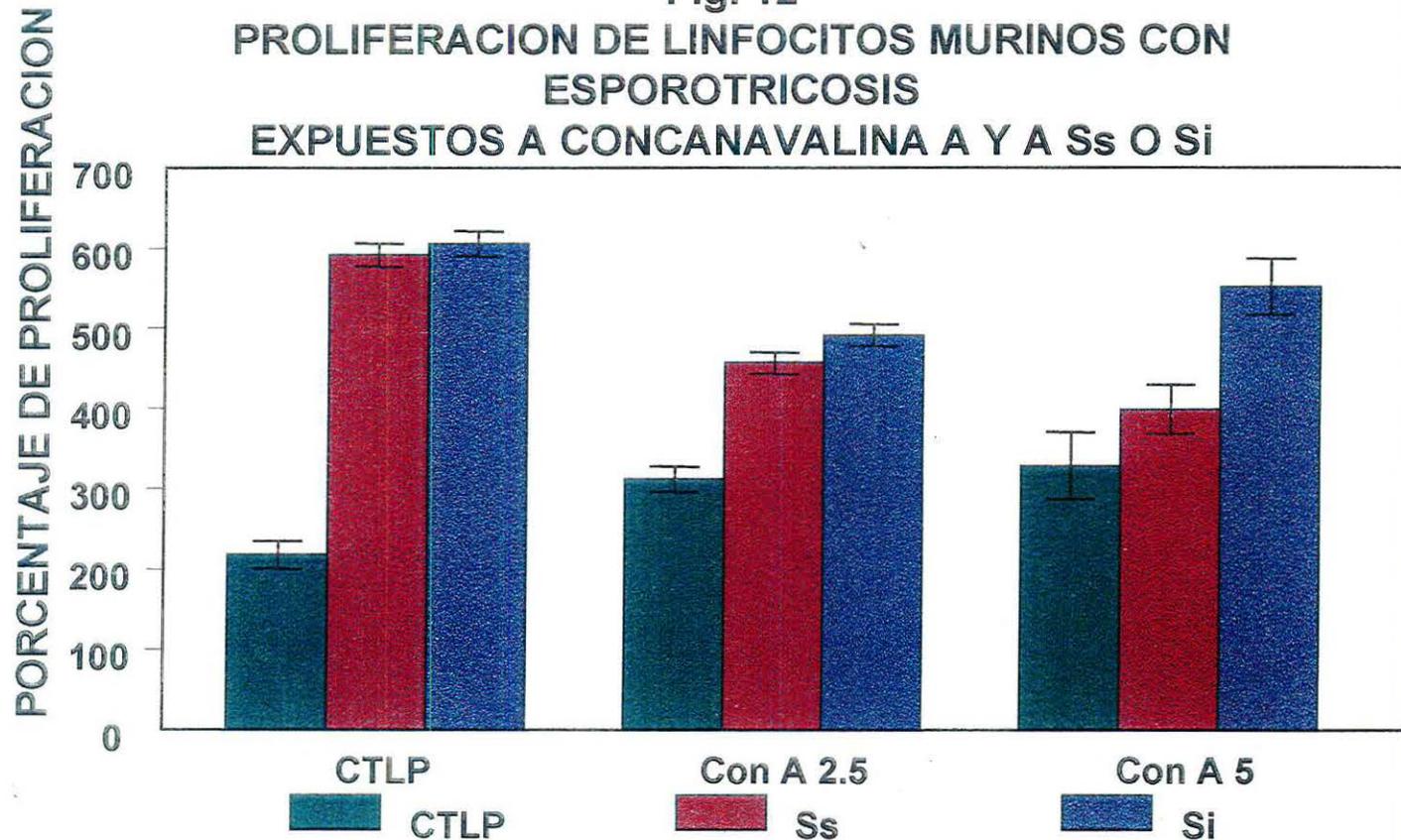
n= 5 ratones por grupo en 3 experimentos independientes.

Fig. 11  
**PROLIFERACION DE LINFOCITOS MURINOS  
 EXPUESTOS A CONCANAVALINA A Y A Ss O Si**



$p < 0.001$  CTLs vs todos los grupos; Con A 2.5 vs todos los grupos excepto Con A 5.  
 $p < 0.001$  CTL Ss vs todos los grupos.  
 $p < 0.05$  Con A 5 vs Ss+Con A 2.5, Ss+Con A 5, CTL Si, Si+Con A 2.5 y Si+Con A 5.  
 n= 15 ratones (3 experimentos independientes).

