

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Proyecto de investigación:

“Estudio *in vitro* de la respuesta inmunológica en la esporotricosis cutánea”

Línea de investigación:

Diseño y Producción de Biológicos

Comunicación idónea de resultados para obtener el grado de Maestra en Ciencias
Farmacéuticas.

Presenta:

Paredes Rojas Araceli

2142800442

Comité Tutorial:

Cotutor: Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Cotutor: M. en C. Alejandro Palma Ramos

Asesora: Dra. Laura Estela Castrillón Rivera

Junio 2016



Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Proyecto de investigación:

“Estudio *in vitro* de la respuesta inmunológica en la esporotricosis cutánea”

Comité Tutorial:

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez Vo.Bo. _____

M. en C. Alejandro Palma Ramos Vo.Bo. _____

Dra. Laura Estela Castrillón Rivera Vo.Bo. _____

Q. F. B. Araceli Paredes Rojas
Matrícula 2142800442 _____



Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Proyecto de investigación:

“Estudio *in vitro* de la respuesta inmunológica en la esporotricosis cutánea”

Jurado

Presidente: Dra. Julieta Luna Herrera

Vocal: Dra. María de los Ángeles Martínez Rivera

Secretario: Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Resumen

La esporotricosis es una micosis subcutánea granulomatosa subaguda o crónica causada por especies del complejo dimórfico *Sporothrix schenckii*, que afecta preferentemente cara y extremidades. En lesiones extracutáneas puede afectar pulmones, huesos, articulaciones u otros órganos. La esporotricosis es cosmopolita, en América, los países con mayor número de casos publicados son: Brasil, México y Colombia. En México ocupa el segundo lugar entre las micosis subcutáneas, después del micetoma; el mayor número de casos confirmados se han registrado en: la Ciudad de México, Jalisco, Guanajuato, Puebla, Hidalgo, Veracruz y Guerrero [4,5,6,7,8].

Para comprender los mecanismos que participan en el establecimiento de esta patología es importante conocer que la piel representa la primera línea de defensa contra la infección de una gran variedad de microorganismos y entre las células que participan en la resistencia contra las infecciones se encuentran los queratinocitos que son las células más abundantes en este tejido, sin embargo, existen pocos reportes acerca de su participación en el control de este hongo, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar algunos efectores de la respuesta inmunológica de estas células infectadas con *S. schenckii*.

Para el diseño experimental se realizaron cinéticas de infección de 12 h de queratinocitos humanos de la línea celular HaCaT infectados con conidios y blastoconidios de *S. schenckii* a una MOI de 1:1. Se evaluó la expresión de los receptores tipo Toll (TLR-2, TLR-4, TLR-6), Receptor a Manosa y Receptor de complemento CR3, mediante el uso de las técnicas de qPCR y Microscopia confocal; además se realizó la evaluación de la expresión y cuantificación de citocinas proinflamatorias (MCP-1, IL-8, IL-6, IL-1 β y TNF- α) por las técnicas de qPCR y ELISA; así como la determinación del rearrreglo de las fibras de actina por Microscopia confocal.

En las células infectadas con conidios se observó un aumento en la producción de quimiocinas MCP-1 (76 pg/mL a las 6h) e IL-8 (149 pg/mL a las 8h) por los queratinocitos humanos, adicionalmente se observa un aumento en la expresión del Receptor a Manosa, TLR-6 y Receptor CR3, existen cambios en el rearrreglo de actina los cuales permanecen hasta el término de la cinética.

Cuando la línea celular se infectó con blastoconidios, se observó un incremento de las quimiocinas MCP-1 e IL-8, también una sobreexpresión del receptor a manosa, TLR-6 y el receptor CR3, al igual que en la infección con conidios, se observaron cambios importantes en el rearrreglo de las fibras de actina y estos permanecieron hasta el término de la cinética.

Los queratinocitos humanos infectados con blastoconidios y conidios de *S. schenckii* producen un ambiente quimiotáctico, además se induce la sobreexpresión de diversos receptores como el de Manosa CR3 y TLR6.

Agradecimientos Institucionales



A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco y a la coordinación y profesores del programa de Maestría en Ciencias Farmacéuticas.



A la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional por su apoyo para la realización del análisis por microscopia confocal.

Agradecimientos

A mi mamá Juana Rojas, por su cariño, apoyo, comprensión y porque siempre confiaste en todo lo que soñé, tú me cuidaste y me guiaste hasta aquí.

A mis hermanos: Juan Carlos, Lucía y Lupita, que gracias a su cariño y consejos he vivido con ellos grandes momentos a lo largo de mi vida, además de compartir el amor a la investigación.

A mis amigos y compañeros, que estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos, y pese a ello me apoyaron incondicionalmente.

A mi comité tutorial: Al Dr. Jorge Castañeda Sánchez, al M. en C. Alejandro Palma Ramos y a la Dra. Laura Castrillón, por haber dirigido este trabajo, por haber confiado en mí, por su apoyo, paciencia y los consejos en todo el proceso de elaboración de esta Tesis.

Yo pertenezco a aquellos que creen que la ciencia es algo muy bello. El científico en su laboratorio no es sólo un técnico. Se encuentra ante los misterios de la naturaleza con la misma reverencia que un niño ante un cuento de hadas...

Marie Curie

ÍNDICE

	Pág.
Abreviaturas	11
Índice de tablas	13
Índice de figuras	14
1. Introducción	16
2. Antecedentes	18
3. Marco teórico	21
3.1 Esporotricosis	21
3.1.1 Epidemiología	21
3.2 <i>Sporothrix schenckii</i>	22
3.2.1 Aspectos bioquímicos de la pared de <i>S. schenckii</i>	22
3.2.2 Mecanismo de Infección	24
3.3 Clasificación de las formas clínicas	25
3.4 Estructura y función de la piel	27
3.4.1 Inmunología de la piel	29
3.4.2. Los queratinocitos humanos: células participantes en la respuesta innata	30
3.5 Receptores tipo Toll	31
3.6 Receptores para endocitosis y fagocitosis	37
3.7 Respuesta Inmunológica contra <i>S. schenckii</i>	39
4. Planteamiento del problema	41
5. Hipótesis	42

6. Objetivos	42
6.1 Objetivo General	42
6.2 Objetivos específicos	42
7. Materiales y métodos	44
7.1 Esquema General de trabajo	45
7.2 Cultivo celular de queratinocitos humanos, línea HaCaT	45
7.3 Cultivo del microorganismo y suspensión	45
7.4 Oponización de conidios y blastoconidios de <i>S. schenckii</i>	45
7.5 Ensayo de infección celular	46
7.6 Cinética de internalización de <i>S. schenckii</i>	46
7.7 Extracción de ARN total	47
7.8 Transcripción reversa (RT)	48
7.9 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	48
7.9.1 Análisis cuantitativo de la expresión de los genes	49
7.10 Inmunofluorescencia para la detección de los receptores Tipo Toll, Manosa y CR3 en células HaCaT.	50
7.10.1 Análisis de la intensidad media de fluorescencia	51
7.11 Cuantificación de citocinas por ELISA	51
7.12 Análisis estadístico	51
7.13 Determinación de los cambios estructurales en los filamentos de actina de los queratinocitos infectados con <i>S. schenckii</i>	52
8. Resultados	53
8.1 Estandarización de la técnica para cultivos celulares	53
8.2 Cultivos de <i>Sporothrix schenckii</i>	53

8.3 Cinética de internalización de <i>S. schenckii</i>	55
8.4 Análisis cuantitativo de la expresión de los genes para TLRs por qPCR	58
8.5 Inmunofluorescencia para la detección de los receptores Tipo Toll, Manosa y CR3 en células HaCaT	60
8.5.1 Análisis de la intensidad media de fluorescencia	63
8.6 Análisis cuantitativo de la expresión de los genes para citocinas por qPCR	65
8.7 Cuantificación de citocinas por ELISA	67
8.8 Inmunofluorescencia para la determinación de los cambios estructurales en el citoesqueleto (filamentos de actina) de los queratinocitos infectados con <i>S. schenckii</i>	69
7. Discusión	72
8. Conclusiones	79
9. Perspectivas	80
10. Bibliografía	81
11. Anexos	86

Abreviaturas

BHI	Infusión cerebro corazón
CD	Grupo de diferenciación del inglés “cluster of differentiation”
D-MEM	Medio esencial mínimo (Dulbecco’s Modified Eagle Medium)
ETAF	Factor activador de timocitos derivado de células epidérmicas
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1 del inglés Intercellular Adhesion Molecule 1
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
LRRs	Segmentos repetitivos ricos en Leucina
LTA	Ácido lipoteicoico
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1 o “Monocyte Chemoattractant Protein-1”
M-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos
NK	“Natural killer” (asesina natural)
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer fosfato salino de sus siglas en inglés “Phosphate Buffered Saline”
PDGF	Factor de crecimiento/diferenciación plaquetario
PGN	Peptidoglicano
PMA	Forbol- miristato-acetato
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
qPCR	PCR cuantitativa o PCR en tiempo real
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

<i>S. schenckii</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
TGF-β	Factor de crecimiento transformante
TLR	Receptor tipo Toll o "Toll-like receptor"
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas del inglés "Enzyme-linked Immunosorbent Assay"
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
RM	Receptor a Manosa
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno del inglés "Reactive Oxygen Species"
NO	Óxido Nítrico
MHC I	Complejo principal de histocompatibilidad clase I del inglés "major histocompatibility complex"
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II del inglés "major histocompatibility complex"
INFγ	Interferón gamma

Índice de tablas

Tabla 1. Reconocimiento de PAMPs por TLRs y otros PRRs.

Tabla 2. Iniciadores usados para la detección de cada uno de los genes de las citocinas y receptores.

Índice de figuras

- Figura 1.** Distribución mundial de la esporotricosis.
- Figura 2.** Estructuras simpodiales de *S. schenckii*.
- Figura 3.** Cuerpos asteroides en esporotricosis.
- Figura 4.** Clasificación de la esporotricosis.
- Figura 5.** Clasificación de las formas clínicas en la esporotricosis: Chancro esporótrico y Esporotricosis forma fija.
- Figura 6.** Clasificación de las formas clínicas en la esporotricosis: Esporotricosis linfagítica y Esporotricosis diseminada.
- Figura 7.** Estructura de la piel. Distribución de las células inmunitarias.
- Figura 8.** Estructura del receptor tipo Toll (TLR) y unión de ligandos de PAMP.
- Figura 9.** Activación de receptores tipo Toll y la activación de citocinas proinflamatorias.
- Figura 10.** Vías de señalización y activación de los TLRs.
- Figura 11.** Esquema de los dominios del receptor de manosa.
- Figura 12.** Esquema general de trabajo I.
- Figura 13.** Cultivos celulares de queratinocitos humanos HaCaT.
- Figura 14.** Cultivo de *S. schenckii*.
- Figura 15.** Morfología microscópica de *Sporothrix schenckii*.
- Figura 16.** Internalización de blastoconidios de *S. schenckii* en queratinocitos humanos HaCaT.
- Figura 17.** Internalización de conidios de *S. schenckii* en queratinocitos humanos HaCaT por Microscopia confocal.
- Figura 18.** Internalización de blastoconidios de *S. schenckii* en queratinocitos humanos HaCaT por Microscopia confocal.
- Figura 19.** Análisis cuantitativo de la expresión de TLRs en cinética de Infección con conidios de *S. schenckii*, por qPCR.
- Figura 20.** Análisis cuantitativo de la expresión de TLRs en cinética de Infección con blastoconidios de *S. schenckii*, por qPCR.

