
Universidad de Guadalajara

ESCUELA DE GRADUADOS



INMUNOTRANSFERENCIA Y RESPUESTA INMUNE EN
ESPOROTRICOSIS EXPERIMENTAL

TRABAJO QUE CON CARACTER DE
T E S I S
P R E S E N T A
ARTURO OROZCO BAROCIO

PARA OPTAR AL GRADO DE
Maestro en Ciencias (Biología Celular)
GUADALAJARA, JALISCO. 1990

Para Mercedes, Arturo y quien
viene...

con Amor.

Agradezco a todos los miembros
de la Div. de Patología Experi
mental por su ayuda incondicioo
nal que me brindaron.

A mis compañeros y maestros
de la maestría.

Al Dr. Amado González Mendoza.

Muy especialmente a mi Director
de Tesis: M. en C. Rodolfo Ramos
Zepeda. Por su ayuda constante
e incondicional, sin la cual no
hubiera sido posible la realiza
ción de este trabajo.

Deseo agradecer, también, el apoyo que me otorgaron las gerencias general y administrativa de PROLEBSA.

Y especialmente a los Ingenieros Antonio López , Javier Briseño, Vladimira Galindo y Gerardo Mendoza por su apreciable ayuda en los aspectos de sistemas y gráficos.

INMUNOTRANSFERENCIA Y RESPUESTA INMUNE EN ESPOROTRICOSIS
EXPERIMENTAL.

INDICE.

	Páginas
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
HIPOTESIS	8
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS	21
DISCUSION	27
CONCLUSION	31
BIBLIOGRAFIA	32

INTRODUCCION.

La esporotricosis es una infección crónica causada por S. schenckii (1,2). Probablemente es la micosis profunda más diseminada en el mundo (3). En México existen zonas endémicas en los estados de Jalisco y Michoacán(4). La enfermedad se caracteriza por diversas manifestaciones clínicas que van desde la forma cutánea fija hasta la linfática diseminada (5,6). Se presenta en forma crónica y en ocasiones cura espontáneamente (7,8). Este comportamiento sugiere que los mecanismos de protección del huésped juegan un papel importante en la patogénesis de la micosis. Entre estos mecanismos de defensa se encuentran la inmunidad celular, la inmunidad humoral y la fagocitosis.

Diversos animales de experimentación son sensibles a la esporotricosis, entre ellos el gérbil de Mongolia, en el cual la esporotricosis se manifiesta en forma localizada y diseminada (9,10). Este modelo experimental permite estudiar ampliamente el estado de los mecanismos de defensa durante el padecimiento y el comportamiento de las células efectoras de la respuesta inmune. El presente trabajo tuvo como propósito estudiar la participación de linfocitos esplénicos de gérbiles con esporotricosis, sobre la



modificación de la respuesta inmune de gérbiles sanos a los que se les transfirieron dichas células. La acción inmunomoduladora de las células transferidas, fue valorada en los gérbiles inmunotransferidos por las reacciones de hipersensibilidad retardada a dinitrofluorobenceno y células formadoras de placas de hemólisis. Además se les valoró la actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y de los macrófagos peritoneales (MP).

ANTECEDENTES.

La esporotricosis es una infección crónica causada por Sporothrix schenckii (1,2). Se caracteriza por lesiones nodulares del tejido cutáneo, subcutáneo y linfático adyacente. Secundariamente pueden afectarse otros órganos (5, 6, 10-13). La enfermedad se presenta en todo el mundo, principalmente en zonas tropicales (14).

El hongo existe distribuido ampliamente en la naturaleza, se ha aislado de suelos, maderas y plantas. Los vectores principales de transmisión son las espinas, la paja y en general todos aquellos objetos contaminados con tierra. Ocasionalmente la enfermedad se transmite a través de mordeduras de animales o picaduras de insectos (14,15). El padecimiento se considera de tipo ocupacional (8, 16, 17).

La esporotricosis clínicamente se manifiesta en varias formas: linfocutánea, cutánea fija, diseminada y pulmonar.

La esporotricosis linfocutánea es la forma más común, en ésta el hongo penetra por la piel. La primera lesión aparece entre siete y treinta días. El primer signo es la aparición de un nódulo indoloro móvil, elástico, esférico

y duro. Más tarde se fija en la piel y toma un color rosado, después purpúreo y finalmente se necrosa tomando un color negro. Puede persistir durante meses. A los pocos días o semanas aparecen nódulos subcutáneos múltiples, a lo largo del trayecto de los vasos linfáticos que drenan la región. Con frecuencia la lesión primaria cura, pero las lesiones gomosas secundarias no tratadas, persisten durante meses o años (17).

El diagnóstico clínico en ocasiones es difícil, pero no el micológico. El método de diagnóstico más eficaz y sencillo es el de cultivo, ya que el hongo crece fácilmente en agar Sabouraud entre 5 y 7 días. Tiene un ciclo dimórfico, crece como levadura (parásito) a 37°C u en forma filamentosa (vida libre) a 25°C (5).

Uno de los tratamientos más efectivos contra la esporotricosis es a base de ioduro de potasio. Se desconoce con precisión cuál es el mecanismo de acción de esta sustancia a pesar de que se ha usado desde hace muchos años. El ioduro de potasio sólo tiene efecto cuando se administra en forma oral o parenteral(10). En medio de cultivo adicionado de una concentración de ioduro de potasio mayor del 10% S. schenckii crece in vitro (19). Por otra parte se sabe que

la esporotricosis es la única micosis que cura con el ioduro de potasio. Stone ha propuesto que los ioduros ejercen su efecto terapéutico sobre la esporotricosis por estímulo de la inflamación y ayuda así a la eliminación del hongo (20). Recientemente se ha informado que el ioduro de potasio afecta, in vitro, la estructura de la pared celular del hongo (19).

En la esporotricosis se desconocen muchos aspectos de la interacción huésped-parásito, la cual resulta fundamental para conocer el mecanismo patogénico de la enfermedad (21). La variabilidad en la expresión clínica, que incluye la curación espontánea, implica que en la patogenia de la enfermedad deben estar involucrados los mecanismos de defensa del huésped. Entre estos se encuentran la inmunidad celular, la inmunidad humoral y la fagocitosis (17).

Con respecto a la inmunidad celular aparentemente no presenta alteración en los pacientes con esporotricosis (22). En cuanto a la inmunidad humoral se ha informado que existen anticuerpos circulantes de tipo aglutininas y precipitinas durante la enfermedad activa, pero se desconoce su papel en la resistencia a la enfermedad (23,24).

La fagocitosis también es un mecanismo de protección impor

tante en la relación huésped-parásito. Las células efectoras de esta actividad son los macrófagos y los PMN (25-27). Los fagocitos se consideran la primera línea de defensa de los animales y participan de forma muy activa en la ingestión y muerte de los microorganismos invasores, por medio de sus mecanismos microbicidas dependientes e independientes de oxígeno (28-31).

Entre los mecanismos microbicidas de los PMN, Klebanoff ha descrito un sistema microbicida formado por el complejo mieloperoxidasa-peróxido de hidrógeno-halógeno (MPO-H₂O₂-X). El mecanismo de acción de dicho complejo es a través de la formación de aldehidos tóxicos, radicales hipocloritos y la halogenación de proteínas bacterianas (32). Entre los halógenos que pueden utilizar los PMN se encuentran el yodo y el cloro, los cuales son efectivos contra bacterias, (31,32) hongos (33) y virus (34).

Los macrófagos son similares a los PMN en muchos aspectos de su comportamiento fagocítico. Matan varias especies de bacterias y hongos. La ingestión de partículas induce el consumo de oxígeno, peróxido de hidrógeno y producción de anión superóxido, iones oxhidrilo y estimula la actividad de la vía hexosa monofosfato. Contienen MPO y manifiestan

reacciones secundarias peroxidativas después de la ingestión de partículas (30,35).

Por otra parte se sabe que la transferencia de linfocitos T esplénicos, de ratones con neoplasia, son capaces de inducir inmunosupresión a ratones sanos (36-41). Además este tipo de transferencia celular, de ratones infectados con Cándida albicans (42) o con Histoplasma capsulátum (43), modifican la respuesta inmunológica a ratones sanos.

Para estudiar la esporotricosis de forma más amplia, se ha recurrido a los modelos experimentales en animales de laboratorio como ratones, (44) gatos, (45) perros, (46) hamster (24) y gérbiles de mongolia (9). En este trabajo se emplearon los gérbiles de mongolia (Meriones unguiculatus), roedor originario del Norte de China, con el cual se ha establecido un excelente modelo para el estudio de la esporotricosis experimental. Con el propósito de analizar la participación de las transferencias de linfocitos esplénicos de gérbiles con esporotricosis en la modulación de la respuesta inmune de gérbiles sanos; se hicieron transferencias de linfocitos esplénicos de gérbiles infectados con S. schenckii a gérbiles sanos, a los que posteriormente se les estudiaron sus mecanismos de defensa y además se les retó con S. schenckii viable.

HIPOTESIS

La transferencia de linfocitos esplénicos de gérbiles con esporotricosis tiene acción inmunomoduladora de los mecanismos de defensa de gérbiles sanos.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las modificaciones de los mecanismos de defensa en gérbiles que recibieron transferencia de linfocitos esplénicos de gérbiles con esporotricosis experimental.

OBJETIVOS PARTICULARES

I. Evaluar la evolución clínica de la esporotricosis en gérbiles infectados experimentalmente con S. schenckii, transferidos o no con linfocitos esplénicos de gérbiles con esporotricosis diseminada experimental. Para ello se consideraron los siguientes aspectos:

- a) Tiempo de aparición del nódulo (pata infectada).
- b) Medición de la inflamación de la pata infectada.
- c) Aislamiento de S. schenckii de diferentes órganos por cultivo micológico.