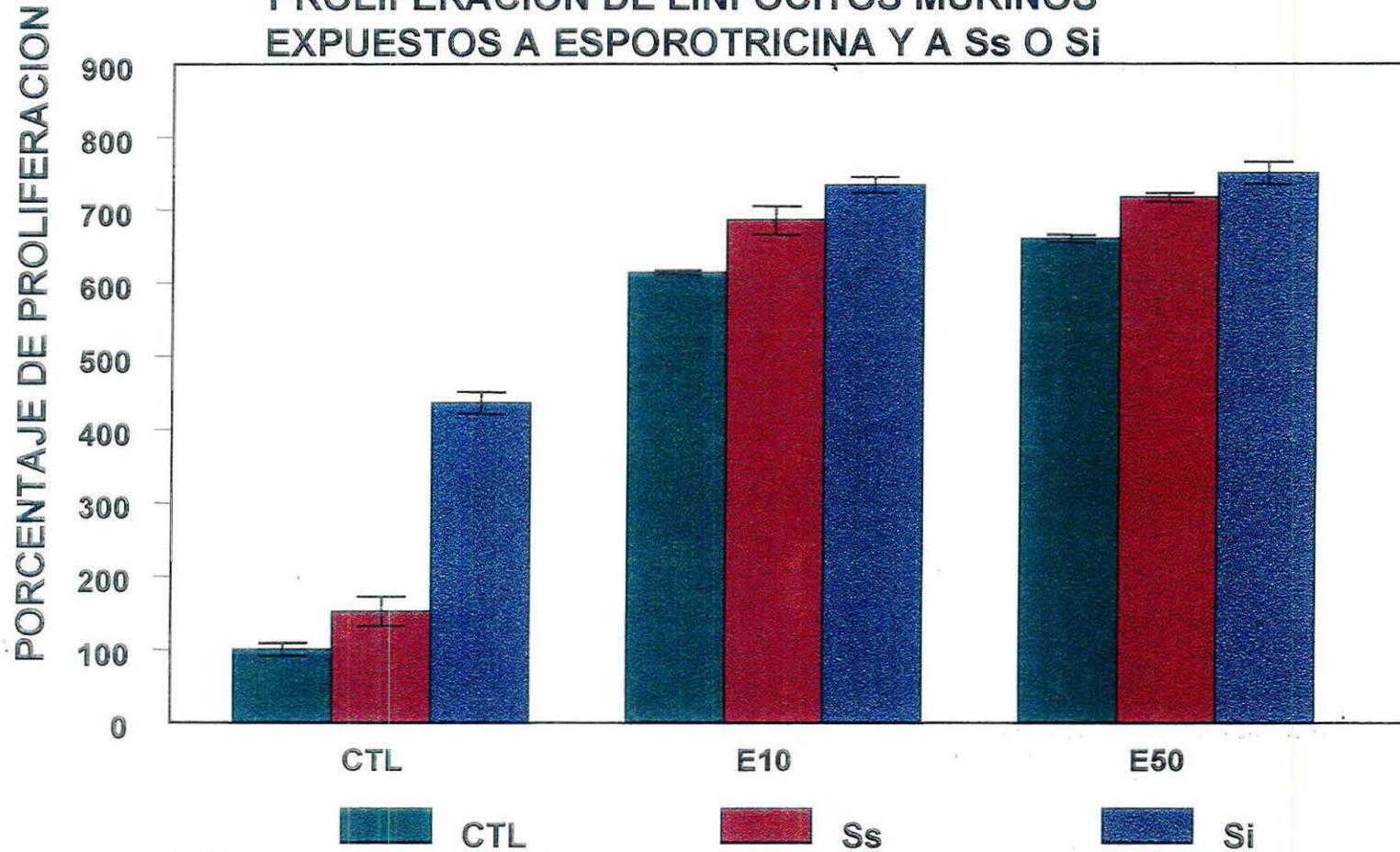
Fig. 12  
 PROLIFERACION DE LINFOCITOS MURINOS CON  
 ESPOROTRICOSIS  
 EXPUESTOS A CONCAVALINA A Y A Ss O Si



p < 0.001 Ss vs CTLP, Con A 2.5, Ss+Con A 2.5, Ss+Con A 5, Si+Con A 2.5.  
 p < 0.001 Si vs CTLP, Con A 2.5, Ss+Con A 2.5, Ss+ Con A 5.  
 p < 0.001 CTLP vs Con A 2.5, Ss+Con A 2.5, Ss+Con A 5, Si+Con A 2.5; Con A 2.5 vs Ss+Con A 2.5, Si+Con A 2.5.  
 p < 0.05 Ss y Si vs Con A 2.5; CTLP vs Si+Con A 2.5; Con A 2.5 vs Si+Con A 5.  
 p < 0.05 Con A 5 vs todos los grupos excepto Ss+Con A 5.  
 n = 15 ratones (3 experimentos independientes).

Fig. 13

PROLIFERACION DE LINFOCITOS MURINOS  
EXPUESTOS A ESPOROTRICINA Y A Ss O Si



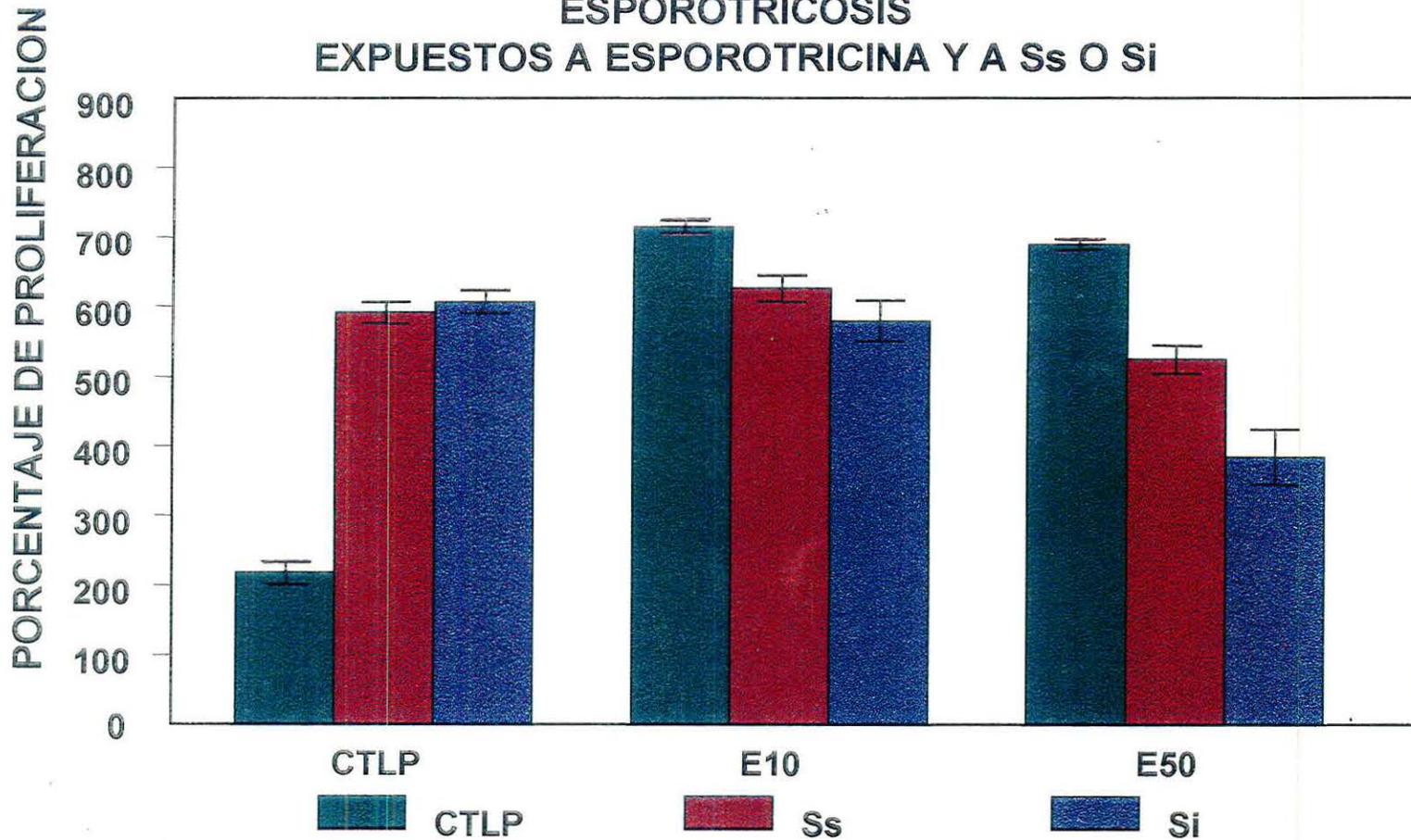
$p < 0.001$  CTL Si vs todos los grupos; CTL Si vs E10, E50, E10+Si, E50+Si.