- Figura 21.** Marcaje por microscopia confocal de los receptores tipo Toll 2, 4, 6, Receptor de Manosa (RM) y Receptor CR3 en queratinocitos humanos. Cinética de infección con conidios de *S. schenckii*.
- Figura 22.** Marcaje por microscopia confocal de los receptores tipo Toll 2, 4, 6, Receptor a Manosa (RM) y Receptor CD11b (CR3) en queratinocitos humanos. Cinética de infección con blastoconidios de *S. schenckii*.
- Figura 23.** Análisis de la intensidad media de fluorescencia (IMF) en cinética de Infección con conidios de *S. schenckii*.
- Figura 24.** Análisis de la intensidad media de fluorescencia (IMF) en cinética de Infección con blastoconidios de *S. schenckii*.
- Figura 25.** Análisis cuantitativo de la expresión de citocinas en cinéticas de Infección con conidios de *S. schenckii*, por qPCR.
- Figura 26.** Análisis cuantitativo de la expresión de citocinas en cinéticas de Infección con blastoconidios de *S. schenckii*, por qPCR.
- Figura 27.** Cuantificación de citocinas en cinéticas de Infección con conidios de *S. schenckii*, por ELISA.
- Figura 28.** Cuantificación de citocinas en cinéticas de Infección con blastoconidios de *S. schenckii*, por ELISA.
- Figura 29.** Cambios en el rearrreglo de las fibras de actina en células HaCaT infectadas con conidios de *S. schenckii*.
- Figura 30.** Cambios en el rearrreglo de las fibras de actina en células HaCaT infectadas con blastoconidios de *S. schenckii*.
- Figura 31.** Esquema propuesto de la interacción de *S. schenckii* con los queratinocitos de la línea HaCaT.

1. INTRODUCCIÓN

La esporotricosis es una micosis subcutánea granulomatosa subaguda o crónica causada por especies del complejo dimórfico *Sporothrix schenckii*, que afecta preferentemente cara y extremidades. En lesiones extracutáneas puede afectar pulmones, huesos, articulaciones u otros órganos [1,2].

Es cosmopolita, en América, los países con mayor número de casos publicados son: Brasil, México y Colombia [3]. Sin embargo en México ocupa el segundo lugar entre las micosis subcutáneas, después del micetoma; el mayor número de casos confirmados se han registrado en: la Ciudad de México, Jalisco, Guanajuato, Puebla, Hidalgo, Veracruz y Guerrero [4,5,6,7,8].

Se ha podido reconocer cuando menos cinco especies fúngicas diferentes: *S. schenckii sensu strictu*, *S. brasiliensis* y *S. globosa*, capaces de causar enfermedad humana y animal; las otras dos especies son *S. mexicana* y *S. albicana* no asociadas con ninguna enfermedad [9,4].

El hongo puede causar múltiples cuadros clínicos, el más frecuente es la esporotricosis cutáneo-linfagítica que ocupa el 75% de los casos, caracterizada por la presencia de granulomas esporotricos, tuberculoideos o de cuerpo extraño. La histopatología de la esporotricosis está determinada por la presencia de una masa de histiocitos que rodean un área central de neutrófilos o material necrótico rodeado de neutrófilos, células plasmáticas y linfocitos con presencia de blastoconidios (levaduras). El granuloma tipo tuberculoide tiene un área central y está rodeado de fibroblastos, células epitelioides, linfocitos y células gigantes de Langerhans [10,11].

El mecanismo de infección en los humanos es por inoculación traumática de conidios, debido a ello la epidermis humana proveerá la primera línea de defensa contra este patógeno y en donde los queratinocitos representan la principal población celular estableciendo un medio local de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas necesarias para atraer a otras células que participan en la respuesta inmune contra estos patógenos [12]. El sistema inmune innato permite un rápido reconocimiento de un amplio espectro de patógenos, mediante un repertorio de

receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Después del reconocimiento de PAMPs por los receptores tipo Toll (TLR) se activan los componentes de señalización que inician una respuesta inflamatoria caracterizada por el reclutamiento de células inmunes como son los polimorfonucleares, en el sitio de la infección, además de la producción de efectores como citocinas, péptidos antimicrobianos, especies reactivas de óxido nítrico, etc., con el fin de eliminar al patógeno invasor [13].

Se ha descrito que los queratinocitos son reservorio de citocinas y quimiocinas (IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1, TNF- α), que atraen células polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos; y su activación obedece a la secreción de los mediadores pro-inflamatorios (TNF- α e IL-1) provenientes de la activación de estas células [12].

Los TLRs, comprenden a una familia de 10 receptores en humanos, con distintos perfiles de reconocimiento. En los queratinocitos humanos se conoce la expresión de los receptores, TLR-1 al TLR-6, TLR-9 y TLR-10 [14].

Se ha reportado el papel del queratinocito como célula inmunocompetente en respuesta hacia hongos, cuando en cultivos *in vitro* se ponen en contacto con levaduras de *Candida albicans*, induciendo la secreción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 [14].

Bajo este contexto y a pesar de que los queratinocitos son las células más abundantes de la piel, existen pocos reportes acerca de su participación en el control de la infección causada por este hongo, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta innata de estas células al ser infectadas con conidios y blastoconidios de *S. schenckii*.

2. ANTECEDENTES

El primer caso de esporotricosis se registró en el año 1898 en Estados Unidos por Schenk, quien describió una clásica esporotricosis linfagítica, además de aislar y cultivar el hongo causante de esta patología; más tarde fue clasificado por Smith como un hongo del género *Sporotrichum*. Los siguientes casos se observaron también en Estados Unidos por Hektoen y Perkins, quienes incluyeron al hongo en el género *Sporothrix* y describieron la especie *schenckii*. Los primeros casos mexicanos fueron reportados alrededor de 1913 por Gavón y Aguirre-Pequeño. En 1947, los estudios realizados por González-Ochoa junto con Soto-Figueroa serían importantes en el terreno inmunológico debido a que extrajeron y purificaron el primer antígeno de naturaleza polisacárida, utilizándolo con excelentes resultados en pruebas epidemiológicas [1].

Sin embargo la respuesta inmune del huésped contra *S. schenckii* no se entiende a fondo como la descrita para *Candida albicans* u otros hongos patógenos en humanos [15], por lo tanto, los mecanismos inmunológicos implicados en la prevención y control de las infecciones por *S. schenckii* todavía no son claras y es probable que incluyan tanto las respuestas celulares y humorales, que parecen ser desencadenadas por antígenos distintos, de la superficie celular, especialmente algunos lípidos que inhiben el proceso de fagocitosis, mientras que la respuesta humoral es inducida por las proteínas secretadas del hongo (antígenos exo) que no están implicados en la respuesta celular [16]. Sin embargo, la respuesta inmune contra este hongo se ha estudiado desde los años 70 y hasta la fecha se dispone de información limitada sobre su interacción con el sistema inmunitario. Desde entonces estaba claro que los pacientes con defectos en la inmunidad mediada por células eran más susceptibles a la infección sistémica [15,17]. Los estudios que utilizan ratones con la enfermedad granulomatosa crónica mostraron que los mecanismos basados en la utilización de especies reactivas de oxígeno (*ROS*, Reactive Oxygen Species) son esenciales para la eliminación de los blastoconidios fagocitados por los neutrófilos y macrófagos [15,18].

Además, los macrófagos peritoneales activados previamente con Picibanil (OK-432, mezcla liofilizada de *Streptococcus pyogenes* del grupo A, tipo 3, tratada con Penicilina G Potásica) mostraron una buena tasa de muerte intracelular del hongo, haciendo hincapié en la importancia de estos mecanismos (ROS) para su eliminación [15,19]. Además, los blastoconidios de *S. schenckii* son capaces de activar las dos vías del complemento: la clásica y alternativa, el último de forma independiente de la presencia de anticuerpos [15,20]. Aunque los blastoconidios fueron cubiertas por C3, la contribución específica de la activación del complemento durante la respuesta anti-*Sporothrix* todavía no es del todo claro [15].

No obstante, poco se sabe acerca de la respuesta inmune innata y los receptores implicados en el reconocimiento y la fagocitosis de *S. schenckii*. En un estudio realizado por Guzmán y colaboradores, se demostró que la fagocitosis óptima de conidios y blastoconidios por macrófagos THP-1, depende de la opsonización con suero humano pre-inmune [21]. Por otra parte las células fúngicas opsonizadas con anticuerpos, aumentan la capacidad de los macrófagos para fagocitarlos y producir citocinas pro-inflamatorias [22]. A pesar de que los PAMPs localizados en la superficie de *Sporothrix* no han sido identificados, la contribución de los PRRs en su posible reconocimiento ha sido establecida. TLR-4 es capaz de reconocer algunas moléculas del extracto lipídico de los blastoconidios y su activación conduce a la producción de TNF- α , IL-10 y NO [23,13]. Se ha demostrado que los ratones deficientes en TLR-4 infectados con *S. schenckii* producen niveles reducidos de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias [24]. En el caso de TLR-2, en macrófagos de ratón deficientes en este receptor, se muestra una reducción en la capacidad fagocítica de blastoconidios y los animales que carecen de este receptor muestran concentraciones bajas de TNF- α , IL-1 β , IL-2 e IL-10 [25]. Un informe reciente de Guzmán y Col., sugiere la participación del Receptor a Manosa (RM) en la fagocitosis de conidios de *S. schenckii* por macrófagos THP-1 [21]. Por lo tanto la respuesta inmune innata juega un papel clave en el establecimiento de una respuesta protectora anti-*Sporothrix*.

Durante la esporotricosis el huésped puede desarrollar inmunidad adaptativa a través de la activación de macrófagos por las células T CD4⁺, que liberan INF- γ y TNF- α para impulsar la eliminación de *S. schenckii* por los macrófagos y conducir al establecimiento de una respuesta inmune basada en Th1 [15,26,27].

En el año 2009, Sassá y colaboradores [24], realizaron estudios sobre la esporotricosis y la participación de receptores tipo Toll en modelos murinos, cuyo objetivo fue estudiar el papel del TLR-4 durante la respuesta del hospedero ante la infección por *S. schenckii* en el cual se valoró la respuesta inmunitaria a través de la medición de mediadores pro-inflamatorios, tales como, el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α), Óxido Nítrico e Interleucina 10 (IL-10) en macrófagos peritoneales, en el cual reportaron cantidades reducidas de los mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios en ratones deficientes de TLR-4, lo que sugiere la implicación de este receptor en el reconocimiento de este agente infeccioso.

Recientemente, Min Li y colaboradores [28], demostraron que los conidios y los blastoconidios de *S. schenckii* activan la respuesta inflamatoria caracterizada por la producción de citocinas y quimiocinas como IL-6 e IL-8, además de la activación del TLR-2 y TLR-4 en queratinocitos humanos de prepucio neonatal.

Sin embargo, hasta la fecha se dispone de información limitada sobre la interacción de *S. schenckii* con el sistema inmunológico del huésped, especialmente con las células que componen la piel, principal vía de entrada del hongo y en el cual la respuesta inmune innata juega un papel importante en la patogénesis de la esporotricosis.

3. Esporotricosis

Es una micosis subcutánea que afecta de modo preferente el rostro y las extremidades, se caracteriza por nódulos o gomas que dan lugar a lesiones fijas verrugosas o linfagíticas de avance subagudo o crónico; rara vez es extracutánea o sistémica afectando pulmones, huesos o articulaciones. Es producida por el complejo dimórfico *Sporothrix schenckii* [1]. Se considera una micosis de tipo ocupacional propia de los campesinos, que se encuentran en contacto diario con la tierra, la leña, etc. Las regiones endémicas reconocidas tienen clima subtropical [29].

3.1.1 Epidemiología

La esporotricosis es cosmopolita, en América, los países con mayor número de casos publicados son: Brasil, México y Colombia [3]; Australia en Oceanía; en Asia son Japón, India, China Oriental y Corea del Sur. En África sólo la República de África del Sur. En Europa se conocen focos endémicos pequeños, en Italia del Sur, España y las Islas Británicas [29].

Recientemente, *S. schenckii* ha recibido particular atención debido al aumento en el número de infecciones causadas en todo el mundo (Figura 1).