II. Evaluar los mecanismos de protección en gérbiles con y sin esporotricosis diseminada experimental, transferidos o no con linfocitos esplénicos de gérbiles infectados con S. schenckii.

- a) Inmunidad celular.
- b) Inmunidad humoral.
- c) Fagocitosis.

Handwritten note: Ensayo 11-12-6

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon 140 gérbiles machos, de 70 a 90 días de edad y de 80 a 100 g de peso. Noventa de estos se utilizaron para estudiar las modificaciones de los mecanismos de defensa. Y los otros 50 se utilizaron como donadores de linfocitos esplénicos sensibilizados con S. schenckii. Los animales se mantuvieron alojados en jaulas de policarbonato en cuartos con temperatura controlada a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con ciclos de 12 horas de luz fluorescente de espectro solar (VITA-LITE) y se alimentaron con purina para roedores y agua para consumo libre.

OBTENCION DE LEVADURAS DE S. schenckii. A partir de una cepa de S. schenckii aislada de un caso de esporotricosis cutánea se obtuvo la fase levaduriforme mediante subcultivos en medio base de agar sangre (BIOXD) y resiembra posterior en medio líquido de caldo cerebro-corazón (BBL) incubado a 37°C por 24 hs. Después de este tiempo, las levaduras obtenidas se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos y se lavaron 2 veces con solución salina 0.87 % (SS). Se contaron en cámara Neubauer.

INDUCCION DE LA ENFERMEDAD. A un grupo de 50 gérbiles se

les inocularon 6×10^6 levaduras de S. schenckii, resuspendidas en 0.1 ml de SS y se inyectaron en el cojinete plantar posterior izquierdo. Para verificar que la enfermedad estuvo diseminada se aisló el hongo de bazo, hígado y riñón, ocho días después de la inducción de la infección.

OBTENCION DE CELULAS ESPLENICAS. Al octavo día de inducida la infección se sacrificaron los gérbiles y se les extrajo el bazo. Se trituró en homogenizador de vidrio (PYREX). Se resuspendió en 3 ml de SS a 40C. Se dejaron sedimentar los residuos tisulares del bazo. La suspensión rica en células se depositó en cajas de Petri para separar las células adherentes al vidrio. El sobrenadante rico en linfocitos fue recuperado y se le determinó la viabilidad por tinción supravital con azul tripan al 0.1%, esta fue de 93 a 96%. Los linfocitos se contaron en cámara de Neubauer. Se llevaron a una concentración de 5×10^7 linfocitos/ml de SS. De igual manera se procedió con los bazos de los gérbiles sanos que se emplearon como testigos.

INMUNOTRANSFERENCIA. Los linfocitos esplénicos, obtenidos de los gérbiles infectados, fueron inyectados por vía intraperitoneal a 40 gérbiles sanos, con los que se integraron 4 grupos de 10 animales cada uno (Grupos 1-4). Los gru

pos estuvieron determinados por el número de inoculaciones de linfocitos esplénicos que recibieron: 1, 2, 3 y 4 dosis respectivamente. Cada dosis fue de 5×10^7 linfocitos/ml de SS. Se aplicaron en su caso una dosis cada 8 días por vía intraperitoneal (i.p.). Como testigos se trabajaron 5 grupos más de 10 gérbiles cada uno (Grupos A-B). Cuatro de estos grupos (Grupos B) fueron infectados con S. schenckii. No recibieron ninguna transferencia de linfocitos esplénicos y según el grupo de gérbiles transferidos con el que se relacionaron, recibieron 1, 2, 3 y 4 inyecciones i.p. de 1 ml de SS. El grupo A no recibió transferencia de células ni inducción de la esporotricosis y fue utilizado como grupo testigo normal. Al octavo día de la última transferencia de linfocitos esplénicos o inyección de SS, los gérbiles fueron retados por vía subcutánea en el cojinete plantar con 6×10^6 de levaduras de S. schenckii. La evolución clínica fue observada durante 120 días, al término de estos se valoró la respuesta inmune celular, humoral y la fagocitosis (Cuadro 1).

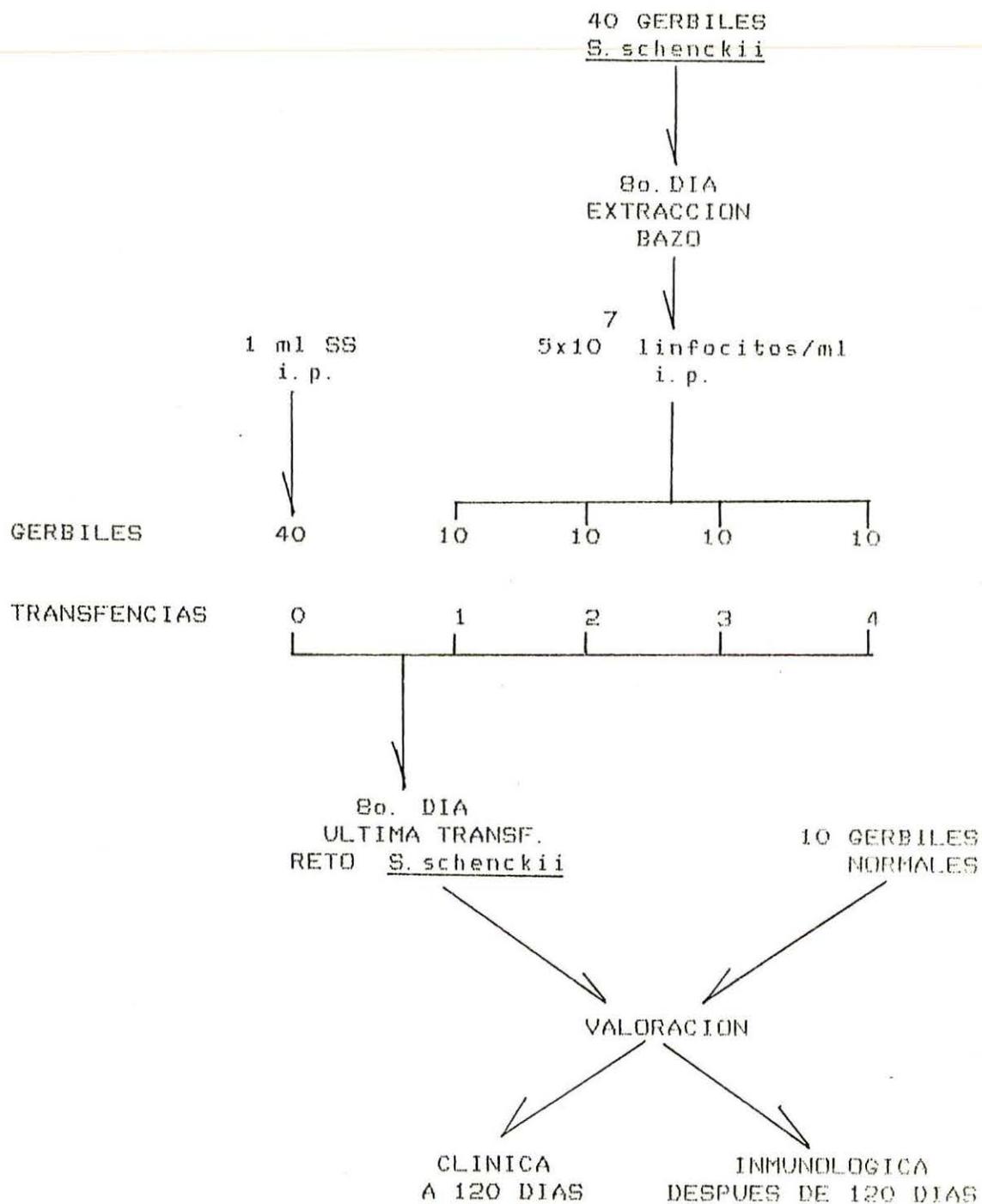
I. VALORACION DE LA EVOLUCION CLINICA DEL PADECIMIENTO.

A los gérbiles de los Grupos 1 - 8 se les determinó la evolución clínica de la esporotricosis mediante los si-

CUADRO 1. ESQUEMA DE TRABAJO.



BIBLIOTECA CENTRAL



güientes parámetros:

- a) Tiempo de aparición de nódulos en la pata infectada.
- b) Medición de la inflamación de la pata infectada, mediante un micrómetro de precisión (EDYMP. S.A. MEX.).
- c) Necrosis parcial o total de la pata infectada.
- d) Aislamiento de S. schenckii de los gérbiles que recibieron transferencia de células esplénicas de gérbiles con esporotricosis, mediante cultivos de agar Sabouraud y Mycosel, a partir del cojinete plantar, hígado y bazo, con objeto de determinar si la infección se encontraba diseminada o localizada. De igual manera se procedió con sus testigos.

II. VALORACION DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA.

En los gérbiles de los Grupos 1-9 se realizaron las pruebas que a continuación se describen:

a) INMUNIDAD CELULAR.