$p < 0.05$  CTL Si vs Ss+E10, Ss+E50.

$p < 0.05$  CTL E10 vs CTL E50, Ss+E50, Si+E10, Si+E50; CTL E50 vs Ss+E50, Si+E50.

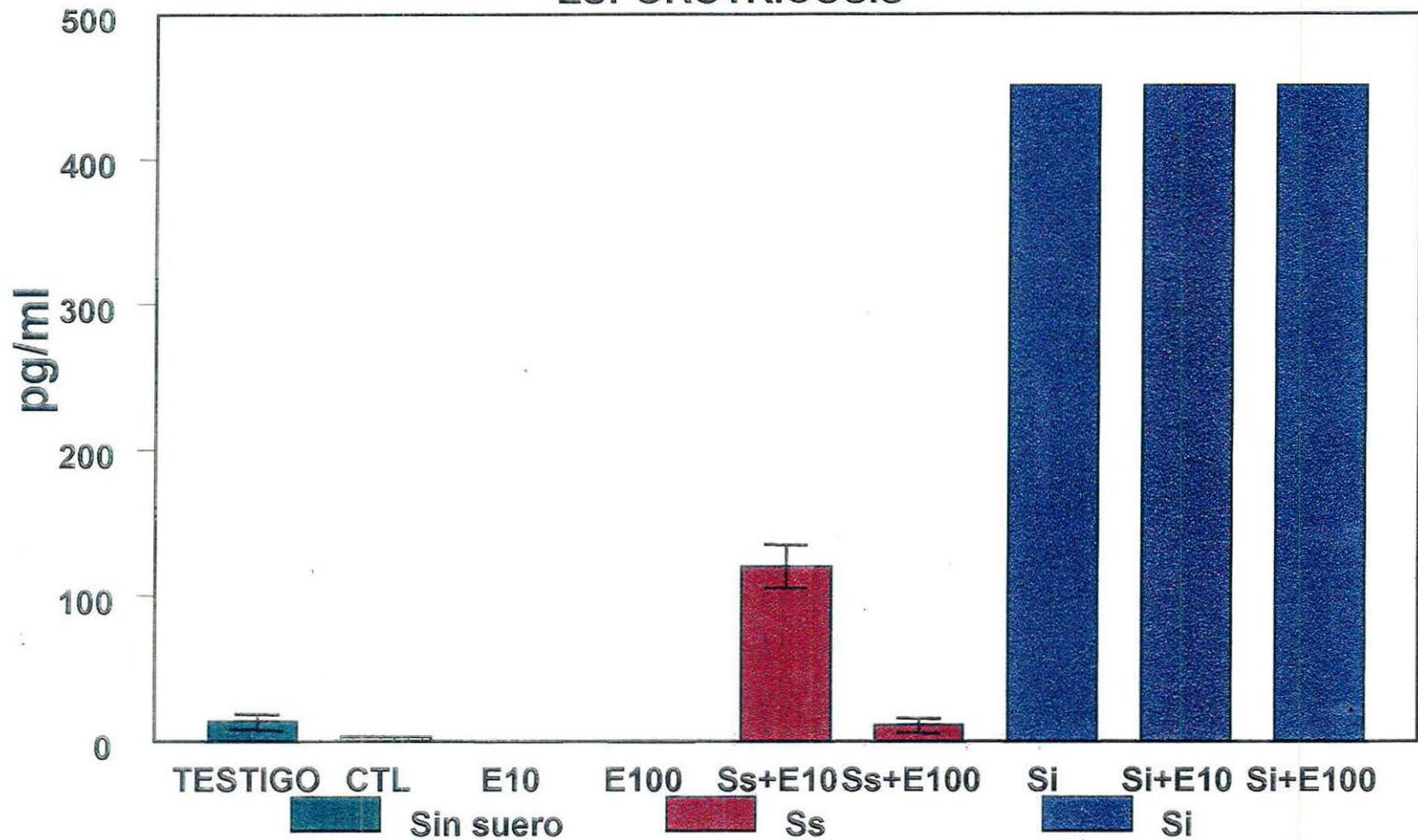
n = 15 ratones (3 experimentos independientes).

Fig. 14  
 PROLIFERACION DE LINFOCITOS MURINOS CON  
 ESPOROTRICOSIS  
 EXPUESTOS A ESPOROTRICINA Y A Ss O Si



$p < 0.001$  CTLP E10 vs Ss, CTLP, Ss+E10, Ss+E50, Si+E10, Si+E50.  
 $p < 0.001$  E50 vs Si, CTLP, Ss+E10, Ss+E50, Si+E10, Si+E50; Ss+E10 vs Si+E50.  
 $p < 0.05$  Ss vs Ss+E50; E50 vs Ss+E10, Si+E10; Ss+E10 vs Ss+E50.  
 $n = 15$  ratones (3 experimentos independientes).