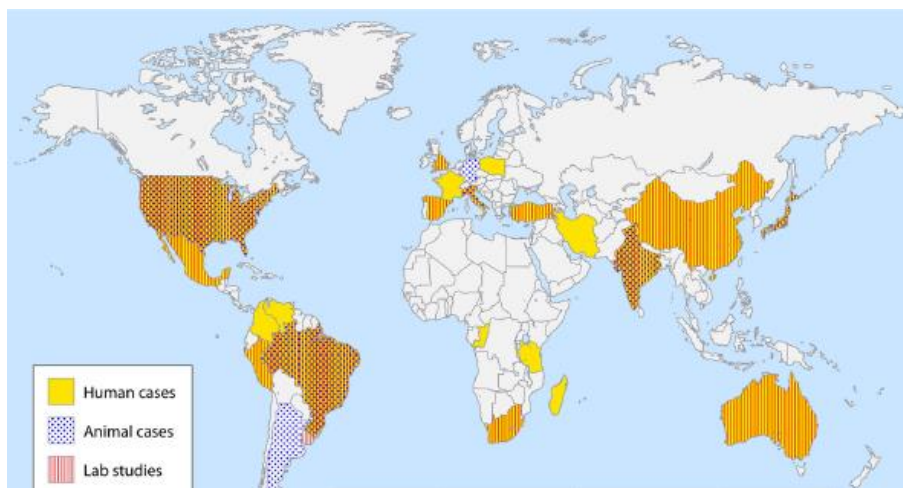


Figura 1. Distribución mundial de la esporotricosis [3].

La presencia del complejo *S. schenckii* en los casos de esporotricosis se ha registrado en todos los continentes y en diferentes regiones geográficas, como las regiones tropicales y subtropicales [30].

Algunas áreas han declarado la esporotricosis como un problema de salud emergente, con un interés creciente por las autoridades sanitarias [31, 32].

Sin embargo en México ocupa el segundo lugar entre las micosis subcutáneas, después del micetoma; el mayor número de casos confirmados se han registrado en: la Ciudad de México, Jalisco, Guanajuato, Puebla, Hidalgo, Veracruz y Guerrero [4,5,6,7,8].

La frecuencia según el sexo no está muy definida, en algunos datos estadísticos se encuentra en ambos sexos por igual, en otras predomina en varones (3:1) y en México el 62% de los casos se ha observado en mujeres. Se presenta a cualquier edad, es preponderante en niños y jóvenes de 16 a 30 años; en México el 28% de los casos ocurre en mayores de 50 años de edad. Mientras que del 10 al 34% de los casos ocurre en niños y predomina en el rostro. Afecta a todos los grupos étnicos por igual. Se presenta en campesinos (44%), jardineros, floristas, carpinteros y amas de casa (30%); puede adquirirse de modo accidental en el laboratorio. Debido a ello se considera una micosis ocupacional, que predomina en estratos socioeconómicos bajos tal vez por la fuente de adquisición. Los factores predisponentes para la infección extra cutánea son la desnutrición y el alcoholismo [33].

3.2 *Sporothrix schenckii*

El agente causal de la esporotricosis es el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*, clásicamente, se había identificado una sola especie, pero con la revolución molecular filogenética se ha podido reconocer cuando menos cinco especies diferentes, distribuidas por regiones geográficas diversas, tales son: *S. schenckii sensu strictu*, *S. brasiliensis* y *S. globosa*, capaces de causar enfermedad humana y animal; las otras dos especies son: *S. mexicana* y *S. albicana* no asociadas con ninguna enfermedad [9,10].

El complejo *Sporothrix* son organismos de la división: *Ascomycota*, clase: *Pirenomicetes*, orden: *Ophiostomatales* y familia: *Ophiostomataceae*, que se encuentran de forma natural en la vegetación en descomposición, excrementos de animales, y los suelos abundantes en celulosa, con un rango de pH de 3,5 a 9.4 [34,35]. Se encuentra en la naturaleza en forma micelial (fase saprofita o infectiva), sobre sustratos vegetales a una temperatura de 20 – 30°C y se caracteriza por presentar hifas finas (1- 3 µm de diámetro), ramificadas, hialinas, septadas con conidióforos de 10 - 30 µm de largo, de las que nacen conidios ovoides o piriformes dispuestos en forma de “pétalos de margarita o flor de durazno” (simpoduloconidios); algunos conidios nacen directamente del tallo de la hifa (raduloconidios) de 3 - 5 micras (Figura 2) [1].

Sin embargo cuando un hospedero es infectado, se desarrolla en los tejidos en forma de blastoconidio (fase parasitaria), con una morfología variable: oval, redonda, fusiforme o en forma de cigarro y con tamaño promedio de 1-3 x 3-10 µm [1]. Mientras que macroscópicamente, se observan colonias cremosas, blanco amarillentas, ligeramente acuminadas, similares a las colonias bacterianas. Otra estructura que puede encontrarse en los tejidos infectados es el cuerpo asteroide esporotricósico, definido como una estructura de blastoconidio rodeada de un halo eosinofílico radiado, PAS-positivo, provocado por el proceso conocido como fenómeno de Splendore-Hoeppli (Figura 3) [36].

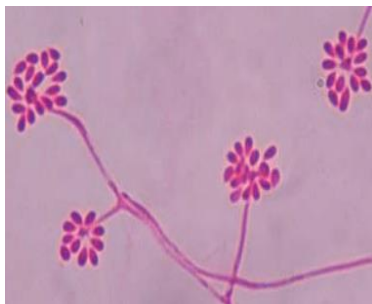


Figura 2. Estructuras simpodiales de *S. schenckii*. Hifas finas, conidióforos y conidios simpodiales organizados en forma de flor de margarita [37].

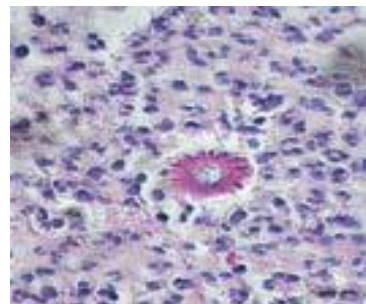


Figura 3. Cuerpos asteroides en esporotricosis. Cuerpo asteroide de *Sporothrix schenckii* por la técnica de H-E [38].

Este halo probablemente es producto de la desintegración de las células hospederas y se considera una reacción antígeno-anticuerpo. No es un signo patognomónico de esporotricosis, se encuentra en 40 a 50% de los casos [36].

La conversión de la forma filamentosa a blastoconidio también es necesaria para que pueda establecerse la infección por *Sporothrix schenckii*. Este hongo produce infecciones después de la implantación de conidios, fragmentos pequeños de hifas o ambos por traumatismos en la piel y el tejido subcutáneo, o bien dentro de los alveolos tras su inhalación, pero esta vía de infección es rara [39].

3.2.1 Aspectos bioquímicos de la pared de *S. schenckii*

La pared fúngica protege a la célula de los cambios drásticos en el ambiente externo; que es el primer punto de contacto con el huésped [40].

La pared celular de *S. schenckii* está compuesta por β -glucanos, galactomananos, quitina, glicoproteínas, glicolípidos, melanina y glucopeptidos (péptidos ramnomananos) [31,34,41]. El análisis químico de estos glucopeptidos muestra que están constituidos por 14% de proteínas y 85% de carbohidratos. Los principales azúcares identificados en la molécula son ramnosa y manosa, mismos que actúan como adhesinas e inductores inmunogénicos, como lo es la glucopeptina de 70 KDa, aparentemente específica del hongo [33]. Se requieren estudios detallados con el fin de conocer más la estructura de la pared celular de este hongo.

3.2.2 Mecanismo de Infección

La principal vía de ingreso del agente es la cutánea, por inoculación traumática de conidios (forma directa) y la forma indirecta, por rasguños o mordeduras de animales (gatos, ratas, ratones, ardillas y armadillos), que transportan los conidios de *Sporothrix* en dientes y uñas, teniendo el papel de vectores.

Con menor frecuencia, es por vía aérea mediante la inhalación de conidios, que da origen a la forma pulmonar, pero esta vía de infección es rara [42].

3.3 Clasificación de las formas clínicas

La enfermedad tiene muchas presentaciones clínicas y depende del sitio de inoculación y de la respuesta del huésped (Figura 4).

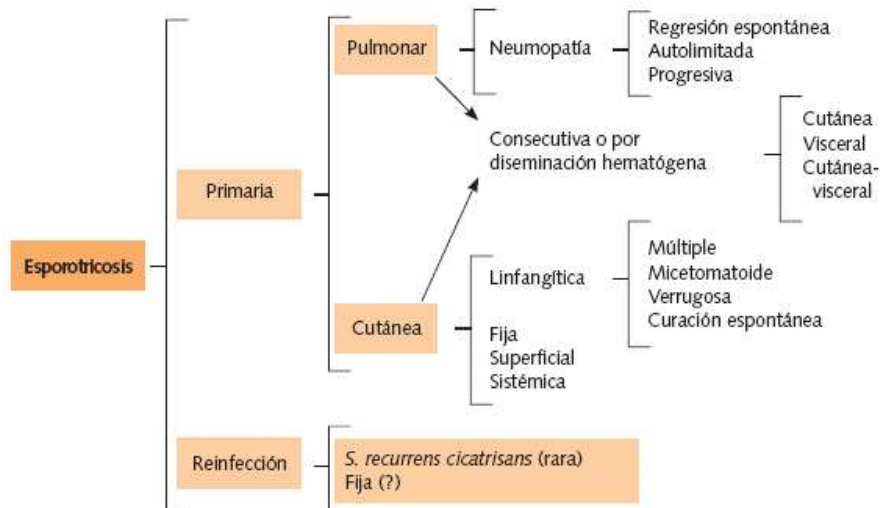


Figura 4. Clasificación de la esporotricosis [33].

Esporotricosis primaria pulmonar: el hongo puede penetrar por las vías respiratorias y originar neumopatías con posible diseminación hematogena, sobre todo en diabéticos, desnutridos y aquellos con deterioro inmunitario [33].

Esporotricosis primaria cutánea: en un paciente con inmunidad celular normal, el hongo penetra por pequeñas heridas o excoriaciones. La primera lesión es un chancro de inoculación o puede haber chancros múltiples, confluentes o dispersos. Es una enfermedad polimorfa con tres formas de manifestaciones clínicas: fija, linfangítica y sistémica [33].

- **Forma fija:** después de un periodo de incubación promedio de tres semanas (rango: cinco días a seis meses), sobre el lugar de la inoculación, comienza un proceso inflamatorio localizado de aspecto banal: aumento de

volumen, enrojecimiento, ulceración, costras, bordes levantados y el color de rosado a violeta, es el llamado chancro esporotricósico (Figura 5), aparece sobre todo en cara, cuello y tronco; en esta variedad no hay diseminación [33].

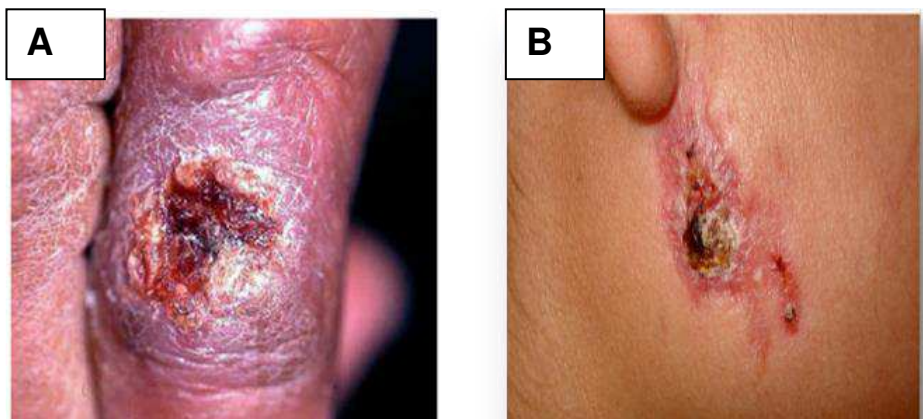


Figura 5. Clasificación de las formas clínicas en la esporotricosis.

A) Chancro esporotricósico. B) Esporotricosis forma fija [33].