Prueba de hipersensibilidad retardada a Dinitrofluorobenceno (DNFB). La inmunidad celular se valoró por medio de la

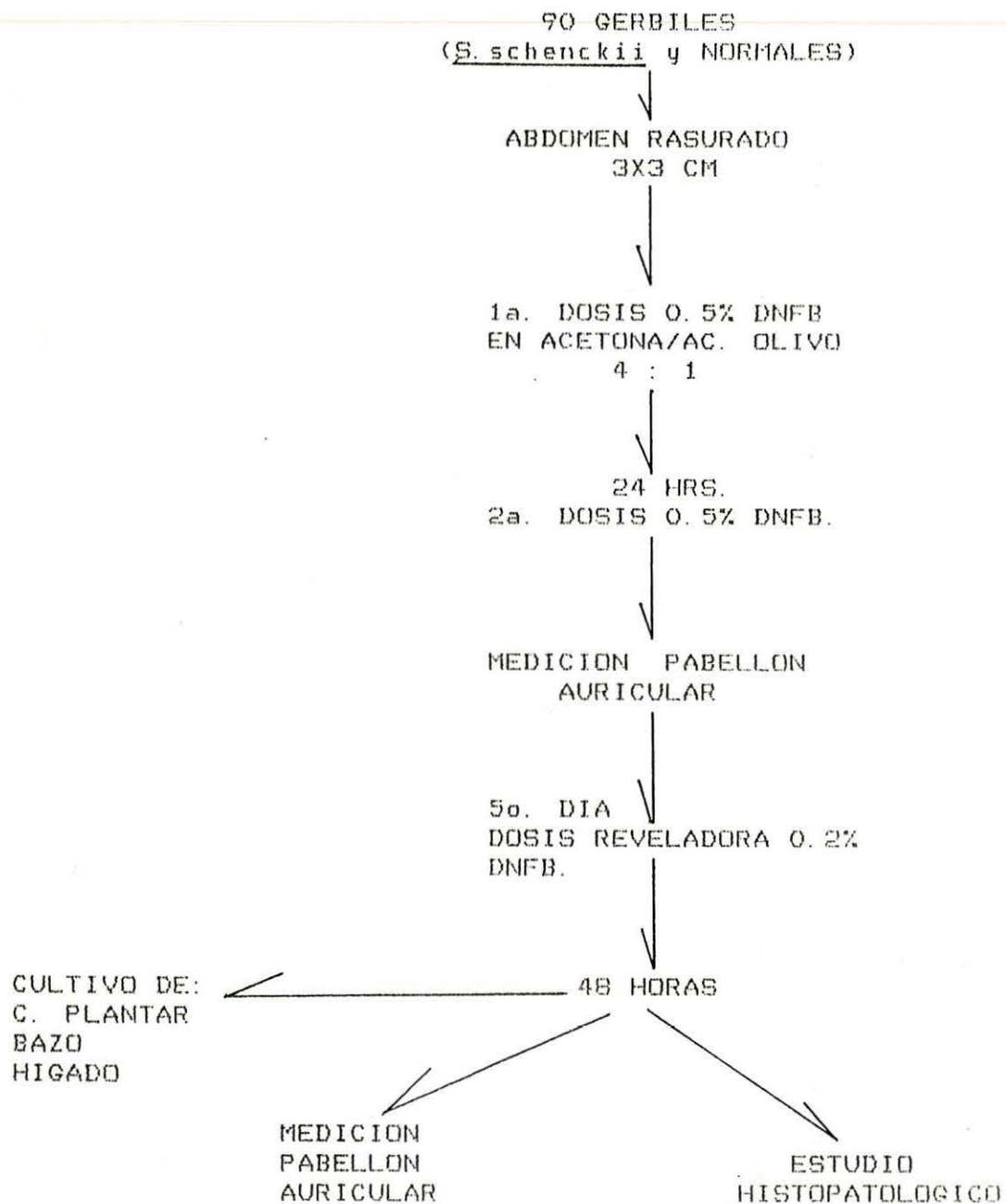
reacción de hipersensibilidad retardada a DNFB (47). Se rasuró el abdomen de los gérbiles en una area de 3x3 cm. Se indujo la sensibilización con 0.02 ml de solución al 0.5% de DNFB disuelto en acetona y aceite de oliva en proporción 4:1. A las 24 h se aplicó una segunda dosis sensibilizante. Al quinto día de iniciada la sensibilización se aplicó en la parte externa de la oreja derecha de cada gérbil la dosis reveladora que consistió en 0.01 ml de DNFB al 0.2% en el mismo vehículo. Antes de aplicar la dosis reveladora y 48 hs después, se midió el grosor del pabellón auricular con un micrómetro de precisión (EDYMP. S. A. MEX.) (Cuadro 2). En seguida se hicieron biopsias de las orejas sensibilizadas, para evaluar la intensidad de la reacción de hipersensibilidad celular. Estas biopsias se hicieron inmediatamente después de la medición y fueron fijadas en formol al 10%. Posteriormente se procesaron los cortes histopatológicos que fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina.

b) INMUNIDAD HUMORAL.

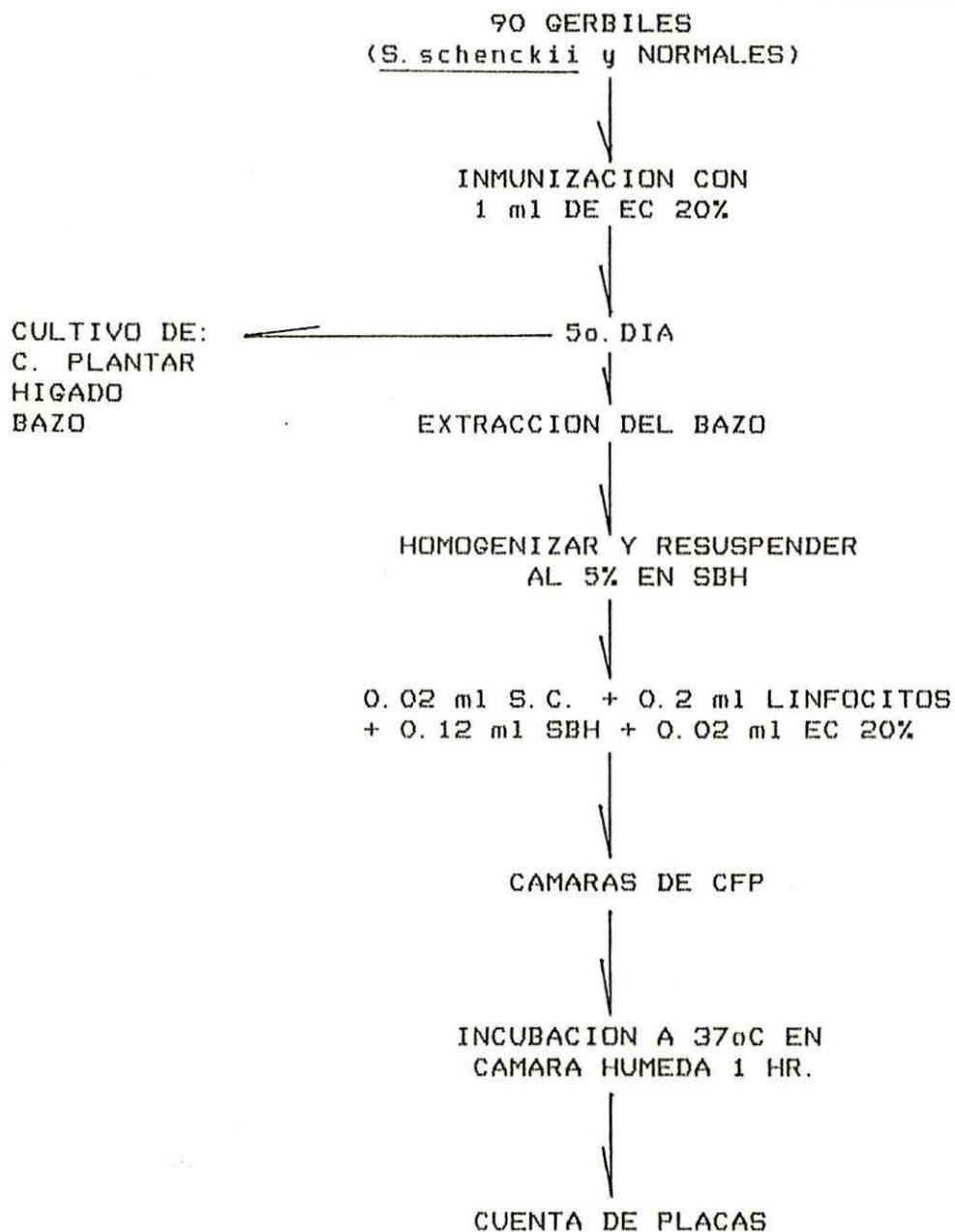
Células formadoras de placas de hemólisis (CFP). Para valorar la inmunidad humoral se utilizó el método de Cunningham de las CFP (48). El procedimiento esquemáticamente se describe en el Cuadro 3. Resumida brevemente la prueba

CUADRO 2. METODO DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA

A DNFB.



CUADRO 3. METODO DE CELULAS FORMADORAS DE PLACAS
DE HEMOLISIS



consistió en inmunizar a los gérbiles con eritrocitos de carnero (EC). Cinco días después de la inmunización se extrajeron sus bazos para obtener los linfocitos esplénicos y resuspenderlos a una concentración del 5% en solución balanceada de Hanck (SBH). En un tubo de ensaye se colocaron 0.2 ml de la suspensión de linfocitos, 0.12 ml de SBH, 0.02 ml de suero de cobayo (SC), como fuente de complemento y 0.02 ml de EC al 20 %. Con esta mezcla se llenaron las cámaras formadas por dos portaobjetos unidos entre sí por cinta adhesiva de doble pegamento. Los bordes de las cámaras fueron sellados con una mezcla de vaselina-parafina al 50 % a 45°C. Las cámaras se colocaron en cámara húmeda y se incubaron a 37°C por una hora. Después de esto se contaron las placas de hemólisis obtenidas en cada cámara. Los resultados se expresaron como células formadoras de placas de hemólisis por bazo (CFP/Bazo) para lo cual se aplicó la fórmula siguiente:

$$\text{CFP/BAZO} = \text{No. CFP} \times \text{CAMARA} \times \text{FACTOR DE CONVERSION}$$

$$\text{FACTOR DE CONVERSION} = 1/0.2 \times 20 \times 1' = 100$$

1 = valor para referir las CFP/ml.