**Fig. 15**  
**IL-1B DE CULTIVO DE ESPLENOCITOS DE RATONES CON**  
**ESPOROTRICOSIS**



$p \leq 0.0001$  Si, Si+E10 y Si+E100 vs TESTIGO, CTL, E10, E100, Ss+E10 y Ss+E100.  
 n= 3 experimentos independientes.

# CUADROS

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

**CUADRO 1**  
**SUPRESION E INFILTRADO INFLAMATORIO**  
**EN LA VALORACION DE LA HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA AL**  
**DINITROFLUOROBENCENO EN RATONES BALB/c CON ESPOROTRICOSIS**  
**TRANSFERIDOS CON SUERO DE RATONES CONTROL (Ss) Y CON**  
**ESPOROTRICOSIS (Si).**

GRUPOS	% SUPRESION	INFILTRADO
Control	No supresión	+++
Control Ss	No supresión	+++
Control Si	2%	+++
Esporotricosis	No supresión	+++
Esporotricosis Ss	5%	+++
Esporotricosis Si	No supresión	+++

**CUADRO 2**  
**SUPRESION E INFILTRADO INFLAMATORIO**  
**EN LA VALORACION DE LA HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A LA**  
**ESPOROTRICINA EN RATONES BALB/c CON ESPOROTRICOSIS**  
**TRANSFERIDOS CON SUERO DE RATONES CONTROL (Ss) Y CON**  
**ESPOROTRICOSIS (Si).**

GRUPOS	% SUPRESION	INFILTRADO
Control	No supresión	+++
Control Ss	3%	+++
Control Si	7%	++
Esporotricosis	No supresión	+++
Esporotricosis Ss	No supresión	+++
Esporotricosis Si	No supresión	+++

# DISCUSSION

## DISCUSION

Los estudios sobre la respuesta inmune inespecífica como la fagocitosis, no han permitido establecer cual es el mecanismo por el cual la respuesta inmune no es eficiente contra la esporotricosis y por lo tanto favorece la enfermedad (37).

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios se han enfocado en el mecanismo intrínseco de la fagocitosis, donde las células que han mostrado cierto efecto microbicida contra *S. schenckii*, son los PMN's (42).

A la luz de la inmunología actual, los PMN's no son las únicas células eficientes contra los hongos, entre las más importantes se destaca el macrófago, que a pesar de estar presente en el tejido infectado, al parecer es ineficaz contra *S. schenckii* y requiere de ciertos estímulos para ser activado y a su vez estimular a otras células de la respuesta inmune como los linfocitos T, estos últimos pueden colaborar a establecer una respuesta inmune celular específica eficiente (57). Los estudios del mecanismo de patogénesis de la esporotricosis, en general se han centrado en el proceso fagocítico y han dejado a un lado al resto de las células que participan en la respuesta inmune específica, a pesar de que la inmunidad celular está presente en los estudios de transformación blastoide con fitohemaglutinina y la enfermedad persiste (52), indicando una incapacidad de esta inmunidad para limitar la infección.

Por otro lado, en otros modelos de micosis con *Candida albicans*, se ha reportado la presencia de factores con función supresora de la respuesta inmune como las mananas (71,72,73).

Es posible que la relación del macrófago y linfocito T para inducir una respuesta inmune celular eficiente contra *S. schenckii*, sea inhibida por factores supresores presentes. Esta investigación se centra en demostrar que el suero proveniente de ratones con esporotricosis tiene efecto supresor de la inmunidad celular, tratando de sostener que la relación de la inmunidad humoral y celular son necesarias para obtener un efecto antimicótico.

El estudio comprendió dos fases: *in vivo* e *in vitro*, utilizando en los dos casos antígenos de *S. schenckii* (esporotricina) y antígenos distintos a este (DNFB y Con A), estos dos últimos, con el objetivo de determinar si existe supresión selectiva hacia *S. schenckii*.

Los resultados de la fase *in vivo* en la respuesta de hipersensibilidad retardada al DNFB, mostró que lo observado tanto en ratones sanos como con esporotricosis transferidos con Ss o Si, no mostraron una alteración o inhibición significativa (fig. 9); pero al utilizar la esporotricina, se observó una disminución ligera (supresión del 16%), pero significativa ( $p < 0.05$ ) en el grupo de ratones sanos con Si con respecto a los ratones con esporotricosis. Es posible que esta disminución sea una falta de respuesta debida a una ausencia de primoinfección a *S. schenckii*, la cual sí está presente en los ratones con

esporotricosis que tenían 30 días expuestos *in vivo* a *S. schenckii* y presentaron un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el grosor del cojinete plantar (62) (fig. 10).

Es de considerar que al comparar el mismo grupo de ratones sanos con Si, contra el control sin suero, el primero muestra una supresión de solo el 7% (fig. 10).

Para estimular la respuesta inmune celular proliferativa contra un antígeno distinto a *S. schenckii* se utilizó el mitógeno Con A.

Es evidente que el grupo de células de ratones sanos con Ss y Si aumentó la respuesta inmune celular *in vitro* casi de la misma forma (fig. 11), esto es posible ya que tanto el Ss como el Si contienen factores que pueden favorecer la proliferación celular.

La respuesta celular tanto *in vivo* como *in vitro* a un estímulo distinto a *S. schenckii*, no mostró una correlación debido a que son antígenos diferentes. En el primer caso el DNFB es un antígeno químico con un alto potencial de inducir respuesta inmune celular, donde no se observa un efecto del suero, además de inducirse dos sensibilizaciones previas; en el caso de los estudios *in vitro*, se utilizó Con A, mitógeno para el cual *S. schenckii* presenta receptores. Por lo tanto, en los grupos con esporotricosis estimulados con Ss o Si, se observó un efecto disminuido al agregar a éstos Con A (fig. 12).