- **Forma linfagítica:** es la más frecuente, el chancro de inoculación es un nódulo indoloro de color rojo púrpura que sufre necrosis central y puede ulcerarse; dura semanas o meses, persiste o cicatriza al tiempo que aparecen lesiones nodulares o gomas eritematosos que siguen el trayecto de los vasos linfáticos, permanecen cerrados o pueden ulcerarse y dejar salir exudado purulento (Figura 6 A) [33].
- **Forma diseminada:** menos frecuente (2%), existen dos presentaciones de esporotricosis diseminada: una cutánea y otra sistémica. La primera afecta varias regiones del tegumento, pero no hay alteración sistémica y la respuesta al tratamiento convencional es adecuada. Se considera una infección oportunista grave; afecta órganos internos y puede haber fungemia; ocurre en pacientes con alguna inmunodeficiencia, en especial

con linfoma, SIDA y en aquellos que reciben tratamiento con cortisona, así como en diabéticos y alcohólicos; se acompaña de fiebre, dolor, mal estado general y reducción de peso se ha registrado (Figura 6 B) [33].



Figura 6. Clasificación de las formas clínicas en la esporotricosis.

A) Esporotricosis linfagítica. B) Esporotricosis diseminada [33].

Reinfección: se presenta en sujetos ya sensibilizados con el hongo, sin enfermedad previa; se manifiesta por formas fijas de corta duración o por lesiones sin tendencia a la curación.

Las modalidades extracutáneas son raras; afectan principalmente los huesos, articulaciones, las conjuntivas, el humor acuoso y el área lagrimal [33].

3.4 Estructura y función de la piel

La piel es un órgano dinámico formado por distintos tipos celulares que desempeñan diversos procesos biosintéticos e inmunológicos, entre estos últimos se encuentran los mecanismos de resistencia innata y adaptativa, que se activan cuando existen agresiones al tejido [12].

Se compone por dos capas principales: la epidermis y la dermis (Figura 7). La epidermis es el compartimiento exterior caracterizado por ser un epitelio plano poli-estratificado y queratinizado compuesto de cuatro estratos (estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal) [43].

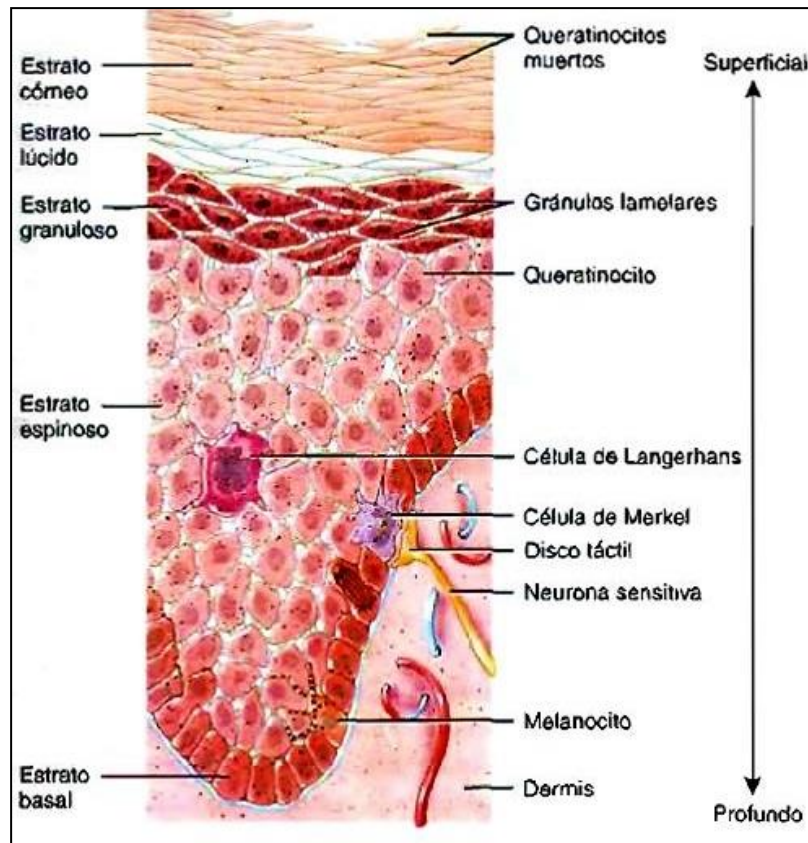


Figura 7. Estructura de la piel.

Distribución de las células inmunitarias [43].

El estrato basal es la última capa de la epidermis y es la responsable del constante recambio de las células de la epidermis. Esta capa contiene solo un grupo de células epidérmicas sin diferenciar, conocidos como queratinocitos basales. Los queratinocitos basales se diferencian y se mueven a la siguiente capa (el estrato espinoso también conocido como la capa de células espinosas) donde inicia el proceso de maduración y se divide para reponer la capa basal esto

explica que la piel se encuentra en cambio constante debido a la migración de los queratinocitos desde la capa basal hasta la capa cornea [44,45]. Las células que se mueven en el estrato espinoso cambian desde ser una forma columnar a una poligonal e inician la síntesis de queratina distinta de la capa de queratina basal. Los queratinocitos en el estrato granuloso son caracterizados por acumulaciones oscuras de material citoplasmático y estas células producen activamente, proteínas de queratina y lípidos. El estrato corneo, como el último producto de maduración de los queratinocitos es la capa más externa de los cuatro estratos de la epidermis, es la única que no se encuentra en otros epitelios y es altamente responsable de la función de barrera de la piel. Las células en esta capa conocidas como corneocitos son células derivadas de queratinocitos muertos que carecen de organelos [43] y que contienen redes de fibrinas y queratina [44].

3.4.1 Inmunología de la piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo y por lo tanto una importante pieza de la respuesta inmune contra infecciones, debido a que posee factores de protección que limitan la colonización y la supervivencia de los microorganismos, aparte de funcionar como barrera física, tiene potentes mecanismos bactericidas y fungicidas.

El mecanismo de resistencia a infecciones puede dividirse en respuesta inmunitaria innata y adaptativa. La inmunidad innata carece de memoria inmunológica, se compone de barreras físicas, como la piel y mucosas, tanto del sistema respiratorio, gastrointestinal y genitourinario; así como barreras químicas como sustancias antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales [46,12].

Entre las células de la epidermis que participan se encuentran los queratinocitos, melanocitos, macrófagos tisulares, monocitos, granulocitos, mastocitos y células NK; también existen sistemas de reconocimiento para los microorganismos, que pueden producirse y activar varios agentes antiinfecciosos, como los factores de complemento de las vías clásica y alterna, péptidos antimicrobianos (defensinas, catelicidinas e histatinas), citocinas, quimiocinas y especies reactivas del oxígeno

y óxido nítrico (NO) [12,47]. El sistema inmune cutáneo (SIC), está constituido por células presentadoras de antígenos (Langerhans, dendríticas tisulares), linfocitos y en su etapa humoral lo integran inmunoglobulinas secretadas y citocinas tales como IL-1, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , TGF- β , etc. [48]. La inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa se realiza por las células dendríticas (Langerhans) ubicadas en la epidermis y encargadas de la captación, procesamiento y la presentación de los antígenos a los linfocitos en los ganglios linfáticos locales. Como resultado de este proceso, se sensibilizan los linfocitos T, los cuales expresan la molécula antígeno de linfocito cutáneo (CLA), que les permite unirse a la selectina E de los endotelios, penetrar hasta la epidermis y residir como linfocito T de memoria para desencadenar respuestas inflamatorias, una vez que son activados por las células presentadoras de antígeno [12].

3.4.2 Los queratinocitos humanos: células participantes de la respuesta innata

Entre las células que conforman la piel se encuentran los queratinocitos, que ocupan el 95% de las células de la epidermis. Entre las funciones de estas células se encuentra la producción de queratina (función de barrera mecánica), protección contra el daño ambiental causado por patógenos, el calor, la radiación UV y la pérdida de agua, por ello tienen un papel importante en el mantenimiento de la estructura y función normal de la epidermis [48,12]. Por su localización, son las primeras células que entran en contacto con una gran cantidad de antígenos o agresiones procedentes del medio ambiente es decir además de mantener la estructura de la piel, son una barrera física contra muchos antígenos, por lo que cuentan con varias funciones que ayudan al sistema inmunológico [12]. Expresan moléculas de adhesión que regulan el movimiento de células a través de la piel, también expresan moléculas MHC I y MHC II así como moléculas de adhesión ICAM-1 que facilitan el reclutamiento y permanencia de células inmunitarias en piel inflamada.

Se ha descrito que los queratinocitos expresan de manera constitutiva o inducible receptores tipo Toll (TLRs), del TLR-1 al TLR-6, TLR-9 y TLR-10 [24]. También son una fuente importante de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y péptidos antimicrobianos, que son capaces de expresar antígenos de clase II, los queratinocitos pueden no sólo participar en la respuesta inmunitaria epidérmica, sino que tienen un papel importante en el inicio de la respuesta adaptativa [49]. La expresión de estos receptores permite la producción de mediadores proinflamatorios como citocinas (IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-12, GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos), TGF- β (factor de crecimiento transformante), M-CSF (factor estimulante de colonias de monocitos), PDGF (factor de crecimiento/diferenciación plaquetario), ETAF (factor activador de timocitos derivado de células epidérmicas), TNF- α y péptidos antimicrobianos. También pueden condicionar la respuesta inmune, mediante la secreción de quimiocinas (IL-8 y MCP-1) lo que recluta células polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y macrófagos [12],

Se ha reportado el papel del queratinocito como célula inmunocompetente en respuesta hacia hongos cuando en cultivos *in vitro* se pone en contacto con *Candida albicans* y se induce la secreción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 [14].

Este rápido reconocimiento de un amplio espectro de patógenos, se lleva a cabo mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) [50,51]. Los PRRs se localizan en las células efectoras del sistema inmunológico innato, como monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B, células NK, células epiteliales, así como en los queratinocitos, que tienen la capacidad de expresar una gran variedad de patrones de reconocimiento, como son los receptores tipo Toll y Receptores a Manosa [52].

3.5 Receptores tipo toll (TLR)

Los receptores tipo Toll (TLRs) son proteínas transmembrana tipo 1; son receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR); participan en la respuesta inmune innata contra una gran variedad de microorganismos, así como

en enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Los TLRs responden a señales endógenas y exógenas al reconocer patrones moleculares [53].

Presentan homología con la proteína Toll de *Drosophila melanogaster* y el receptor de la IL-1 (IL-1r) [54]. Esta similitud se da en el dominio intracelular de la proteína Toll, la cual muestra una notable similitud con los dominios intracelulares del receptor de la interleucina-1 (IL-1) de los mamíferos [55]. Presentan un amplio rango de ligandos que incluyen motivos estructurales presentes en bacterias, hongos, parásitos (Tabla 1) y en la actualidad se conocen 11 TLR en humanos (TLR1-TLR11) [56].

Los TLR se encuentran en la superficie celular y en las membranas intracelulares, y por ello, son capaces de reconocer microorganismos en diferentes localizaciones. Los TLR 1, 2, 4, 5 y 6 se expresan en la membrana plasmática donde reconocen varios PAMPs en el ambiente extracelular; por el contrario, los TLR 3, 7, 8 y 9 se expresan, sobre todo, dentro de las células en el retículo endoplásmico y las membranas endosómicas, donde detectan varios ligandos de ácidos nucleicos [56,57].

3.5.1 Estructura y activación de TLRs por PAMPs

Todos los TLRs comparten la misma estructura: un gran dominio extracelular N-terminal (20-30 aminoácidos) que consiste en aproximadamente 16-28 repeticiones ricas en leucina (LRRs). Un dominio intracelular C-terminal similar al receptor de IL-1 llamado TIR (como Toll/IL-1R-) [58]. El dominio extracelular tiene la capacidad de unión al ligando mediante los LRRs (segmentos repetitivos ricos en Leucina), siendo las responsables del reconocimiento de los diferentes PAMPs, y el dominio TIR media la señal intracelular (Figura 8) [59].

Los PAMPs fúngicos son reconocidos por TLRs, esto se ha demostrado en estudios realizados en ratones que carecen de MyD88 (molécula adaptadora), en el cual presentan mayor susceptibilidad a las infecciones por hongos tales como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans*.