0.2 = volumen aplicado en cada cámara.

20 = valor de dilución final del bazo.

1' = volumen inicial de la suspensión del bazo.



c) FAGOCITOSIS.

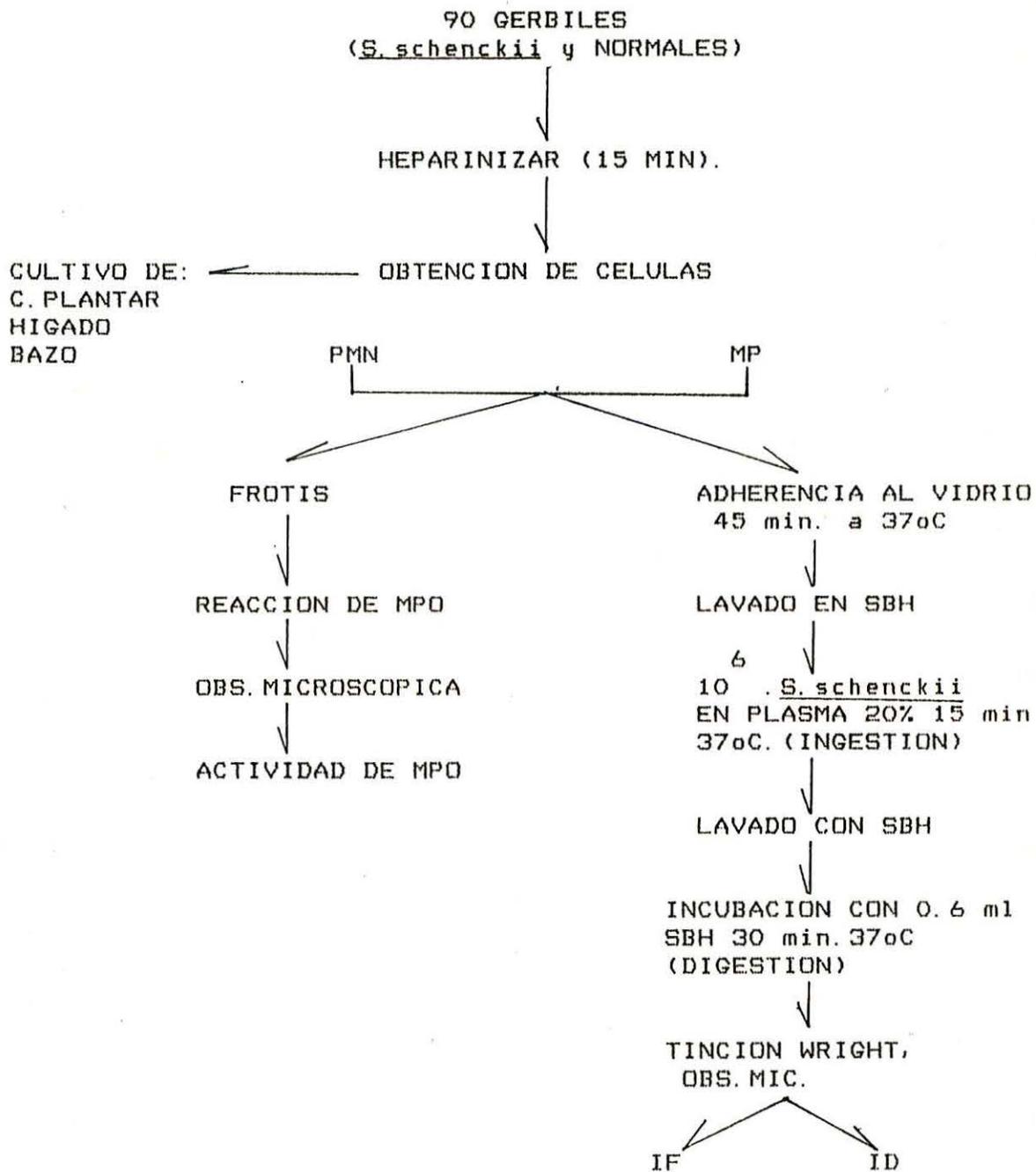
BIBLIOTECA CENTRAL

Obtención de células fagocíticas. En el cuadro 4 se presenta un diagrama del procedimiento de la valoración de la actividad fagocítica. A los gérbiles se les administraron i. p. 0.3 ml de heparina sódica que contenía 1000 USP/ml, 20 minutos después se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvo la sangre por punción cardíaca. Se elaboraron 2 frotis sanguíneos para la determinación de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en los PMN, según el método de Kaplow (50) Posteriormente la sangre se centrifugó a 1500 rpm por 5 min. y se separó el plasma y el paquete de leucocitos el cual se resuspendió a una concentración de 10×10^6 PMN/ml en SBH a 37°C.

Los macrófagos peritoneales (MP) se obtuvieron inyectando 10 ml de SBH a 37°C en la cavidad peritoneal de cada gérbil. Se dió un masaje suave en el peritoneo, se recuperó la SBH que contenía en suspensión los MP. De esta suspensión se hicieron dos frotis en portaobjetos para la valoración de la enzima MPO. La suspensión de MP se lavó y se llevó a una concentración de 10×10^6 MP/ml de SBH.

Prueba de Fagocitosis en PMN y PM. Se empleó el método de

CUADRO 4. PRUEBA DE FAGOCITOSIS Y MPO EN
PMN Y MP.



adherencia al vidrio (49). El cual consistió básicamente en colocar 0.5 ml de la suspensión de PMN o MP sobre cubreobjetos de 22 X 22 mm, previamente desengrasados y adheridos a tapones de hule. A continuación se colocaron en cámara húmeda y se incubaron a 37°C durante 45 minutos para permitir su adherencia al vidrio. Transcurrido este tiempo se lavaron suavemente los cubreobjetos con SBH a 37°C para la eliminación de las células que no se adhirieron al vidrio. Inmediatamente después y sin dejar secar los cubreobjetos, las células adheridas se cubrieron con 0.5 ml de la suspensión de S. schenckii que contenía 2×10^6 levaduras por ml de SBH adicionada del 20% de plasma autólogo. Posteriormente se incubaron durante 15 minutos en cámara húmeda a 37°C. Al término de la incubación se lavaron suavemente con SBH para retirar las levaduras de S. schenckii no fagocitadas. Los cubreobjetos se dejaron secar al aire y se tiñeron con colorante de Wright. Luego se montaron invertidos sobre portaobjetos previamente identificados. Las pruebas se hicieron por duplicado en todos los casos.

La valoración de la fagocitosis se hizo por observación de las preparaciones en microscopio de luz con el objetivo de 100 X. Se contaron 300 PMN o MP en cada cubreobjetos, se incluyeron en este número de células las que fagocitaron o

no fagocitaron.

Las levaduras fagocitadas se observaron como cuerpos intra citoplasmáticos, de color azul intenso (levaduras no digeridas) dentro de sus respectivos fagosomas, así como vacuolas ópticamente vacías (levaduras digeridas). Este fenómeno Cunningham lo describe como fantasmas (49). Así mismo se observaron fagosomas que contenían residuos de levaduras. De esta forma en el primer caso se diferenciaron las levaduras no digeridas y en los dos últimos las digeridas. Después se valoró el Índice Fagocítico (IF) que representa el total de levaduras ingeridas (digeridas y no digeridas) y el Índice de Digestión (ID).

El IF se determinó por la suma del número de levaduras ingeridas por los 300 fagocitos y este valor se dividió entre 300 que fueron los fagocitos contados, el cociente resultante fue el IF. El ID se determinó por la cuenta del número de levaduras digeridas por los 300 fagocitos y este valor se dividió entre 300, el ID fue el cociente de la división. Las pruebas se hicieron por duplicado y se obtuvo el promedio para cada animal.

Determinación del contenido de mieloperoxidasa (MPO). La

valoración de MPO en los PMN y MP de los gérbiles se realizó en base al método descrito por Kaplow (50). Los frotis sanguíneos se fijaron por 15 segundos con formol-etanol al 10% a temperatura ambiente, se lavaron con agua corriente y se eliminó el exceso de agua. Se incubaron 30 segundos con una solución que contenía: 0.3 g de hidrocioruro de bencidina, 100 ml de alcohol etílico al 30%, 1.5 ml de hidróxido de sodio 0.1 N, 0.7 ml de peróxido de hidrógeno al 3%, 1 g de acetato de sodio, 1 ml de sulfato de zinc al 1% y 0.2 g de safranina. Después se lavaron con agua corriente y se secaron al aire. El producto de la reacción de oxidación de la bencidina se presentó en forma de gránulos intracitoplasmáticos de color azul, verde o café oscuros, estos se observaron en el microscopio de luz con el objetivo de 100 X.

Para determinar la actividad de MPO en los PMN y MP se tomó el siguiente criterio. Se contaron 100 células fagocíticas. Aquellas que presentaron los gránulos intracitoplasmáticos descritos anteriormente, se consideraron en actividad y el resultado se expresó en por ciento de PMN o MP que tuvieron actividad de MPO.