El grupo de linfocitos de ratones con esporotricosis estimulados con Con A, tanto con 2.5  $\mu\text{g}$  como con 5.0  $\mu\text{g}$ , mostró un aumento en la proliferación celular, al incluir suero de ratones sanos o con esporotricosis (fig. 12). El aumento de la respuesta inmune en los grupos con Con A y Ss o Si, fue ligeramente mayor en los grupos con esporotricosis. Se ha demostrado *que S. schenckii* presenta receptores a Con A (49), siendo posible que quizá en este estudio, se une la Con A a los receptores de membrana de *S. schenckii*, utilizándose solo aquella que no se une por lo que vemos un efecto parcial.

Este modelo no evidenció actividad supresora de la proliferación contra un antígeno distinto como Con A.

Es evidente la respuesta proliferativa de los ratones con esporotricosis, tanto con suero de ratones sanos (Ss) como de ratones infectados (Si), ya que a pesar de no tener Con A tuvieron un incremento significativo, debido probablemente a la presencia de antígenos de *S. schenckii* presentes en las células infectadas, tales como mananas o ramnosa (44,45,46) (fig. 12).

Lo anterior se correlaciona con lo ya reportado en otros estudios en el sentido de que los infectados con esporotricosis muestran una respuesta inmune celular normal, a pesar de no poder eliminar la infección, pero al comparar los grupos sin Con A contra los grupos con Con A (tanto 2.5  $\mu\text{g}$  como 5  $\mu\text{g}$ ), estos dos últimos mostraron una disminución significativa.

Probablemente debido a que *S. schenckii* presenta receptores para Con A, los cuales quizá, son liberados al medio y bloqueados por un posible efecto sinérgico entre la Con A y el suero (fig. 12).

Si bien la respuesta proliferativa disminuyó con Ss y E10 o E50, no mostró diferencia significativa en los grupos control de ratones con esporotricosis (CTLP) pero sin estímulo con E10 o E50 (fig. 14).

El efecto esperado en este estudio era la supresión de la respuesta inmune con Si ante un estímulo antigénico de *S. schenckii* (esporotricina), este no se observó en el ratón sano (fig.13), pero sí en el grupo de células de ratones infectados que presentan una disminución de la proliferación con Si (fig. 14). Lo anterior sugiere que probablemente existen factores supresores de la respuesta inmune celular presentes en el suero de ratones con esporotricosis, que quizá son estimulados por la presencia de antígenos de la superficie de *S. schenckii*, como manosa, ramnosa y galactosa, los cuales posiblemente ocasionan una disminución en la respuesta proliferativa.

La IL-1 $\beta$  es la segunda señal emitida por los macrófagos para estimular la respuesta proliferativa, si bien el sobrenadante de cultivo de linfocitos de ratones con esporotricosis estimulados con Si, mostró una elevación en la concentración de IL-1 $\beta$ , este incremento se inhibió al agregar antígeno de *S. schenckii* (E10 y E100) (fig. 15). Esto se correlaciona con el efecto observado en la respuesta

proliferativa *in vitro* (fig. 14), donde con la presencia de los mismos factores Si y E10 o E50, disminuyen la respuesta.

Al parecer la presencia del antígeno de esporotricosis inhibe la respuesta inmune, sobre esto se han sugerido diversos mecanismos para explicarlo, entre ellos se destaca la inhibición de interleucinas, interferon  $\gamma$  y factor de necrosis tumoral, quizá debido a la presencia de factores supresores inducidos probablemente por el hongo.

Estos factores supresores probablemente presentes en la esporotricosis, pudieran ser:

1. Mananas. En algunos hongos dimórficos, las mananas (cadena de manosas) han mostrado actividad inhibitoria de la fagocitosis (71,72,73,74). En el caso de *S. schenckii*, las mananas, ramnosa y galactosa son los principales constituyentes de la superficie antigénica de la pared celular (44,45). Es posible que las mananas puedan tener también un efecto inhibitorio de la fagocitosis de *S. schenckii*. Si el suero de pacientes con esporotricosis, tuviera presente estos azúcares simples liberados por *S. schenckii*, sugeriría una posible supresión sobre la respuesta inmune celular, datos no demostrados hasta la fecha.

2. Proteasas. *S. schenckii* produce dos proteasas, la I, que es una serina proteasa que se inhiben por quimiostatina; la segunda es proteasa II que se inhibe por la pepstatina. La adición de pepstatina y de quimiostatina juntas al medio de cultivo de *S. schenckii*, inhibe su crecimiento celular, y quizá estas mismas proteasas tienen un efecto adverso contra la respuesta inmune celular al permitir o favorecer el crecimiento de la levadura (75).
  
3. Factores solubles supresores. Es posible que existan otros factores supresores presentes en el suero, como complejos inmunes o el factor soluble supresor de la respuesta inmune (SIRS), aun no estudiado en la esporotricosis, y el cual se puede convertir a un factor supresor de macrófagos (MqSF), que suprime la respuesta de anticuerpos y la síntesis de ADN en células T y B; sugerimos este factor, debido a que puede ser bloqueado a través de KI (76,77,78,79,80) que es el tratamiento de elección en la esporotricosis localizada.

Sobre el SIRS, se ha descrito es el producto de linfocitos T activados con Con A, y esta a su vez puede opsonizar al antígeno de la pared celular de *S. schenckii*, el peptido ramnomansa (44,45). Lo anterior nos permite sugerir que quizá estos SIRS tengan un papel negativo en la eficiencia para destruir a *S. schenckii*.

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES.

1. La transferencia de suero de ratones con esporotricosis adicionado con esporotricina, inhibe la respuesta inmune celular específica *in vitro* contra *S. schenckii*, en ratones con esporotricosis, al compararse con los grupos con esporotricina .
2. En el modelo murino de esporotricosis, la transferencia sérica de ratones adicionada con esporotricina, no modificó *in vivo* e *in vitro* la proliferación celular estimulada con Con A, ni la hipersensibilidad retardada contra DNFB, en ratones sanos o con esporotricosis.