Un análisis más detallado reveló que varios componentes fúngicos son reconocidos por TLRs; por ejemplo, mananos de fosfolípidos y β -glucanos son reconocidos por TLR-2 y glucuronoxilomananos son reconocidos por CD14 y TLR-4. Sin embargo, varios estudios han sugerido que los receptores de Lectina de tipo C, como los receptores a manosa, dectin-1, dectin-2 y DC-SIGN desempeñan un papel fundamental en la inmunoprotección [58].

Los receptores tipo toll que reconocen ligandos de la pared celular de los hongos son:

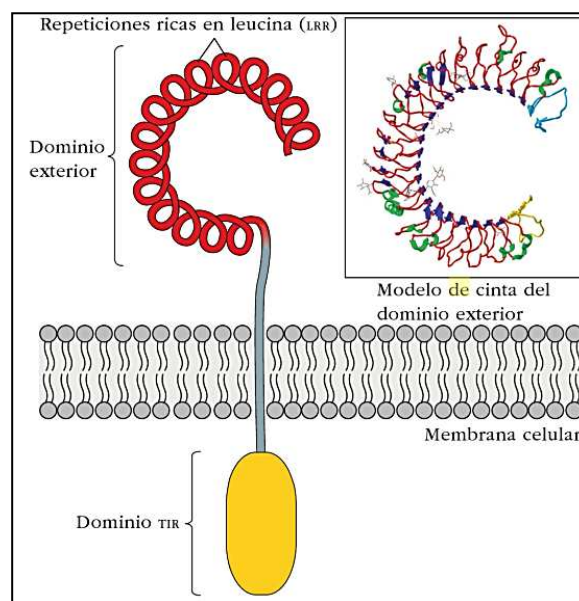


Figura 8. Estructura del receptor tipo Toll (TLR) y unión de ligandos de PAMP. (LRR, segmentos repetitivos ricas en Leucina, que contienen la secuencia LXXLXLXX, donde L es Leucina y X cualquier aminoácido) [58].

El TLR-2, posee un mecanismo único de reconocimiento en donde coopera con otros TLR miembros de la familia, especialmente TLR1 y TLR6, e inicia la activación de genes característicos de una respuesta de tipo Th2.

Este receptor reconoce diferentes productos bacterianos como lipoproteínas de bacterias gram negativas, peptidoglicano de bacterias gram positivas, ácido lipoteicoico, LPS y en hongos reconoce moléculas de zimosan y β -glucanos (Tabla 1) [56].

Tabla 1. Reconocimiento de PAMPs por TLRs y otros PRRs [57].

ESPECIES	PAMPs	TLR	PRRs
Bacteria, Micobacteria	LPS	TLR4	NOD1,NOD2,NALP3,NALP1
	lipoproteinas, LTA, PGN, lipoarabinomana	TLR2/TLR1,TLR2/TLR6	
	flagelina	TLR5	
	DNA	TLR9	AIM2
	RNA	TLR7	NALP3
Virus	DNA	TLR9	AIM2, DAI, IFI16
	RNA	TLR3,TLR7,TLR8	RIG-I, MDA5,NALP
	Proteína estructural	TLR2,TLR4	
Hongos	zymosan, β -glucano	TLR2,TLR6	Dectin-1, NALP3
	Manano	TLR2,TLR4	
	DNA	TLR9	
	RNA	TLR7	
Parásitos	tGPI-mutin (<i>Trypanosoma</i>)	TLR2	NALP3
	Glicoinositol Fosfolípidos (<i>Trypanosoma</i>)	TLR4	
	DNA	TLR9	
	hemozoin (<i>Plasmodium</i>)	TLR9	
	Molécula similar a profilina	TLR11	

El TLR-4 interviene en la señalización en respuesta a un amplio espectro de estímulos, el LPS (reconocimiento en el que interviene esencialmente), la proteína F del virus respiratorio sincitial (VRS) y proteínas bacterianas de choque térmico (HSP60 y HSP70), entre otros [35]. Actúa como un homodímero, a diferencia de TLR-2 que actúa de forma dimérica, también reconoce moléculas de manano, presentes en hongos [56].

El TLR-6 actúa de manera sinérgica con TLR-2 como un homodímero para el reconocimiento de moléculas de zimosan y β -glucanos en hongos, así como peptidoglicanos, que son componentes de bacterias gram positivas, lipoproteínas bacterianas diacetiladas como las producidas por micoplasmas, que son potentes activadores de macrófagos [56].

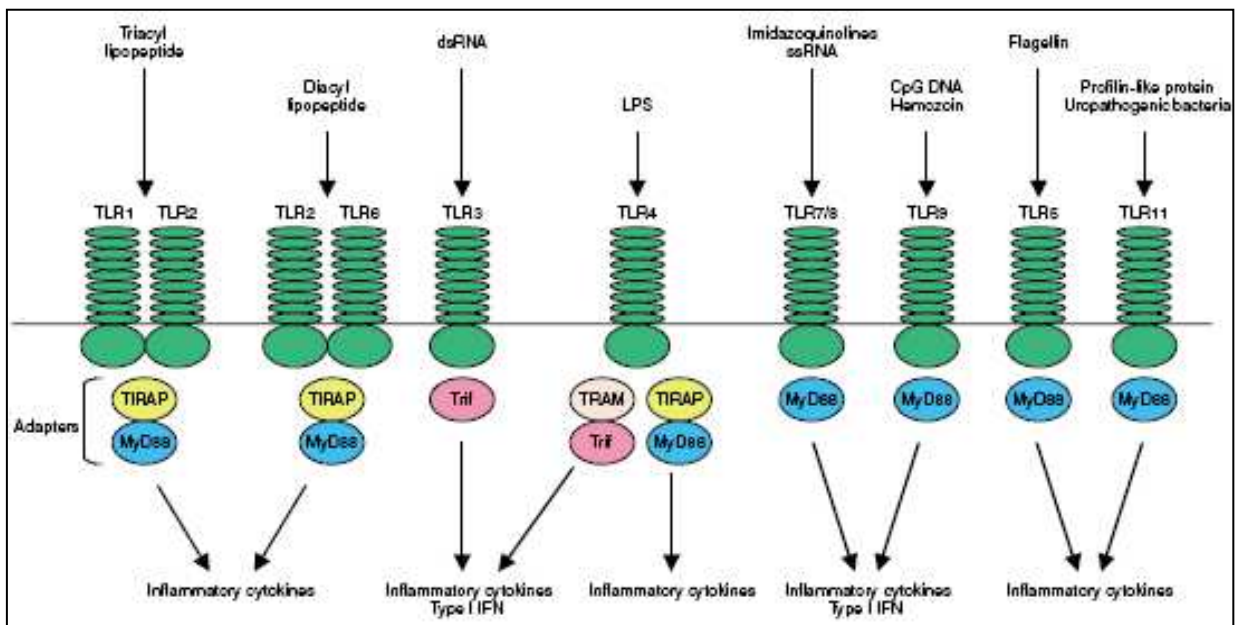


Figura 9. Activación de receptores tipo Toll y la activación de citocinas proinflamatorias [60].

3.5.2 Cascada de Señalización

Después de la interacción con su ligando respectivo, los TLR dimerizan y sufren un cambio conformacional requerido para el reclutamiento de moléculas de señalización [54]. La activación de la cascada de señalización de los TLRs se origina en el dominio TIR, el cual posee cuatro moléculas adaptadoras, (MyD88, TIRAP/MAL, TRIF y TRAM) (Figura 8). Estos adaptadores están asociados con las interacciones del dominio TIR, siendo diferentes los adaptadores que se activan según el tipo de TLR, existiendo diferentes combinaciones de estos adaptadores [52]. El funcionamiento de estas rutas puede ser dependiente o independiente de la proteína adaptadora MyD88 (factor de diferenciación mieloide 88) [56].

Los principales factores de transcripción activados por las vías de transmisión de señales de los TLR son el factor nuclear κ B (NF- κ B), la proteína de activación 1 (AP-1), el factor de respuesta al interferón 3 (IRF3) e IRF7. Posteriormente NF- κ B y AP-1 estimulan la expresión de genes que codifican muchas de las moléculas requeridas para las respuestas inflamatorias, como las citocinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-1- β), y las quimiocinas (MCP-1 e IL-8) (Figura 9) [56].

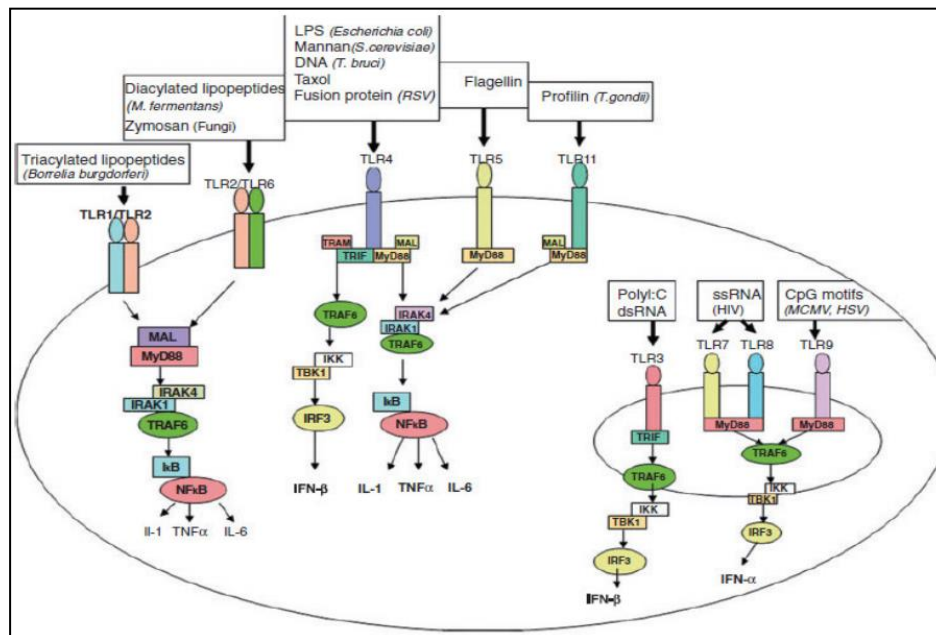


Figura 10. Vías de señalización y activación de los TLRs. En la figura se indican las dos rutas de activación dependiente e independiente de MyD88 [58].

3.6 Receptores para endocitosis y fagocitosis

Son receptores expresados en la superficie celular que, una vez que reconocen y se unen a sus ligando, median directamente la internalización de los microorganismos, para llevarlos a los lisosomas, donde son atacados por las moléculas intracelulares almacenadas en los gránulos de estas células [60].

3.6.1 Receptores a Manosa (MR)

El receptor a manosa es una proteína transmembrana de 175 kDa que primeramente fue descubierta en humanos, específicamente en macrófagos para luego ser encontrado en células dendríticas y una gran variedad de células endoteliales y epiteliales [61]. La familia de receptores a manosa es un subgrupo de la superfamilia de las lectinas de tipo C, que a su vez, forman parte de los PRRs. Los receptores a manosa son proteínas transmembrana tipo I constituidas por cuatro integrantes: el receptor de manosa, el receptor de fosfolipasa A2 del tipo M (PLA2R), DEC-205 y Endo180. Los cuatro miembros de esta familia poseen dominios estructurales característicos tanto en su porción extracelular como en su fracción intracelular. Algunos de los componentes extracelulares son: ocho dominios de lectina de tipo C (CTDLs, encargado del reconocimiento de carbohidratos), donde CTLD-4 al -8 son funcionales, un motivo amino terminal rico en cisteínas (CRD, que participa en el reconocimiento de azúcares sulfatados), un dominio único de fibronectina del tipo II (FNII, que participa en la unión a colágeno). El resto de la proteína está constituida por: un dominio transmembrana y una porción intracelular de 45 aminoácidos que, a su vez, posee la capacidad de endocitar elementos desde la membrana plasmática vía vesículas recubiertas de clatrina hasta el sistema endosomal (Figura 11). Este mecanismo se realiza gracias a la existencia de dos motivos, en la porción citoplasmática del receptor, que le permiten unir complejos adaptadores que desencadenan distintas vías de transducción de señales. La función de este receptor es unir e internalizar una gran variedad de glicoproteínas, que poseen residuos terminales de manosa,

fucosa y GlcNAc, [62,63]. Como parte del sistema inmune innato, MR ha sido involucrado en el reconocimiento y fagocitosis de una gran variedad de microorganismos patógenos que incluyen hongos, bacterias, virus y protozoos. Esto se debe a que la mayoría de las glicoproteínas de mamíferos no poseen residuos terminales de manosa o GlcNAc, a diferencia de los que sucede en la superficie de microorganismos patógenos en donde estos residuos abundan [64].