Para determinar el contenido (capacidad) de MPO se realizó

semicuantitativamente por medio de cruces que indicaron la intensidad del producto de la reacción de MPO. Los PMN y MP que presentaron gran cantidad de granulaciones se les asignaron 3 cruces, a los que tuvieron una cantidad intermedia, 2 cruces y a los que mostraron escasos gránulos una cruz; los que no presentaron granulaciones se les dió el valor de cero. Se sumaron todas las cruces en cada caso, esta cifra se relacionó con el 100% de capacidad que sería de 900 puntos valor máximo del contenido de MPO que tendrían los 300 PMN o MP si tuvieran una capacidad de 3 cruces. Finalmente el resultado de la capacidad de MPO se informó en porciento.

Los resultados fueron analizados estadísticamente por las pruebas de Kruskal-Wallis y "t" de Student. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$.

RESULTADOS.

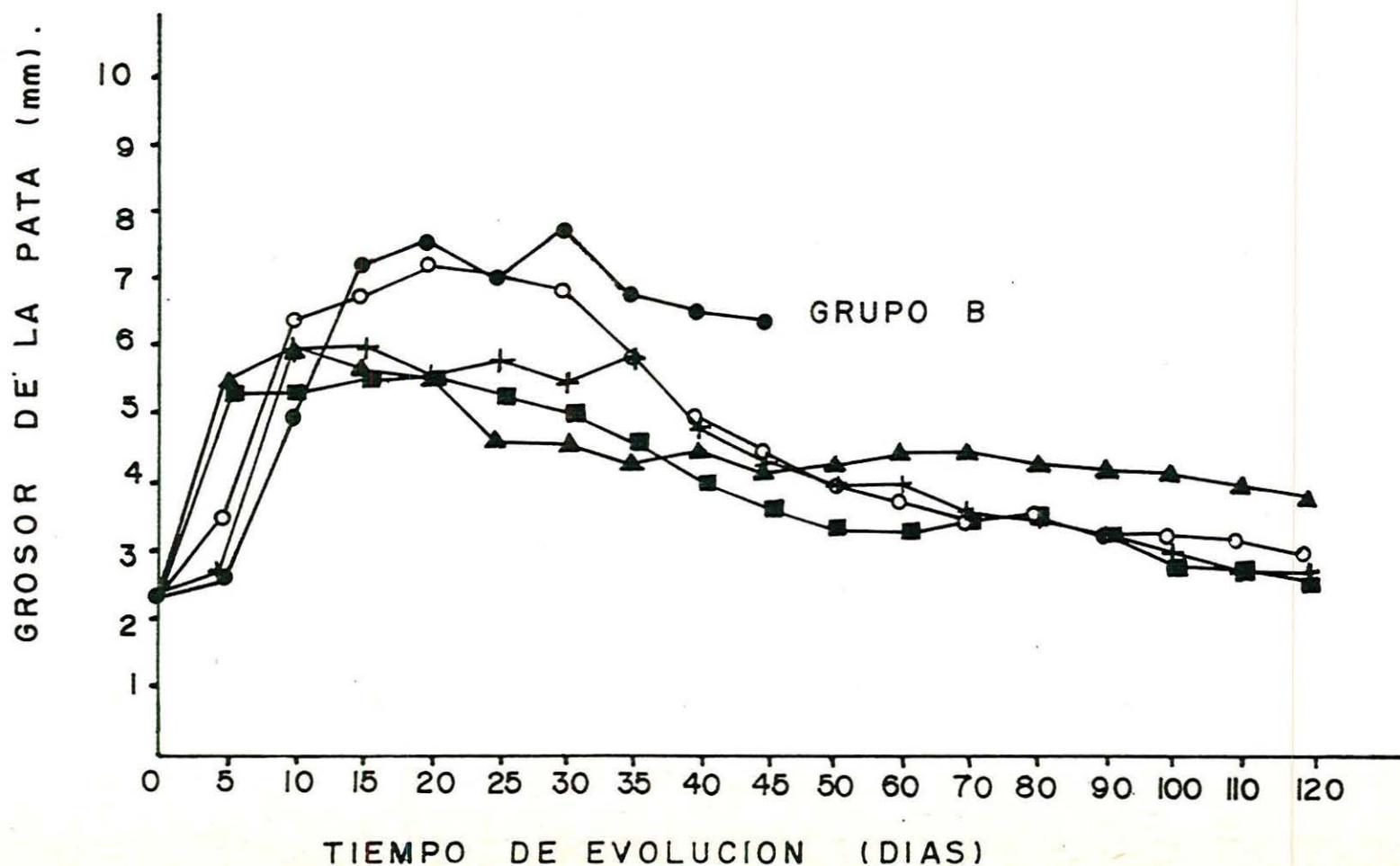
VALORACION CLINICA. Esta consistió en la observación del desarrollo de la enfermedad y medición de la inflamación de la pata infectada, a partir de la inducción del padecimiento. Como indicadores de la variación de la inflamación se tomaron los tiempos en los que se observó la máxima inflamación de la pata infectada y la dimensión de ésta, en relación con el número de transferencias de linfocitos esplénicos que se aplicaron a los gérbiles de los grupos 1, 2, 3 y 4.

Los gérbiles a los que se les aplicó 1 transferencia de linfocitos (Gráfica 1) presentaron la máxima inflamación de la pata infectada (7 mm) entre 10 y 30 días posteriores a la inducción de la infección. A partir del día 30 inició la disminución del proceso inflamatorio.

Los gérbiles a los que se les administraron 2 transferencias (Gráfica 1) presentaron la mayor inflamación (6 mm) entre 8 y 25 días después de la inducción de la infección. La disminución de la inflamación fue a partir del día 25.

Los gérbiles con 3 transferencias (Gráfica 1) presentaron

GRAFICA I. Valoración de la infección por *S. SCHENCKII* a través de la medición de la inflamación de la pata inoculada, en Gerbiles que recibieron 0 (●), 1 (○), 2 (+), 3 (▲) y 4 (■) transferencias de 5×10^6 linfocitos de los gerbiles con esporotricosis.



la máxima inflamación (6 mm) entre 4 y 15 días posteriores a la inducción de la infección. A partir del día 15 comenzó a disminuir el proceso inflamatorio.

Los gérbiles que recibieron 4 transferencias (Gráfica 1) presentaron la mayor inflamación (5.4 mm) entre 4 y 17 días posteriores a la inducción de la infección. A partir del día 17 disminuyó el proceso inflamatorio.

Los gérbiles del grupo B no recibieron transferencias de linfocitos, pero fueron infectados con S. schenckii, tuvieron una inflamación máxima de la pata infectada de 7.5 a 9 mm y ésta se presentó entre los 15 y 20 días posteriores a la inducción de la enfermedad (Gráfica 1). En estos grupos no se observó disminución importante de la inflamación, por el contrario, el daño tisular se agudizó y se presentaron mutilaciones en la pata infectada entre los 20 y 50 días posteriores a la inducción de la esporotricosis. Las mutilaciones consistieron en la pérdida parcial o total de los dedos o de la pata infectada.

De los párrafos anteriores se puede decir que el tiempo de aparición de la inflamación, así como la dimensión máxima de ésta en los gérbiles que recibieron 3 y 4 transferen-

cias, fueron significativamente menores ($p < 0.01$) que en los gérbiles de los grupos B y de los que recibieron 1 y 2 transferencias.

Así mismo, a los 120 días de inducida la esporotricosis, a partir del cojinete plantar, hígado y bazo de los gérbiles del grupo B, se aislaron levaduras de S. schenckii. En cambio en los animales que recibieron inmunotransferencias (Grupos 1, 2, 3 y 4) sólo fue positivo el aislamiento a partir del cojinete plantar (Tabla 1).

VALORACION DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA.

a) INMUNIDAD CELULAR.

Prueba de hipersensibilidad retardada DNFB. En la Tabla 2 se muestra la valoración de la prueba reveladora de la sensibilización a DNFB, por la medición de la inflamación que presentó el pabellón auricular en el que se aplicó dicha prueba. La reacción de hipersensibilidad retardada fue positiva en los gérbiles de todos los grupos, estuvieran o no infectados por S. schenckii y hubieran o no recibido transferencias de linfocitos de gérbiles con esporotricosis.

La intensidad de las reacciones a DNFB de los grupos B, 1,

TABLA 1. AISLAMIENTO DE *S. schenckii* EN GERBILES CON ESPOROTRICOSIS QUE RECIBIERON O NO TRANSFERENCIA DE CELULAS ESPLNICAS DE GERBILES CON ESPOROTRICOSIS. LOS CULTIVOS SE REALIZARON DESPUES DE 120 DIAS DE INDUCIDA LA ESPOROTRICOSIS EN LOS GRUPOS B, 1, 2, 3 Y 4.

CULTIVOS (SABOURAUD Y MYCOSEL)

GRUPO	N	COJINETE PLANTAR	HIGADO	BAZO
A	10	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
B	40	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
1	10	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
2	10	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3	10	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4	10	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

A = GERBILES NORMALES.

B = GERBILES INFECTADOS SIN TRANSFERENCIAS.

1, 2, 3, 4. = GERBILES QUE RECIBIERON DE 1 A 4 TRANSFERENCIAS

TABLA 2. MEDICION BASAL Y PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD RE-
TARDADA A DNFB EN GERBILES CON ESPOROTRICOSIS QUE RECIBIE-
RON O NO TRANSFERENCIA DE CELULAS ESPLNICAS DE GERBILES
CON ESPOROTRICOSIS. LA PRUEBA SE VALORO POR EL GROSOR DEL
PABELLON AURICULAR E HISTOPATOLOGICAMENTE POR MICROSCOPIA
DE LUZ.