ABORA

# SUGERENCIAS DEL ESTUDIO

## SUGERENCIAS DEL ESTUDIO

1. Identificar cual es el mecanismo supresor del suero de ratones infectados a través de 2 líneas:

- a) Fraccionar el suero de ratones con esporotricosis, por cromatografía e identificar los fragmentos supresores de la inmunidad celular.
- b) Evidenciar el papel del suero de ratones con esporotricosis en la respuesta inmune humoral.
- c) Evidenciar el papel del suero de ratones con esporotricosis en la producción de las principales citocinas.

2. Identificar la presencia de antígenos de *S. schenckii* en el suero de sujetos con esporotricosis.

# GLOSARIO

## GLOSARIO

ADN	= Acido desoxirribonucleico
°C	= grados centígrados
Con A	= Concanavalina A
Con A 2.5	= Concanavalina A a concentración de 2.5 µg/ml
Con A 5.0	= Concanavalina A a concentración de 5.0 µg/ml
CTL	= control
DNFB	= Dinitrofluorobenceno
DTH	= Hipersensibilidad retardada
E	= esporotricina
E10	= esporotricina 10 µl
E50	= esporotricina 50 µl
ESPORO	= esporotricosis
g	= gramo
h	= hora
IL-1β	= Interleucina 1β
ip	= intraperitoneal
KI	= yoduro de potasio
µm	= micrómetro
ml	= mililitro
MPO	= mieloperoxidasa
MqSF	= factor supresor de macrófagos
NAT	= nitroazul de tetrazolio
nm	= nanómetro
pg	= picogramos
p/v	= peso-volumen
PMN's	= polimorfonucleares
%	= porcentaje
QL	= quimioluminiscencia
rpm	= revoluciones por minuto
RPMIs	= RPMI-1640 suplementado
Si	= suero de ratones con esporotricosis
SIRS	= factor soluble supresor de la respuesta inmune
spp	= especie
Ss	= suero de ratones sanos
SIDA	= síndrome de inmunodeficiencia adquirida
VIH	= virus de la inmunodeficiencia humana

# BIBLIOGRAFIA

**BIBLIOGRAFIA.**

1. Mitchell T.G.: Subcutaneous Mycoses. En: Joklik W.k., Willet H.P. y Amos D.B. Zinsser Microbiology. 18ª. Ed. Appleton-Century-Crofts Norwalk, Connecticut. (eds.) 1984:1161-1165.
2. Carlos I.Z., Sgarbi D.B., Angluster J., Alviano C.S. y Silva C.L.: Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. Mycopathologia 1992 117:139-144.
3. Arenas R.: Esporotricosis. En: Micología Medica Ilustrada. Ed. Interamericana Mc Graw Hill México 1993:145-151.
4. González-Mendoza A., Melendez-Ruiz C.E. y Ramos-Zepeda R.: Phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Sporothrix schenckii* in patients with sporotrichosis. Proc. 5<sup>th</sup> Internat. Conf. On Mycoses Sc. 1980 Pub 396 PHO, 308-311.
5. Ramos-Zepeda R. y González-Mendoza A.: Metabolic activity of phagocytes in experimental sporotrichosis in Syrian hamsters. Infect Immun 1979 23:366-372.
6. Orozco-Barocio A.: Inmunotransferencia y respuesta inmune en esporotricosis experimental. Tesis de Maestría en Biología Celular, Universidad de Guadalajara. 1990 21-31.
7. Heller H.M. y Fuhrer J.: Disseminated sporotrichosis in patients with AIDS: case report and review of the literature. AIDS 1991 5:1243-1246.
8. Findlay G.H. The epidemiology of sporotrichosis in the Transvaal. Sabouraudia 1970 7:38-45.

9. Conti-Diaz I.A.: Sporotrichosis in Uruguay: epidemiologic and clinical aspects. *Mycoses* 1980:312-321.
10. Mackinnon J.E., Conti-Diaz I.A., Gezuele E., Civilia E. y Da Luz S.: Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations on its pathogenicity and ecology. *Sabouraudia* 1970 7:38-45.
11. Cooper C.R., Dixon D.M. y Salkin I.F.: Laboratory-acquired sporotrichosis. *J Med Vet Mycol* 1992 30:169-171.
12. Vismer H.F. y Hull P.R.: Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa. *Mycopathologia*.1997 137(3):137-143.
13. Connant N.F., Smith D.T., Baker R.D. y Callaway J.L.: Esporotricosis. En: *Micologia*. 3ª Ed. Interamericana México 1971:323-355.
14. Dixon D.M., McNeil M.M., Cohen M.L., Gellin B.G. y La Montagne J.R.: Fungal infections: a growing threat. *Public-Health-Rep* 1996 111(3):226-235.
15. Durden F.M. y Elewski B.: Fungal infections in HIV-infected patients. (Review) *Seminars in Cutaneous Medicine & Surgery* 1997 16(3):200-212.
16. Kwon-Chung K.J.: Comparison of Isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other types of lesions. *J Infect Dis* 1979 139:424-431.
17. Albornoz M.B., Mendoza M. y de Torres E.D.: Growth temperatures of isolates of *Sporothrix schenckii* from disseminated and fixed cutaneous lesions of sporotrichosis. *Mycopathologia* 1986 95:81-83.
18. Dixon D.M., Salkin I.F., Duncan R.A., Hurd N.J., Haines J.H., Kemna M.E. y Coles F.B.: Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical

- and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J. Clin Microbiol* 1991 29:1106-1113.
19. Dixon D.M., Duncan R.A. y Hurd N.J.: Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix spp.* from the largest U.S. Epidemic of sporotrichosis. *J Clin Microbiol* 1992 30:951-954.
  20. Koneman E. y Robert G.D.: *Micología Práctica de Laboratorio*. 2da Eds. Panamericana México 1987:136, 145-147.
  21. Ayala S. y Rodríguez del Valle N.: Molecular and cellular events during germination of conidia of *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* 1988 101:113-120.
  22. Rivera-Rodríguez N. y Rodríguez del Valle N.: Effects of calcium ions on the germination of *Sporothrix schenckii* conidia. *J Med Vet Micol* 1992 30:185-195.
  23. Lopes J.O., Alves S.H., Benevenga J.P. y Regio O.R.: Filamentous forms of *Sporothrix schenckii* in material from human lesions. *J Med Vet Mycol* 1992 30:403-406.
  24. Lurie H.I. y Still J.S.: The "capsule" of *Sporotrichum schenckii* and the evolution of the asteroide body a light and electron microscopic study. *Sabouraudia* 1970 7:64-70.
  25. Garrison R.G. y Mirikitani F.K.: Electron cytochemical demonstration of the capsule of yeast-like *Sporothrix schenckii*. *Sabouraudia* 1983 21:167-170.
  26. Ogawa H. Nozawa Y. Rojanavanich V., Tsuboi R. Yoshiike T., Banno Y., Takahashi M., Nombela C., Herreros E., Garcia-Saez M.I., Santos A.I. y Sanchez M.: Fungal enzymes in the pathogenesis of fungal infections. *J Med Vet Micol* 1992 30 Sup 1,189-196.

27. Vanden-Bossche H., Kobayashi G.S., Edman J.C., Keath E.J., Maresca B. y Soll D.R.: Molecular determinants of fungal dimorphism. *J Med Vet Mycol* 1992 30 Sup 1, 73-76.
28. Findlay G.H. y Vismer H.F.: Studies on sporotrichosis. *Micopathologia* 1984 87:85-93.
29. Findlay G.H. y Vismer H.F.: Studies on sporotrichosis: Fungal morphogenesis and pathogenicity in differing environments. *Mycopathologia* 1986 96:115-122.
30. Cooper C.R., Breslin B.J. Dixon D.M. y Salkin I.F.: DNA Typing of isolates associated with the 1988 sporotrichosis epidemic. *J Clin Microbiol* 1992 30:1631-1635.
31. Kaufman L. y Reiss E.: Serodiagnosis of fungal diseases. En: Lennete E.H., Balows A., Hausler W.J. y Shadomy H.J.: *Manual of Clinical Microbiology*. 4ta Eds American Society for Microbiology Washington D.C., 1985:940.
32. Rippon J.W.: Medical micology. En: *Micologia Medica*. 3ª Ed. Saunders, Philadelphia 1992:251.
33. Scott E.N., Kaufman L., Brown A.C. y Muchmore H.G.: Serologic studies in the diagnosis and management of meningitis due to *Sporothrix schenckii*. *New Eng J Med* 1987 317:935-940.
34. Plouffe J.F., Silva J., Fekety R., Reihalter E. y Browne R.: Cell-mediated immune response in sporotrichosis. *J Infect Dis* 1979 139:152-155.
35. Bailey T.C. y powderly W.G.: Tratamiento de las enfermedades infecciosas. En: Woodley M. y Whelan A.: *Manual de terapéutica médica*. 8va Eds Masson-Salvat México 1993:348.

36. Torres-Mendoza B.M., Vázquez-Valls E. y González-Mendoza A.: Efecto del yoduro de potasio sobre la respuesta inmune en la esporotricosis. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14:98-100.
37. Schaffner A., Davis C.E., Schaffner T., Markert M., Douglas H. y Braude A.I.: *In vitro* Susceptibility of Fungi to Killing by Neutrophil Granulocytes Discriminates between Primary Pathogenicity and Opportunism. *J Clin Invest* 1986 78:511-523.
38. Hachisuka H. y Sasai Y.: Subpopulation of lymphocytes in the infiltrate of experimental sporotrichosis. *Mycopathologia* 1980 71:167-169.
39. Hachisuka H. y Sasai Y.: Development of experimental sporotrichosis in normal and modified animals. *Mycopathologia* 1981 76:79-82.
40. Lei P.C., Yoshiike T., Yaguchi H. y Ogawa H.: Histopathological studies of *Sporothrix schenckii* inoculated mice. Possible functions of polymorphonuclear leukocytes in normal and immunocompromised (congenitally athymic nude) mice. *Mycopathologia* 1993 122:89-93.
41. Hiruma M., Yamaji K, Shimizu T., Ohata H. y Kukita A: Ultrastructural study of tissue reaction of mice against *Sporothrix schenckii* infection. *Arch Dermatol Res* 1988 280 Sup 894-900.
42. Cunningham K.M., Bulmer G.S. y Rhoades E.R.: Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii*. *J Infect Dis* 1979 140:815-817.
43. Hiruma M. y Kagawa S.: Effects of hyperthermia on phagocytosis and intracellular killing of *Sporothrix schenckii* by polymorphonuclear leukocytes. *Mycopathologia* 1986 95:93-100.

44. Benchimol M., de Souza W. y Travassos L.R.: Distribution of anionic groups at the cell surface of different *Sporothrix schenckii* cell types. *Infect Immun* 1979 24:912-919.
45. Oda L.M., Kubelka C.F., Alviano C.S. y Travassos L.R.: Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1983 39:497-504.
46. Shimonaka H., Noguchi T., Kawai K., Hasegawa I., Nozawa Y. y To Y.: Immunochemical studies on the human pathogen *Sporothrix schenckii*: Effects of chemical and enzymatic modification of the antigenic compounds upon immediate and delayed reactions. *Infect Immun* 1975 11:1187-1194.
47. Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N. y Ginsberg H.S.: Hongos. En: *Tratado de Microbiología*. 4ª Eds. Ed. Masson Barcelona 1996:709.
48. Castillo M.C., Tapia F.J. y Arciniegas E.: Ultrastructural localization of specific surface antigens in the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. *J Med Vet Mycol* 1990 28:91-94.
49. Lima O.C. y Bezerra L.M.: Identification of a Concanavalin A-binding antigen of the cell surface of *Sporothrix schenckii*. *J Med Vet Mycol* 1997 35(3):167-172.
50. Yoshioka A., Miyachi Y. Imamura S. y Niwa Y.: The effect of supernatans obtained from *Sporothrix schenckii* and *Candida albicans* culture on the generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes. *Mycopathologia* 1987 100:43-48.
51. Shimizu T. Hiruma M., Akiyama M., Kukita A. y Tsuru S.: Effect of immunization and potassium iodide on polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence in experimental murine sporotrichosis. *Mycoses* 1989 32:443-447.