El receptor a manosa se encuentra altamente expresado en APCs profesionales jugando un papel fundamental en el funcionamiento del sistema inmune innato y adaptativo [62].

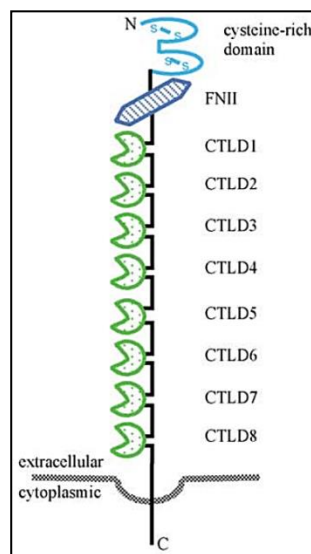


Figura 11. Esquema de los dominios del Receptor a Manosa. (CTDLs, dominios de lectina tipo C (reconocen monosacáridos, manosa principalmente); CRD, dominio rico en cisteínas (une azúcares sulfatados); FNII, dominio de fibronectina del tipo II (reconoce colágeno) [62].

3.6.2 Receptor de complemento 3 (CR3)

El sistema del complemento se refiere a un grupo de proteínas séricas que cooperan con los sistemas inmunitarios tanto innato como adaptativo para eliminar agentes patógenos de la sangre y los tejidos. Diversos componentes del complemento se unen a microorganismos y las opsonizan, lo que las hace susceptibles a fagocitosis o endocitosis mediada por receptor. Las fracciones del

complemento o sus productos se unen específicamente a receptores de varios tipos de células que intervienen en actividades inflamatorias y de opsonización. Los receptores de complemento tipo 3 (CR3/MAC-1/CD11b/CD18) son glicoproteínas heterodiméricas que comparten la cadena β o CD18; tienen especificidad por C3b y varios de sus productos de desintegración, incluso iC3b, C3c y C3dg, así mismo son miembros de la superfamilia de integrinas y son proteínas de adhesión; se les llama integrinas $\beta 2$ porque contienen la misma subunidad β . La subunidad α de CR3 es una glicoproteína de 155 kDa con 1 092 aminoácidos en el dominio extracelular, 26 en el segmento transmembrana y 19 en la cola citoplasmática. Las dos subunidades se unen iC3b en una interacción dependiente de magnesio. Su unión a CR3 activa señales de transducción para el rearrreglo del citoesqueleto [65]. Es una de las integrinas crítica para la adhesión y migración de los neutrófilos durante una respuesta inflamatoria; también es importante para la adhesión de las células a la matriz extracelular durante la quimiotaxis. Cuando el CR3 es activado en la superficie de una célula fagocítica, también promueve la fagocitosis de aquellos microorganismos que fueron opsonizados por el complemento, además, el CR3 también se puede unir a diferentes moléculas encontradas en la superficie de los patógenos como el LPS, polisacárido del *Mycobacterium tuberculosis* y el Zimosan de las levaduras, permitiendo la fagocitosis directa de ellos [60].

3.7 Respuesta inmunológica contra *Sporothrix schenckii*

Como se ha descrito, la principal vía de entrada de *S. schenckii* es la cutánea, por inoculación traumática de conidios (fase infectante), una vez en el tejido, los conidios se transforman en blastoconidios o levaduras (fase parasitaria), desencadenando una respuesta inmunológica en el huésped.

3.7.1 Respuesta Inmunitaria Innata

En ella se produce la activación del sistema de complemento, especialmente la vía alternativa. La activación del complemento permitiría la fagocitosis del hongo mediante el depósito de la fracción C3b sobre la pared celular, si bien el complejo

de ataque de membrana también contribuiría a la lisis del hongo. Por otra parte, estudios recientes han resaltado la importancia de los receptores Tipo Toll 4, que al reconocer la célula fúngica, conducen a un estallido oxidativo [66,67].

3.7.2 Respuesta Celular

Se basa en la activación de los macrófagos por los linfocitos T CD4⁺, los cuales liberan INF- γ . Se cree que la respuesta Th1 sería el factor clave en el control de la infección fúngica y de su actividad dependerían las diferentes variantes clínicas de la enfermedad [68].

La citocina TNF- α induce al macrófago para la producción de Óxido Nítrico, un producto con una elevada actividad citotóxica frente al *S. schenckii* [69]. Esto resultaría favorable, en términos de la eliminación del hongo aproximadamente dos meses de producida la infección. No obstante en etapas tempranas los niveles elevados de TNF- α y óxido nítrico se vincularan con depresión de la actividad de las células T, mediante la IL 10, favoreciendo la reproducción del hongo y la infección del huésped [70].

3.7.3 Respuesta Humoral

En la esporotricosis experimental, la liberación de IL-4 se produce seis semanas después de la infección [71], lo que sugiere la participación de la respuesta inmune humoral sólo en las etapas avanzadas de la infección [72].

La respuesta humoral está presente en los pacientes con esporotricosis. Se ha podido demostrar la producción de IgG, IgM e IgA frente a distintos antígenos de la fase micelial del *S. schenckii*. Sin embargo debido a que las diferentes formas clínicas de la esporotricosis producen similar cantidad de éstos anticuerpos, se cree que la respuesta inmune humoral no jugaría un rol clave en la patogénesis de la esporotricosis [73].

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La esporotricosis es una infección de la piel causada por *S. schenckii*, esta infección genera en los pacientes un cuadro agudo de inflamación, caracterizado por aumento de volumen en el sitio de la lesión, enrojecimiento, ulceración, costras, bordes levantados y el color rosado a violeta, es el llamado granuloma esporótrico. México ocupa el segundo lugar entre las micosis subcutáneas, después del micetoma.

Para comprender los mecanismos que participan en el establecimiento de esta patología es importante conocer que la piel representa la primera línea de defensa contra la infección de una gran variedad de microorganismos y entre las células que participan en la resistencia inmunológica se encuentran los queratinocitos que son las células más abundantes en este tejido y al ser células inmunocompetentes y dependiendo del patógeno presente, pueden producir efectores de la respuesta innata que contribuyen al control y/o eliminación de los microorganismos que infectan la piel. Con respecto a la esporotricosis se conoce poco el papel que juegan estas células en el control de la infección, por lo cual es sumamente interesante evaluar cuáles son los efectores de la respuesta inmune que los queratinocitos humanos producen cuando se encuentran infectados con este hongo y así entender cómo contribuyen en el proceso inflamatorio y por ende en el control del microorganismo.

5. HIPÓTESIS

Sporothrix schenckii inducirá en queratinocitos humanos la sobreexpresión de diferentes receptores de la respuesta innata, así como la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas como resultado de la interacción hospedero/patógeno.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de citocinas proinflamatorias, receptores y cambios de citoesqueleto en una línea celular de queratinocitos humanos HaCaT infectados con *Sporothrix schenckii*.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Establecer un modelo de infección celular realizando cinéticas de infección de queratinocitos humanos con *Sporothrix schenckii* en diferentes tiempos, con la forma de conidios y blastoconidios del hongo.
- b) Realizar una cinética de internalización de 12 h post-infección, con conidios y blastoconidios de *S. schenckii* en queratinocitos.
- c) Evaluar la expresión de los genes para las citocinas pro-inflamatorias/quimiocinas (MCP1, TNF- α , IL-8, IL-1 β) y receptores Tipo Toll (TLR-2, TLR-4, TLR-6) por medio de la técnica RT-qPCR, en cinéticas post-infección a 12h en queratinocitos infectados con conidios y blastoconidios de *S. schenckii*.
- d) Evaluar la expresión de los receptores TLR-2, TLR-4, TLR-6, Receptor a Manosa y el Receptor de Complemento 3 (CR3), en una línea celular HaCaT de queratinocitos, infectados con conidios y blastoconidios de

- S. schenckii*, utilizando microscopía confocal, en cinéticas post-infección de 12 h.
- e) Cuantificar la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1) en los sobrenadantes de cultivo de queratinocitos infectados con conidios y blastoconidios de *S. schenckii*, en cinéticas de 12 h post-infección.
- f) Determinar los cambios estructurales en el citoesqueleto (filamentos de actina) de los queratinocitos durante la infección con conidios y blastoconidios de *S. schenckii*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Esquema General de trabajo

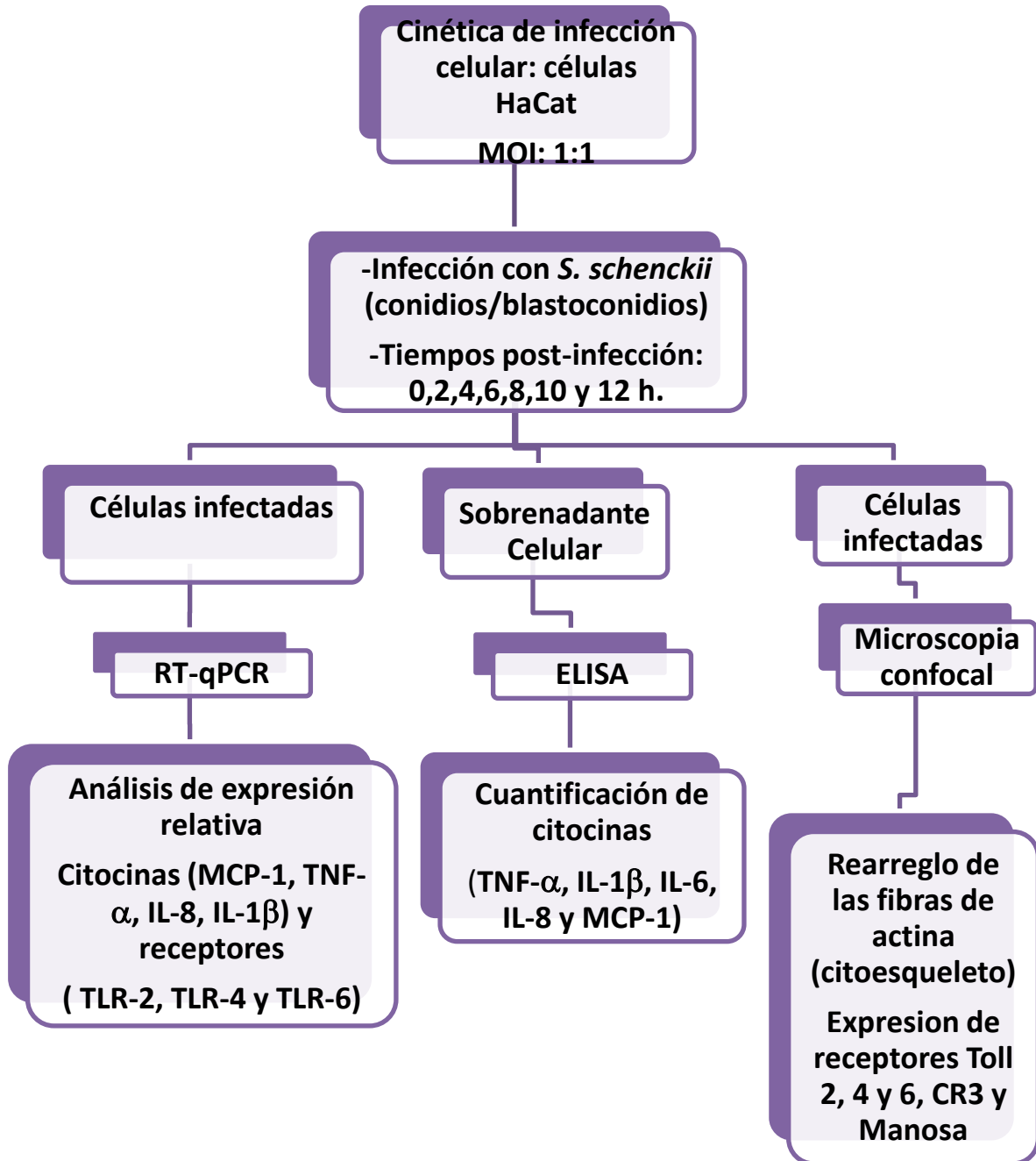


Figura 12. Esquema general de trabajo I. Expresión de receptores y citocinas, Cuantificación de citocinas y rearreglo de fibras de actina.