GRUPO	N	GROSOR EN 0.1 mm						HISTOLOGIA
		BASAL			48 HRS.			
		\bar{X}	\pm	D. E.	\bar{X}	\pm	D. E.	
A	10	0.477	\pm	0.026	1.002	\pm	0.053	+ + +
B	40	0.484	\pm	0.033	0.932	\pm	0.040	+ + +
1	10	0.426	\pm	0.004	0.943	\pm	0.012	+ + +
2	10	0.428	\pm	0.017	0.800	\pm	0.027	+ + +
3	10	0.413	\pm	0.024	0.766	\pm	0.060	+ +
4	10	0.466	\pm	0.012	0.740	\pm	0.028	+

A = GERBILES NORMALES.

B = GERBILES INFECTADOS SIN TRANSFERENCIAS.

1, 2, 3, 4. = GERBILES QUE RECIBIERON DE 1 A 4 TRANSFERENCIAS.
LAS DIFERENCIAS ENTRE LOS GRUPOS EN LA MEDICION BASAL NO
FUERON SIGNIFICATIVAS Y SI LO FUERON A LAS 48 H AL COMPARAR
A vs B, 1, 2, 3 Y 4 ($p < 0.001$).

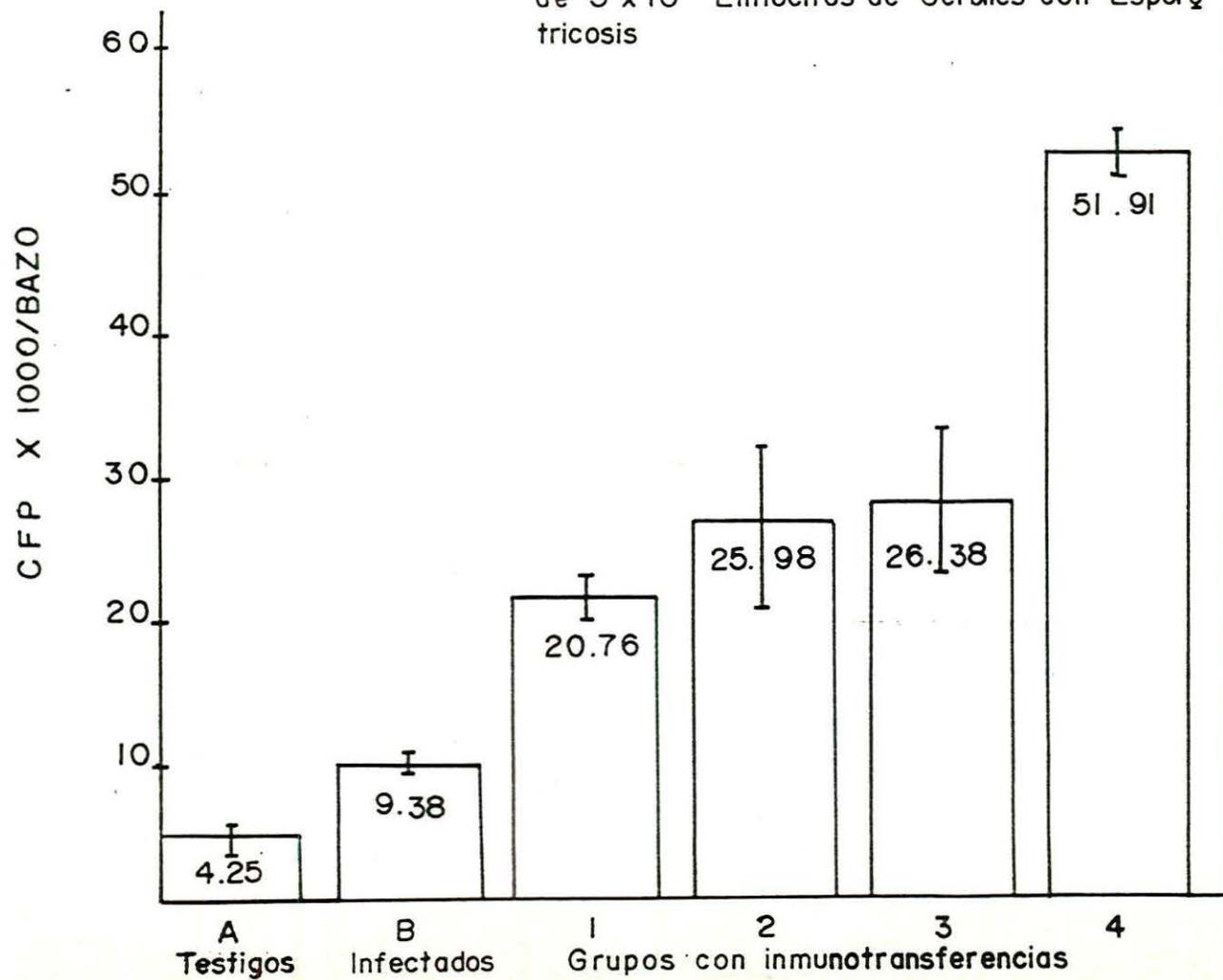
2, 3 y 4; se compararon con el grupo A y se observó disminución estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en todos los grupos de animales infectados. Esta disminución de la hipersensibilidad retardada fue más notoria en los grupos que recibieron 3 y 4 transferencias (Tabla 2).

Por medio de la observación histopatológica por microscopía de luz, se confirmó la valoración de las pruebas de hipersensibilidad retardada a DNFB (Tabla 2). Para ello se dieron valores de 1 a 3 cruces, según la cantidad de elementos que participaban en la reacción inflamatoria del pabellón auricular de los gérbiles, en el que se aplicó la prueba reveladora de la sensibilización a DNFB. La mayor inflamación (3 cruces) se observó en los grupos A, B, 1 y 2. Los grupos 3 y 4 tuvieron una reacción inflamatoria menor, con valores de 2 y 1 cruz respectivamente. Estos resultados se correlacionaron con los obtenidos al medir la inflamación del pabellón auricular de los gérbiles y las diferencias fueron estadísticamente significativas $p < 0.05$ por la prueba de Kruskal-Wallis.

b) INMUNIDAD HUMORAL.

Formación de placas de hemólisis. En la Gráfica 2 se mues-

GRAFICA 2. CFP en Gerbiles que recibieron de 1 a 4 transferencias de 5×10^7 Linfocitos de Gerbiles con Esporotricosis



tra que los gérbiles de los grupos B, 1, 2, 3 y 4 tuvieron mayor número de CFP que el grupo testigo A. La mayor cantidad de CFP se presentó en el grupo 4 que correspondió a los gérbiles que recibieron 4 transferencias de linfocitos esplénicos. Esta elevación en las CFP fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en relación con los demás grupos.

c) FAGOCITOSIS.

La actividad fagocítica de los PMN de los gérbiles de los grupos infectados B, 1, 2, 3 y 4 estuvo disminuída en comparación con el grupo testigo A (Tabla 3). Sin embargo, a los gérbiles de los grupos 1, 2, 3 y 4 que recibieron las transferencias de linfocitos, tuvieron una mayor actividad fagocítica tanto en el IF como en el ID, que los gérbiles infectados pertenecientes al grupo B.

En cuanto a la fagocitosis de los MP se observó un fenómeno similar al descrito para los PMN. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Por otra parte en la Tabla 5 se muestra que la actividad fagocítica de los leucocitos PMN y MP de los gérbiles que recibieron 1, 2, 3 y 4 transferencias de linfocitos fue si

TABLA 3. VALORACION DE LA FAGOCITOSIS (IF, ID) DE PMN DE GERBILES QUE RECIBIERON DE 1 A 4 TRANSFERENCIAS DE 5×10^6 LINFOCITOS DE GERBILES CON ESPOROTRICOSIS.

GRUPO	N	IF			ID		
		\bar{X}	\pm	D. E.	\bar{X}	\pm	D. E.
A	10	2.79	\pm	0.53	1.86	\pm	0.39
B	40	1.55	\pm	0.68	0.30	\pm	0.14
1	10	2.31	\pm	0.30	1.45	\pm	0.40
2	10	2.38	\pm	0.40	1.38	\pm	0.35
3	10	2.44	\pm	0.32	1.40	\pm	0.29
4	10	2.29	\pm	0.35	1.41	\pm	0.28

A = GERBILES NORMALES.

B = GERBILES INFECTADOS SIN TRANSFERENCIAS.

1, 2, 3, 4. = GERBILES QUE RECIBIERON DE 1 A 4 TRANSFERENCIAS.

LA DIFERENCIA FUE SIGNIFICATIVA ($p < 0.001$) EN TODOS LOS CASOS AL COMPARAR A vs B, 1, 2, 3, Y 4.

TABLA 4. VALORACION DE LA FAGOCITOSIS (IF, ID) DE MP DE GERBILES QUE RECIBIERON DE 1 A 4 TRANSFERENCIAS DE 5×10^6 LINFOCITOS DE GERBILES CON ESPOROTRICOSIS.

GRUPO	N	IF			ID		
		\bar{X}	\pm	D. E.	\bar{X}	\pm	D. E.
A	10	1.90	\pm	0.31	0.86	\pm	0.42
B	40	1.07	\pm	0.49	0.34	\pm	0.12
1	10	1.21	\pm	0.39	0.81	\pm	0.30
2	10	1.39	\pm	0.31	0.82	\pm	0.40
3	10	1.23	\pm	0.37	0.98	\pm	0.27
4	10	1.22	\pm	0.40	0.85	\pm	0.29

A = GERBILES NORMALES.

B = GERBILES INFECTADOS SIN TRANSFERENCIAS.