52. Melendez-Ruiz C.E., González-Mendoza A., Sotomayor J.M., Ruiz-Godoy V.M. y Ramos-Zepeda R.: Perfil inmunológico del paciente con esporotricosis linfocutanea. *Mycopathologia* 1983 83:169-173.
53. Kagaya K., Watanabe K., Fukazawa Y., Suzuki S., Kobayashi M., Okawa Y., Suzuki M., Takahashi H., Brummer E., Kurita N., Miyaji M. y Stevens D.A.: Biochemical mechanisms of intracellular killing of fungi. *J Med Vet Mycol* 1992 Sup 1 30:179-187.
54. Domer J.E., Murphy J.W. Deepe G.S. y Franco M.: Immunomodulation in the mycoses. *J Med Vet Mycol* 1992 Sup 1 30:157-166.
55. González-Ochoa A. y Soto-Figueroa E.: Polisacáridos del *Sporothrix schenckii*. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales* 1947 8:143-152.
56. Dickerson C.L. , Taylor R.L. y Drutz D.J.: Susceptibility of congenitally athymic (nude) mice to sporotrichosis. *Infect Immun* 1983 40:417-420.
57. Kappe R., Levitz S.M., Cassone A. y Washburn R.G.: Mechanism of host defence against fungal infection. *J Med Vet Mycol* 1992 Sup 1 30:167-177.
58. Fromtling R.A. y Shadomy H.J.: An overview of macrofage-fungal interactions. *Mycopathologia* 1986 120:21-31.
59. Shiraishi A., Nakagaki K. y Arai T.: Role of cell-mediated immunity in the resistance to experimental sporotrichosis in mice. *Mycopathologia* 1986 120:15-21.
60. Hewitt B.R.: Spectrophotometric Determination Antrona of total (Carbohydrates). *Nature* 1958:182, 246.

CUCB



BIBLIOTECA CUN

61. Ishizaki H, Nakamura Y y Wheat RW: Serological cross-reactivity between *Sporothrix schenckii* and various unrelated fungi. *Mycopathologia* 1981 73:65-68.
62. Catalona W.J., Taylor P.T., Rabson A.S. y Chretien P.B.: A method for dinitrochlorobenzene contact sensitization. *N Eng Med* 1972 286:399-402.
63. Kitamura K: A footpad weight assay method to evaluate delayed-type hypersensitivity in the mouse. *J Immunol Meth* 1980 277-283.
64. Nononan F.P., Bucana C., Sauder N. y DeFabo C.E.: Mechanism of systemic immune suppression by UV irradiation *in vivo*. *J Immunol* 1984 132:2408-2415.
65. Wysocki L.J. y Sato V.L.: "Panning" for lymphocytes: A method for cell separation. *Proc Natl Acad Sci* 1978; 75:2840-2848.
66. Morgan S.J. y Darling D.C.: Culturing Continuous Cell Lines. In: *Animal cell culture*. Ed. BIOS Scientific Publishers Oxford 1993:41-42.
67. Mossman T.: Rapid colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Meth* 1983 65:55-63.
68. Denizot F. y Lang R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Meth* 1986 89:271-277.
69. Roehm N.W., Rodgers G.H., Hatfield S.M. y Andrew L.G.: An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT, *J Immunol Meth* 1991 142:257-265.
70. Siegel S.: *Estadística no paramétrica*. (Eds. 2da.) Trillas 1970:143-155.

71. Domer J.E., Garner R.E. y Befidi-Mengue R.N.: Mannan as an antigen in Cell-mediated immunity (CMI) assays and as a modulator of mannan-specific CMI. *Infect Immun* 1989 57:693-700.
72. Garner R.E., Childress A.M., Human L.G. y Domer J.E.: Characterization of *Candida albicans* mannan-induced, mannan-specific delayed hypersensitivity suppressor cells. *Infect Immun* 1990 58:2613-2620.
73. Walker T.S.: Fungi That Cause Superficial, Cutaneous, and Subcutaneous Mycoses. En: *Microbiology*. Ed. Saunders United States of America 1998:305-317.
74. Adams D.O.: Macrophage activation. En: Roit I.M. y Delves J. (eds) *Encyclopedia of Immunology*. Academic Press London 1992:1020-1026.
75. Lei P.C., Yoshiike T. y Ogawa H.: Effects of proteinase inhibitors on the cutaneous lesion of *Sporothrix schenckii* inoculated hairless mice. *Mycopathology* 1993 123:81-86.
76. Aune T.M. y Pierce C.W.: Identification and initial characterization of a nonspecific suppressor factor produced by soluble immune response suppressor treated macrophages. *J Immunol* 1981 127:1828-1833.
77. Aune T.M. y Pierce C.W.: Conversion of soluble immune response suppressor to macrophage-derived suppressor factor by peroxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 78:5099-5103.
78. Aune T.M. y Pierce C.W.: Activation of a suppressor T cell pathway by interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982 79:3808-3812.

79. Aune T.M., Webb D.R. y Pierce C.W.: Purification and initial characterization of the lymphocine soluble immune response supressor. *J Immunol* 1983 131:2848-2852.
80. Miller L.E., Ludke H.R., Peacock J.E. y Tomar R.H.: Soluble immune response supressors. En: *Manual of Laboratory Immunology*. 2<sup>a</sup> Eds. Ed. Lea & Febiger Philadelphis 1991:155-158.