7.2 Cultivo celular de queratinocitos humanos, línea HaCaT.

La línea celular de queratinocitos HaCaT proviene de la colección ATCC. Los queratinocitos se cultivaron en botellas de 25 cm² con medio D-MEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (Ham) (Gibco by Life technologies, D-MEM/F12 (1:1) (1X)), [+ L-Glutamina, [+ 2.4 g/L Bicarbonato de Sodio, 55 mg/L Piruvato de Sodio, suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) más penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml), a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Se realizó el recambio de medio cada tercer día, hasta obtener un número suficiente de células para cada experimento. Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 70% aproximadamente, se procedió a disgregarlas con tripsina (Sigma-Aldrich al 0.025%) durante 5 min., se llevó a v/v con medio suplementado y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min., se decantó y el botón se resuspendió en medio, posteriormente se realizó el conteo para realizar las monocapas para los ensayos de infección celular.

7.3 Cultivo del microorganismo y suspensión

Se utilizó un aislado clínico de *S. schenckii*, proporcionada por el Hospital General "Dr. Manuel Gea González", de un paciente que presentó un cuadro clínico de esporotricosis sistémica, con dos meses de evolución. Los blastoconidios se obtuvieron en medio BHI durante 4 días a 37 °C, se centrifugaron y la biomasa se resuspendió en solución salina al 0.9 %, ajustando a una concentración de 300 x 10⁶ UFC/mL (tubo 1 de Mc Farland). Los conidios se obtuvieron a 25 °C en un medio de Sabouraud, durante 2 meses, con colonias pigmentadas de color negro. Se removieron los conidios con un asa bacteriológica y se resuspendieron en solución salina al 0.9 %, se realizó el conteo por cámara de Neubauer.

7.4 Opsonización de conidios y blastoconidios de *S. schenckii*

De la suspensión de conidios y blastoconidios se tomó una alícuota de 2 mL y se centrifugó para obtener la biomasa, posteriormente se resuspendió en 2 mL de suero humano; se dejó incubar durante una hora a 37 °C. Pasado el tiempo se

retiró el suero y se resuspendió en solución salina. Los conidios y blastoconidios opsonizados fueron utilizados en la cinética de infección para la activación del receptor de complemento CR3.

7.5 Ensayo de infección celular

Se obtuvieron monocapas de células HaCaT, en placas de seis pozos con 400×10^3 células/pozo, para cada tiempo de infección correspondiente a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h y el control negativo (células sin infectar). Se lavaron dos veces con PBS 1X para eliminar el suero del medio de cultivo y los queratinocitos se infectaron con la suspensión de conidios y blastoconidios, a una MOI 1:1 (multiplicidad de la infección, 1 conidios y blastoconidios por célula) durante 2 h y se tomaron las muestras en los tiempos post-infección.

Para prevenir el crecimiento extracelular de *Sporothrix*, las monocapas infectadas se trataron con 2 µg/mL de anfotericina B durante 2 h, transcurrido ese tiempo, el medio se reemplazó por el medio de cultivo D-MEM/F12 adicionado con 1 µg/mL de anfotericina B el cual se dejó durante el término de la cinética. Se recuperó el sobrenadante en cada tiempo de infección y se congeló a -70°C hasta su posterior utilización en la cuantificación de citocinas, mientras que a la monocapas infectadas se les adiciono 500 µL de TRizol (Invitrogen) directamente a cada pozo y se llevó a congelación para la extracción de RNA total y la amplificación de los genes de interés: citocinas y receptores.

7.6 Cinética de internalización de levaduras de *S. schenckii*

Se realizó un ensayo de infección celular sólo con blastoconidios de *S. schenckii*, con una MOI 1:1, en monocapas de células HaCaT con 40×10^3 células para cada tiempo de infección, en placas de 24 pozos con cubreobjetos estériles a una confluencia del 70 %, siguiendo las condiciones descritas anteriormente.

Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 minutos, se realizó la tinción Hematoxilina-Eosina modificada, de la siguiente manera: teñir con hematoxilina durante 4 min, lavar con agua corriente, virar con una solución de

Hidróxido de Amonio (20 gotas/100 mL H₂O), lavar con agua corriente, teñir con Eosina 1 min, lavar rápidamente, teñir con Fucsina 1 min, lavar con alcohol absoluto-Xilol (1:1), sumergir en Xilol 1 min y montar sin dejar secar en resina. Las muestras se observaron en un microscopio óptico (Carl Zeiss) a 100X.

Con el fin de corroborar la internalización se realizó otra cinética de infección, tiñendo con 100 µL de una solución de Uvitex 2B (Polysciences, Inc., US, al 0.75% en PBS) los conidios y blastoconidios previamente contados. Se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo se realizaron tres lavados con PBS para retirar el exceso y por último se realizó la infección con éstos conidios y blastoconidios teñidos. Las células infectadas se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min., se lavaron tres veces y los filamentos de actina se tiñeron con faloidina (Sigma-Aldrich) durante 30 min. Las células teñidas se lavaron y se montaron en portaobjetos utilizando como medio de montaje Vectashield-DAPI (Vector Laboratories, Inc.) y se observaron las señales de fluorescencia en un sistema de escaneo confocal (LSM5 Pascal, Zeiss).

7.7 Extracción de ARN total

A las muestras (células HaCaT) obtenidas en cada tiempo de infección, se les adicionó directamente a cada pozo 500 µL de TRIzol (Invitrogen) y se colectó en tubos eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente a todas las muestras se les agregaron 200 µL de cloroformo, se mezclaron por inversión y se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugaron a 11,000 revoluciones por minuto (rpm) a 4°C durante 15 minutos. De cada muestra se colectó la fase superior (acuosa) y se le adicionó isopropanol en relación 1 a 1, mezclándose por inversión e incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al término de la incubación las muestras se centrifugaron a 11,000 rpm durante 10 minutos, decantándose el sobrenadante sin perder el botón que contiene el ARN total. El botón se lavó dos veces con 500 µL de etanol al 75% en agua DEPC (agua con dietilpirocarbonato al 0.1%). Después del segundo lavado se centrifugó a 11,000

rpm a 4°C durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante nuevamente y se secó el botón para después disolverlo en 15 µL de agua DEPC.

7.8 Transcripción reversa (RT)

A 11 µL del ARN total obtenido de cada muestra (entre 1 y 3 µg de RNA total), se le adicionó 5 µL del Buffer para la transcriptasa reversa (RT), 1 µL dNTPs 10 µM (Invitrogen), 1 µL de ditioneitol 0.5 mM (DTT), 1 µL de MgSO₄ y por último se agregó 1 µL de la RT MMLV (200 U, transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney (Invitrogen).

Se precalentó el ARN incubándolo a 75 °C por 10 minutos, posteriormente 2 minutos a temperatura ambiente y por último durante una hora a 42 °C para obtener el cDNA. Se cuantificó la cantidad de cDNA en el quipo Nanodrop (ThermoScientific) ajustando la concentración a 100 ng/µL para posteriormente realizar PCRs cuantitativas

7.9 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Para amplificar los genes de interés se realizó la técnica de qPCR, usando una mezcla de reacción que contenía: 2.5 µL del regulador 10X (KCl 50 mM y Tris-HCl 10 mM a pH 9.3); 0.5 µL de MgCl₂ 50 mM; 0.5 µL de dNTP 10 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP mezcla) (Ampliqon III); 0.5 µL de los oligonucleótidos: forward (sentido) y reverse (antisentido), 1 µL del cDNA obtenido del procedimiento de RT; se usó Eva Green (Biotium) como fluorocromo y ROX (Invitrogen) como colorante de referencia pasiva. Los genes para todas las citocinas y los TLRs fueron amplificados en un termociclador (Applied Biosystems StepOnePlus™, Real-Time PCR System, Thermal Cycling Block), bajo las siguientes condiciones: 35 ciclos a las temperaturas de 95 °C durante 15 seg (temperatura de desnaturalización), 58°C durante 15 seg (temperatura de alineación) y 72 °C durante 15 seg (temperatura de extensión). Para todos los casos se utilizó el gen endógeno β-actina y como calibrador del experimento las células sin infectar. Los iniciadores específicos usados en este experimento se muestran en la tabla 2.

7.9.1 Análisis cuantitativo de la expresión de los genes

Todos los valores numéricos de cada gen fueron normalizados con su respectivo valor de gen endógeno β -actina y los experimentos fueron calibrados utilizando el nivel basal de la expresión de cada gen como valor inicial (células sin infectar). Todos los valores fueron sometidos al análisis de expresión relativa de $\Delta\Delta Ct$ usando el software Step One V.2.3.1 de Life Technologies USA.

Tabla 2. Iniciadores usados para la detección de cada uno de los genes de las citocinas y receptores.

GEN	INICIADORES		TIPO
	(5'	3')	
β -ACTINA	ATTGGCAATGAGCGGTTC		Forward
		GGATGCCACAGGACTCCAT	Reverse
MCP-1	CTCGCTCAGCCAGATGCAAT		Forward
		TGCTTGTCCAGGTGGTCCAT	Reverse
IL-8	GCCAAGAGAATATCCGAACT		Forward
		TCAACACAGCACTACCAACA	Reverse
TNF- α	GACTTCCTTGAGACACGG		Forward
		AGGGCGATTACAGACACA	Reverse
IL-1 β	GCCCTGTGCCTTAGTAGTAT		Forward
		TGCATCAGCTCATCAATAAC	Reverse
TLR-2	GGCCAGCAAATTACCTGTGTG		Forward
		AGGCGGACATCCTGAACCT	Reverse
TLR-4	CAGAGTTTCCTGCAATGGATCA		Forward
		GCTTATCTGAAGGTGTTGCACAT	Reverse
TLR-6	GAAGAAGAACAACCTTTAGGATAGC		Forward
		AGGCAAACAAAATGGAAGCTT	Reverse

7.10 Inmunofluorescencia para la detección de los receptores Tipo Toll, manosa y CR3 en células HaCaT

Para observar la activación de los TLR's (TLR-2, TLR-4 y TLR-6), Receptor a Manosa (RM) y Receptor de complemento (CR3), se realizaron monocapas de células HaCaT con 40×10^3 células/mL para cada tiempo de infección, en placas de 24 pozos con cubreobjetos estériles, se infectaron con la suspensión de conidios y blastoconidios a una MOI: 1:1, siguiendo una cinética de 0, 2, 4, 6, 8 y 12 h post-infección como se describió anteriormente. Paralelamente y para tener un control positivo de la expresión, se estimularon monocapas de células HaCaT con 0.2 µg de PMA (Forbol-Miristato-Acetato) durante 24 h y un control negativo, células sin infectar.