1, 2, 3, 4. = GERBILES QUE RECIBIERON DE 1 A 4 TRANSFERENCIAS.

LA DIFERENCIA FUE SIGNIFICATIVA EN EL IF DE A vs B, 1, 2, 3

Y 4 Y EN EL ID DE A vs B.

TABLA 5. PORCIENTOS DE PMN Y MP EN ACTIVIDAD FAGOCITICA
 (PROMEDIO \pm DESVIACION ESTANDAR) DE GERBILES QUE RECIBIE-
 RON DE 1 A 4 TRANSFERENCIAS DE 5×10^6 LINFOCITOS DE GERBI-
 LES CON ESPOROTRICOSIS.

GRUPO	N	PMN			MP		
		\bar{X}	\pm	D. E.	\bar{X}	\pm	D. E.
A	10	90.0	\pm	5.0	87.2	\pm	5.7
B	40	71.8	\pm	17.9	77.5	\pm	17.7
1	10	90.6	\pm	6.9	70.5	\pm	27.8
2	10	87.7	\pm	5.0	88.8	\pm	6.9
3	10	93.2	\pm	6.5	89.3	\pm	8.7
4	10	93.2	\pm	4.5	90.0	\pm	5.5

A = GERBILES NORMALES.

B = GERBILES INFECTADOS SIN TRANSFERENCIAS.

1, 2, 3, 4. = GERBILES QUE RECIBIERON DE 1 A 4 TRANSFERENCIAS.

LA DIFERENCIA FUE SIGNIFICATIVA ($p < 0.001$) ENTRE LOS PMN DE A vs B Y ENTRE LOS MP DE A vs 1.

**BIBLIOTECA CENTRAL**

milar a la del grupo testigo A. La diferencia sólo fue estadísticamente significativa al comparar el número de células que estaban en actividad fagocítica en los PMN del grupo B y en los MP del grupo 1 con los del grupo A.

Determinación de la enzima MPO. En la Tabla 6 se observa que la actividad de la enzima MPO de PMN se encontró significativamente disminuída en los grupos B, 1, 2, 3 y 4 en relación con el grupo testigo A. Sin embargo, también se observa que los gérbiles de los grupos 1, 2, 3 y 4 que recibieron las transferencias de linfocitos tuvieron mayor actividad de MPO que los gérbiles infectados que integraron el grupo B, que estuvieron infectados pero no recibieron transferencia de linfocitos. La actividad de MPO en los MP fue menor del $4.3\% \pm 0.6\%$ en todos los grupos, en virtud de que los MP se encontraban en reposo y no activados. La activación de los macrófagos origina que la actividad de MPO se incremente de manera considerable.

TABLA 6 . PORCIENTO DE PMN ($\bar{X} \pm D.E.$) QUE TUVIERON ACTIVIDAD DE LA ENZIMA MPO EN GERBILES QUE RECIBIERON DE 1 A 4 TRANSFERENCIAS DE 5×10^6 LINFOCITOS DE GERBILES CON ESPOROTRICOSIS.

GRUPO	N	PMN CON ACT. DE MPO		
		\bar{X}	\pm	D. E.
A	10	88.7	\pm	4.48
B	40	42.2	\pm	5.50
1	10	66.0	\pm	6.60
2	10	62.7	\pm	12.80
3	10	74.7	\pm	3.80
4	10	69.1	\pm	11.60

A = GERBILES NORMALES.

B = GERBILES INFECTADOS SIN TRANSFERENCIAS.

1, 2, 3, 4. = GERBILES QUE RECIBIERON DE 1 A 4 TRNASFERENCIAS.
 LAS DIFERENCIAS DEL GRUPO A vs B, 1, 2, 3 Y 4 FUERON SIGNIFICATIVAS ($p < 0.001$).

DISCUSION.

La esporotricosis varía en su manifestación clínica, desde la forma fija, hasta la linfagítica diseminada, ocasionalmente puede presentar curación espontánea (5-8, 51). Se desconoce la razón de esta variabilidad. Para explicarla se han externado diversas teorías entre las que destaca la alteración en la relación huésped-parásito (9, 22-24, 52-54).

En cuanto al parásito, en la actualidad no se tienen antecedentes de la existencia de cepas de S. schenckii de diferente virulencia (55, 56). Por lo que las variaciones en la expresión de la enfermedad no permiten relacionarlas con la virulencia del hongo.

Respecto al huésped, cabe la posibilidad de que la expresión de la esporotricosis tenga relación con un estado de inmunodeficiencia del propio huésped, puesto que se sabe que en condiciones de inmunosupresión, las infecciones se establecen con mayor facilidad, como ocurre en infecciones virales, entre ellas la del virus de la inmunodeficiencia humana (57), bacterianas (58, 59), al igual que en micosis como candidiasis (60) e histoplasmosis (61).

En relación con la esporotricosis, se tienen antecedentes

de disminución de la inmunidad celular (62,63), así como de la capacidad microbicida (24) y del contenido de la enzima MPO en células fagocíticas de los enfermos con esporotricosis (49). No obstante esto, en un estudio previo (64) se encontró que los mecanismos inmunológicos celular y humoral, se activan durante la infección por S. schenckii. Esto fue confirmado en el presente trabajo, en el que se encontró que la esporotricosis indujo hiperactividad en la respuesta inmune humoral, al encontrarse elevadas significativamente las CFP.

Por otra parte, en determinados tipos de cáncer, la transferencia de células esplénicas provenientes de animales con tumores, induce un estado de inmunosupresión en animales normales (36 - 41). En el caso de las infecciones por hongos, no se tienen antecedentes. En el presente trabajo se observó un doble efecto de la transferencia de linfocitos esplénicos de gérbiles con esporotricosis a gérbiles sanos. Por un lado se propició discreta supresión de la respuesta inmune celular, a nivel de hipersensibilidad retardada a DNFB y por el otro se activó la respuesta inmune humoral, a través de la elevación del número de CFP. Igualmente aumentó la actividad fagocítica la cual como ya se ha señalado en trabajos previos (24,49) se encuentra

disminuída a nivel de IF, ID y contenido de MPO. Pero cuando los animales recibieron de 1 a 4 transferencias de linfocitos, aumentó la actividad fagocítica, aunque no la llevó hasta la normalidad. Este resultado muestra que la transferencia de linfocitos de gérbiles con esporotricosis a gérbiles sanos, tuvo un efecto modulador de la respuesta del huésped en contra de S. schenckii lo cual quedó de manifiesto cuando se hizo el reto con levaduras de S. schenckii viables a los animales que recibieron de 1 a 4 transferencias de linfocitos en los que la enfermedad no se desarrolló en forma diseminada en ninguno de los grupos transferidos.

Probablemente en la transferencia de células esplénicas, la presencia de linfocitos T cooperadores predominó sobre las células T supresoras, lo que es congruente debido a que la disminución en la respuesta inmune celular en la esporotricosis experimental es muy sutil, como se muestra en los resultados del presente estudio, en los que se encontró una leve disminución de la respuesta inflamatoria en las reacciones de hipersensibilidad retardada a DNFB, aunque las pruebas siempre fueron positivas al compararse las mediciones del grosor del pabellón auricular de los gérbiles antes y después de la inmunización con DNFB, así como

también en los cortes histológicos de los pabellones auriculares en los que se aplicó la prueba reveladora de la sensibilización con DNFB, valorados por microscopía de luz.

CONCLUSION.

La transferencia de linfocitos esplénicos de gérbiles con esporotricosis a gérbiles sanos mostró un doble efecto. Por una parte propició discreta supresión de la respuesta inmune celular y por la otra hiperactivó la inmunidad humoral y la actividad fagocítica.

BIBLIOGRAFIA.

1. Shenck, B.R.: On a refractory subcutaneous abscesses by a fungus possibly related to the Sporotrichum. Bull Hopkins Hosp. 9 : 286, 1898.
2. Harvey McGehee, A.: Two mycoses first described at Johns Hopkins. Hopkins Med. J. 135, 1974.
3. Novalle, J., y Lavallo, P.: Esporotricosis (algunos aspectos histopatológicos). V Congreso Mexicano de Dermatología. 270-275. 1968.
4. González-Ochoa, A.: Gaceta Médica Mexicana. 95: 463-474 1965.
5. Rippon, J.w.: Medical Micology, 2nd Edition. W.B. Saunders, Philadelphia. 1982.
6. Ewing, G.E.; Bosl, G.J., y Peterson, P.K. : Sporothrix schenckii meningitis in a farmer with Hodking's disease Am. J. Med. 68: 455-457, 1980.
7. Mayorga, R.; Cáceres, A.; Toriello, C.; Gutiérrez, G.;

- Alvarez, D.; Ramirez, M.E., y Mariat, F.: Investigación de una zona endémica de esporotricosis en la región de La Laguna de Ayarza, Guatemala. Bol. Sanit. Panam. 87: 20-34, 1979.
8. Nicot, J., y Mariat, F.: Caracteres morphologiques et position systematique de *Sporothrix schenckii*, agent de la sporotrichose humaine. Mycopathol. Mycol. Appl. 19: 53-65, 1973.
9. Ramos-Zepeda, R., y González-Mendoza, A.: Metabolic activity of phagocytes in experimental sporotrichosis. Mycopathologia. 93: 109-112, 1986.
10. Mohr, J.A.; Greffiths, W., y Long, H.: Pulmonary sporotrichosis in Oklahoma and susceptibilities in vitro. Am. Rev. Resp. Dis. 119: 961-964, 1979.
11. Manhart, J.W.; Wilson, J.A., y Korbitz, B.C.: Articular and cutaneous sporotrichosis. J. Am. Med. Assoc.: 365-367, 1970.
12. Mariat, F.: The epidemiology of the mycosis: some comments in relation to a particular case of sporotrichosis. Ciba Foundation Symposium Mycoses. 144-159, 1968.

13. Latapí, F.: Sporotrichosis in México. Laval Med. 345: 732-738, 1963.
14. Mackinnon, J.E.; Conti-díaz, I.A.; Gexuela, E.; Civila E., y Daluz, S.: Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and consideration on its pathogenicity and ecology. Sabouraudia. 7: 30-45, 1968.
15. Lavalle, P.: Aspectos clínicos, inmunológicos y epidemiológicos de la esporotricosis. Memorias IV Congreso Mexicano de Dermatología. 5-18, 1967.
16. Mariat, F.; Lavalle, P., y Destomhes, P.: Recherches sur la sporotrichose. Sabouraudia. 2: 60-79, 1962.
17. Conant, N.; Smith, D.T.; Baker, R.D., y Callaway, J.L.: Micología, Ed. Interamericana, 3a. Ed. 323-353, 1972.
18. Wada, R.: Studies on mode of action of potassium iodine upon sporotrichosis. Mycopathologia. 34: 97-107, 1968.
19. Hiruma, M., y Kagawa, S.: Ultrastructure of *Sporothrix schenckii* treated with iodine-potassium iodide solution. Mycopathologia. 97: 121-127, 1987.

20. Stone, D. J. : How iodides cure sporotrichosis by increased inflammation. *Texas Medicina*. 65: 53-54, 1969.
21. Cunningham, K. M. ; Bulmer, G. S. , y Rhoades, E. R. : Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii* *J. Infect. Dis.* 140: 815-817, 1979.
22. Stobo, J. D. ; Sigrun, P. ; Vanscoy, R. E. , y Hermans, P. E. : Suppressor thymus-derived lymphocytes in fungal infection: *J. Clin. Invest.* 47: 281-319. 1976.
23. Karlin, J. V. , y Nielsen, H. S. : Serologic aspects of sporotrichosis. *J. Infect. Dis.* 121: 316-327, 1970.
24. Charoenvit, Y. , y Taylor, R. L. : Experimental sporotrichosis in syrian hamsters. *Infect. Immun.* 23: 366-372, 1979.
25. Stossel, T. P. : Phagocytosis (First of three parts). *New Engl. J. Med.* 290: 717-723, 1974.
26. Stossel, T. P. : Phagocytosis (Second of three parts). *New Engl. J. Med.* 290: 774-780, 1974.
27. Cline, M. J. ; Lehrer, R. I. ; Territo, M. C. , y Golde, D.

- W.: Monocytes and macrophages: functions and diseases. Ann. Intern. Med. 88: 78-88, 1978.
28. McLeod, R., y Remington, J.S.: Studies on the specificity of killing of intracellular pathogens by macrophages. Cell Immunol. 34: 156-174, 1977.
29. Klebanoff, S.J.: Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. Seminars in Hematology XII: 117-142, 1975.
30. Fantone, J.C., y Word, A.P.: Role of oxigen-derived free radicals and metabolites in leukocytes-dependent inflamatory reactions. Am. J. Phatol: 107. (3); 397 - 418, 1982.
31. Klebanoff, S.J.: Iodination of bacteria : a bactericidal mechanism. J. Exp. Med. 126: 1063-1078, 1967.
32. Klebanoff, S.J.: Myeloperoxidase, halide-hydrogen peroxide antibacterial system. J. Bacteriol. 95 : 2131-2138, 1968.
33. Lehrer, R.I: Antifungal effects of peroxidase system.

- J. Bacteriol. 99: 361-369, 1969.
34. Belding, M.E.; Klebanoff, S.J., y Ray, C.G.: Peroxidase mediated virucidal systems. Science 167 : 195-201, 1970.
 35. Kwok-choy Lec. Macrophages heterogeneity in the stimulation of T cell proliferation. En: Macrophage regulation of immunity. Eds. Unanue, E.R., y Rosenthal, A.S. Acad. Press New York, pp 319-332, 1980.
 36. Gowtam, S.C.: Production of immunosuppressive factor(s) by a weakly immunogenic fibrosarcoma T 241. Anticancer Res. 4: 263-268, 1983.
 37. Berendt, M.J., y North, R.J.: T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. J. Exp. Med. 1: 69-80, 1980.
 38. Gowtam, S.C., y Deodhar, S.D.: Presence of suppressor cells in spleen of mice bearing a weakly immunogenic syngenic tumor. Cancer. Res. 8: 2945-2951, 1979.
 39. Barna, B.P., y Deodhar, S.D.: Immunological activity

- of regional lympho nodes in tumor-bearing mice. *Cancer Res.* 7: 2711-2717, 1979.
40. Schechter, B., y Feldman, M.: Suppressor cells prevent host resistance to tumor growth. *Naturwissenschaften.* 3: 140-146, 1979.
41. Treves, A. J.; Cohen, I. R., y Feldman, M. : Suppressor factor secreted by T-lymphocytes from tumor-bearing mice. *J. Nat. Cancer. Inst.* 2: 409-414, 1976.
42. Valdez, J. C.; Mesón, D. E.; Petrino de, S. F.; Jorrat de, B. B., y Valdez de, G. A.: Induction of the immune response suppression in mice inoculated with *Candida albicans*. *Mycopathologia.* 93: 147-150, 1986.
43. Reyes-Montes, M. R.; García-Camacho, M. P.; Casasola, J., y Taylor, M. L.: Immunosuppression transfer by spleen cells from young to adult mice previous to *Histoplasma capsulatum* infection. *Mycopathologia.* 101: 69-75, 1988.
44. Tsubura, E., y Schearz, J.: Treatment of experimental sporotrichosis in mice. *Mycopathol. Mycol. Appl.* XIV : 55-56, 1961.

45. Barbee, W.C.; Ewert, A., y McDonald, E.: Animal model sporotrichosis in the domestic cat. *Am. J. Pathol.* 86: 281-284, 1977.
46. Scott, D.W.; Bentinck, S.J., y Hagerty, G.F.: Sporotrichosis in three dogs. *Cornell Vet.* 64: 416-426, 1974.
47. Streilein, W.J.; Galen, T.T.; Toews, M.D.; James, N.G., y Bergstresser, P.R.: The role of Langerhans cell sensitivity within epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 74: 319-322, 1980.
48. Cunningham, A.J., y Szenberg, A.: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology.* 14: 599-600, 1968.
49. Cunningham, K.M.; Bulmer, G.S., y Rhoades, E.R.: Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii*. *J. Infect. Dis.* 140: 815-817, 1979.
50. Kaplow, L.S.: Simplified myeloperoxidase stain using bencidine dihydrochloride. *Blood.* 26: 215, 1965.
51. Bargman, B.H.: Sporotrichosis of the nose with spontaneous cure. *Can. Med. Assoc. J.* 124: 1027, 1981.

52. Shiraishi, A.; Nakagaki, K., y Arai, T.: Experimental sporotrichosis in congenital athymic (nude) mice. *J. Reticuloendothel. Soc.* 26: 333-336, 1979.
53. Meléndez-Ruiz, C.E.; González-Mendoza, A.; Sotomayor, J.M.; Ruiz-Godoy, V.M., y Ramos-Zepeda, R.: Perfil inmunológico del paciente con esporotricosis linfocutánea. *Mycopathologia* 83: 169-173, 1983.
54. González-Mendoza, A.; Meléndez-Ruiz, C.E., y Ramos-Zepeda, R.: Phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *S. schenckii* in patients with sporotrichosis. *Proceedings of the 5th International Conference on the Mycoses. Sc. No. 396, PAHO. Washington, D.C.* 308-311, 1980.
55. Findlay, G.H., y Uisner, H.F.: Studies in sporotrichosis: Fungal morphogenesis and pathogenicity in differing environments. *Mycopathologia* 96: 115-122. 1986.
56. Carrada-Bravo, T.: New observations on the epidemiology and pathogenesis of sporotrichosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 69: 267-272, 1975.

57. Reddy, M.M., y cols.: Cell-mediated immunity to recombinant human immunodeficiency virus (HIV) antigens in HIV-infected populations. *J. Infect. Dis.* 159: 120-122, 1989.
58. McMurray, D.: Cell-mediated immunity in anergic patients with pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 118: 827-831, 1978.
59. Godal, T.; Myklestad, B.; Samuel, R., y Myrvang, B.: Characterization of the cellular immune effect in lepromatous leprosy: A specific lack of circulation *Mycobacterium leprae* reactive lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 9: 821-831, 1967.
60. Kirkpatrick, Ch.; Chandler, J.W., y Schimke, R.N.: Chronic Mucocutaneous moniliasis with impaired delayed hypersensitivity. *Clin. Exp. Immunol.* 6: 375-379, 1970.
61. Gómez, A.M.: Role of L3T4+ T in host defense against *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 56: 685-691, 1988.
62. Plouffe, J.F; Silva, J.; Fekety, R.; Reinhalter, E., y

Browne, R.: Cell-mediated immune responses in sporotrichosis. *J. Infect. Dis.* 139: 152-157, 1979.

63. Hiroshi, H., y Sasai, Y.: A peculiar case of sporotrichosis. *Dermatologica.* 160: 37-40, 1980.
64. Ramos-Zepeda, R.; Ramos-Zepeda, R.; Ramos-Damian, M.E. González-Rico, B., y González-Mendoza, A.: Evaluación de la respuesta inmune en la esporotricosis experimental por el conteo de linfocitos T y B. *Med. Cut. Ila.* En prensa.