Los controles y las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% por 15 min. a temperatura ambiente. Para la detección de los receptores, las preparaciones se incubaron durante 2 horas a 37°C, con anticuerpos monoclonales específicos IgG anti-TLR-2 humano hecho en ratón (Santa Cruz), IgG anti-TLR-4 humano hecho en ratón (eBioscience) e IgG anti-TLR-6 humano hecho en cabra (Santa Cruz), IgG-anti CR3 (eBioscience) hecho en ratón, posteriormente se lavaron 5 veces con PBS y se incubaron por 90 minutos a 37°C con el anticuerpo secundario anti-IgG-Rho (Chemicon international), y anti-IgG-FITC (Santa Cruz) respectivamente. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó lavando las monocapas 5 veces con PBS, en el caso de determinación del receptor de manosa se utilizó el anticuerpo IgG-anti-manosa-FITC (Santa Cruz), las preparaciones teñidas se montaron en portaobjetos usando Vectashield-DAPI como medio de montaje y se observaron las señales de fluorescencia en un sistema de escaneo confocal (LSM5 Pascal, Zeiss).

En todos los experimentos se utilizó como control positivo de la activación de los queratinocitos PMA (Forbol-Miristato-Acetato) a una concentración de $1\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células.

7.10.1 Análisis de la intensidad media de fluorescencia

El análisis numérico de la intensidad media de fluorescencia se midió contando 50 células por campo observado, mediante microscopía confocal con el programa LSM Image Examiner Pascal (Confocal Zeiss).

7.11 Cuantificación de citocinas

Se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos de queratinocitos, infectados con *Sporothrix schenckii* de las cinéticas descritas anteriormente.

Se centrifugaron los cultivos para eliminar el hongo y los sobrenadantes obtenidos, se congelaron a -70°C para su posterior utilización.

Para la cuantificación de citocinas en los sobrenadantes se empleó la técnica de ELISA, utilizando los Kits comerciales:

Human TNF- α , eBioscience® Immunoassay Ref. No. 88-7346-22 (San Diego CA);

Human IL-1 β , eBioscience® Immunoassay Ref. No. 88-7261-22 (San Diego CA);

Human IL-6, eBioscience® Immunoassay Ref. No. 88-7066-22 (San Diego CA);

Human IL-8, eBioscience® Immunoassay Ref. No. 88-8086-22 (San Diego CA);

Human CCL2/MCP-1, eBioscience® Immunoassay Ref. No. 88-7399-22 (San Diego CA). Siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.

7.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico utilizado para la correlación de los datos se realizó mediante la prueba de ANOVA (Analysis Of Variance) de una vía para el tratamiento de datos no paramétricos, seguido por una prueba de Tukey para determinar si hay diferencia significativa entre los grupos, utilizando el programa estadístico GraphPad Prism V 5.1.

7.13 Determinación de los cambios estructurales en los filamentos de actina de los queratinocitos infectados con *S. schenckii*

Para observar los cambios estructurales en los filamentos de actina, se realizaron monocapas de células HaCaT con 40 mil células para cada tiempo de infección, en placas de 24 pozos con cubreobjetos estériles, se infectaron con la suspensión de conidios y blastoconidios a una MOI: 1:1, siguiendo una cinética de 2, 6 y 10h post-infección. Para tener un control negativo, se realizaron monocapas de células HaCaT sin infectar. El control y las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% por 15 min. a temperatura ambiente.

Posteriormente se marcaron las muestras con una dilución 1:500 de faloidina en PBS, de la solución anterior se agregaron 80 uL a cada pozo de la muestra y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, pasado el tiempo se realizaron seis lavados con PBS para quitar el exceso, finalmente las preparaciones teñidas se montaron en portaobjetos usando Vectashield-DAPI como medio de montaje y se observaron las señales de fluorescencia en un sistema de escaneo confocal (LSM5 Pascal, Zeiss).

8. RESULTADOS

8.1 Estandarización de la técnica para cultivos celulares

Se utilizó el medio DMEN/F12 (Life Technologies), suplementado con 10% de suero bovino fetal (GIBCO) más 100 μ L de antibiótico penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 μ g/ml), a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, esto se pudo confirmar al observar el crecimiento de las células mediante un microscopio invertido. Todas estas condiciones se mantuvieron aparte de realizar el recambio de medio cada tercer día hasta obtener un número suficiente de células para cada experimento, teniendo una confluencia celular mayor del 80% (Figura 13).

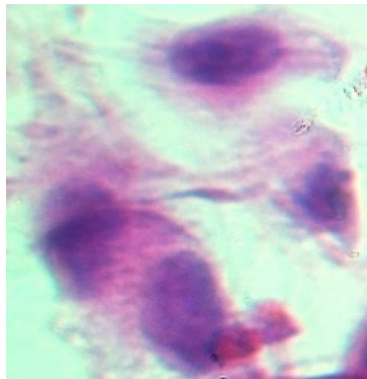


Figura 13. Queratinocitos humanos HaCaT. Tinción Hematoxilina-Eosina Modificada, 100x.

8.2 Cultivos de *Sporothrix schenckii*

Se utilizó cepa aislada clínicamente de *Sporothrix schenckii*, proporcionada por el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, los blastoconidios se obtuvieron a 37 °C en medio BHI durante 4 días; en el cual se observaron colonias cremosas, de color beige (Figura 14 A). Los conidios se obtuvieron en agar Sabourad, a partir de colonias filamentosas a una temperatura de 37°C, durante un tiempo de 2 meses; con la aparición de colonias de aspecto membranoso, inicialmente de color blanco o beige, que con el tiempo se pigmentaron (Figura 14 B).

La morfología microscópica muestra blastoconidios de formas variables; redondas u ovoides (Figura 15). Posteriormente los conidios y blastoconidios se

resuspendieron en solución salina al 0.9 %, para obtener una concentración de 300×10^6 UFC/mL. Para el marcaje del receptor CD11b se realizó la opsonización con suero sanguíneo humano siguiendo el método previamente descrito y finalizando con la realización de la cinética de infección celular.

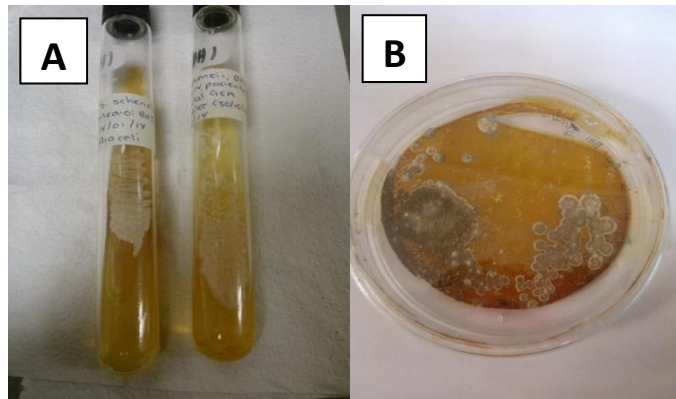


Figura 14. Cultivo de *S. schenckii*. A: Blastoconidios en agar *BHI*. B: Colonias con producción de conidios, agar Dextrosa-Sabouraud.

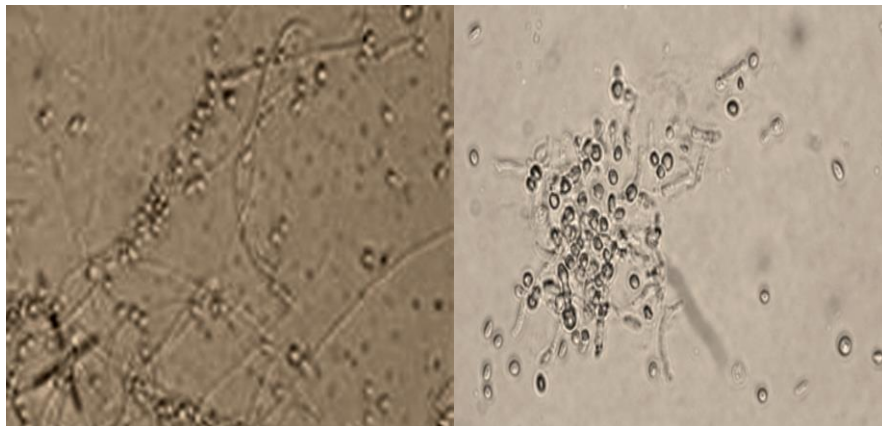


Figura 15. Morfología microscópica de *Sporothrix schenckii*. Se muestran blastoconidios de formas redondas y ovoides, 100x.

8.3 Cinética de internalización de levaduras de *S. schenckii*

Para estudiar las interacciones entre los blastoconidios de *S. schenckii* y los queratinocitos humanos, se realizó una cinética de infección para supervisar la adhesión e internalización de los blastoconidios.

Las muestras se fijaron con paraformaldehído y se les realizó la tinción Hematoxilina-Eosina modificada (Fucsina).

Como se muestra en la figura 16, la tinción empleada permite teñir los núcleos de las células en un color violeta, el citoplasma de rosa y las levaduras de azul. En el tiempo cero, es decir al comienzo de la infección se pueden apreciar escasos blastoconidios, mientras que a las 2 horas se observa una mayor cantidad de éstas, encontrándose en el citoplasma e incluso junto al núcleo de las células; a las 12 horas se puede notar un citoplasma irregular donde se expone únicamente el núcleo, al realizarse una comparación con el control negativo se aprecia que en este control las células HaCat están intactas y no hay presencia de estas estructuras.

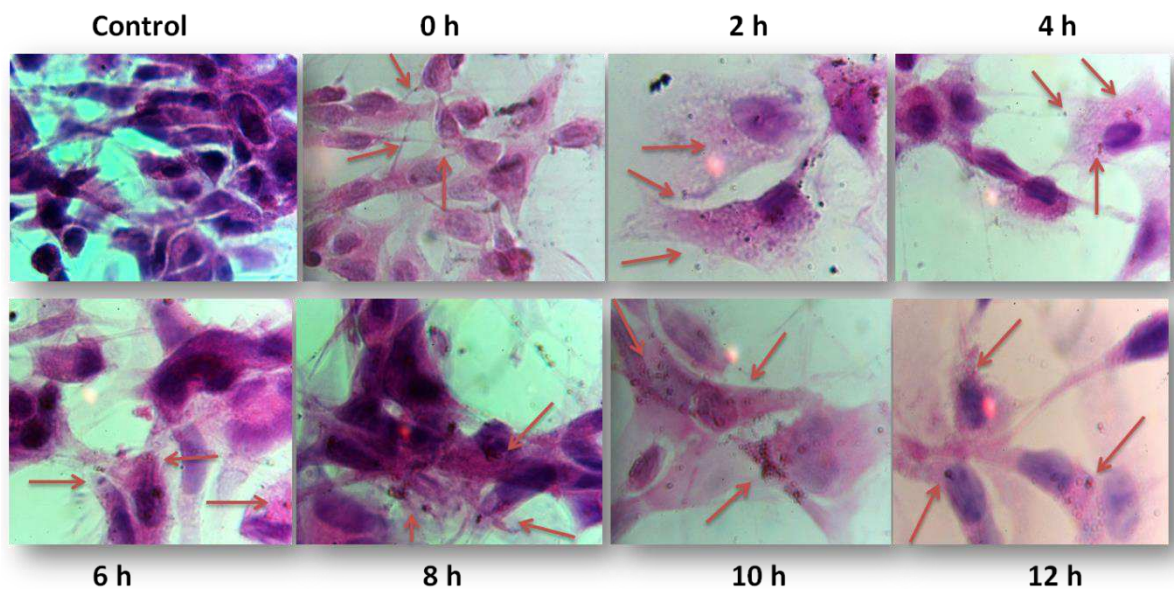


Figura 16. Internalización de blastoconidios de *S. schenckii* en queratinocitos humanos HaCaT. Tinción Hematoxilina-Eosina Modificada, 100 X.

Con el fin de corroborar la internalización de *S. schenckii* en las células HaCaT, se realizó una cinética de 10 h, marcando los conidios y blastoconidios con Uvitex (0.75% en PBS) y se efectuó el análisis por Microscopía Confocal. Como se muestra en la figura 17, a las 2 h post-infección se aprecian escasos conidios de morfología esférica teñidas en azul y las fibras de actina en rojo, estos conidios se encuentran adheridas a la membrana celular; a las 4 h post-infección se observa un mayor número de conidios interiorizados en el citoplasma de la célula huésped formando agrupaciones; a las 6 y 10 h se observan un mayor número interiorizados, sin embargo a las 10 h las células mueren a causa de la infección.

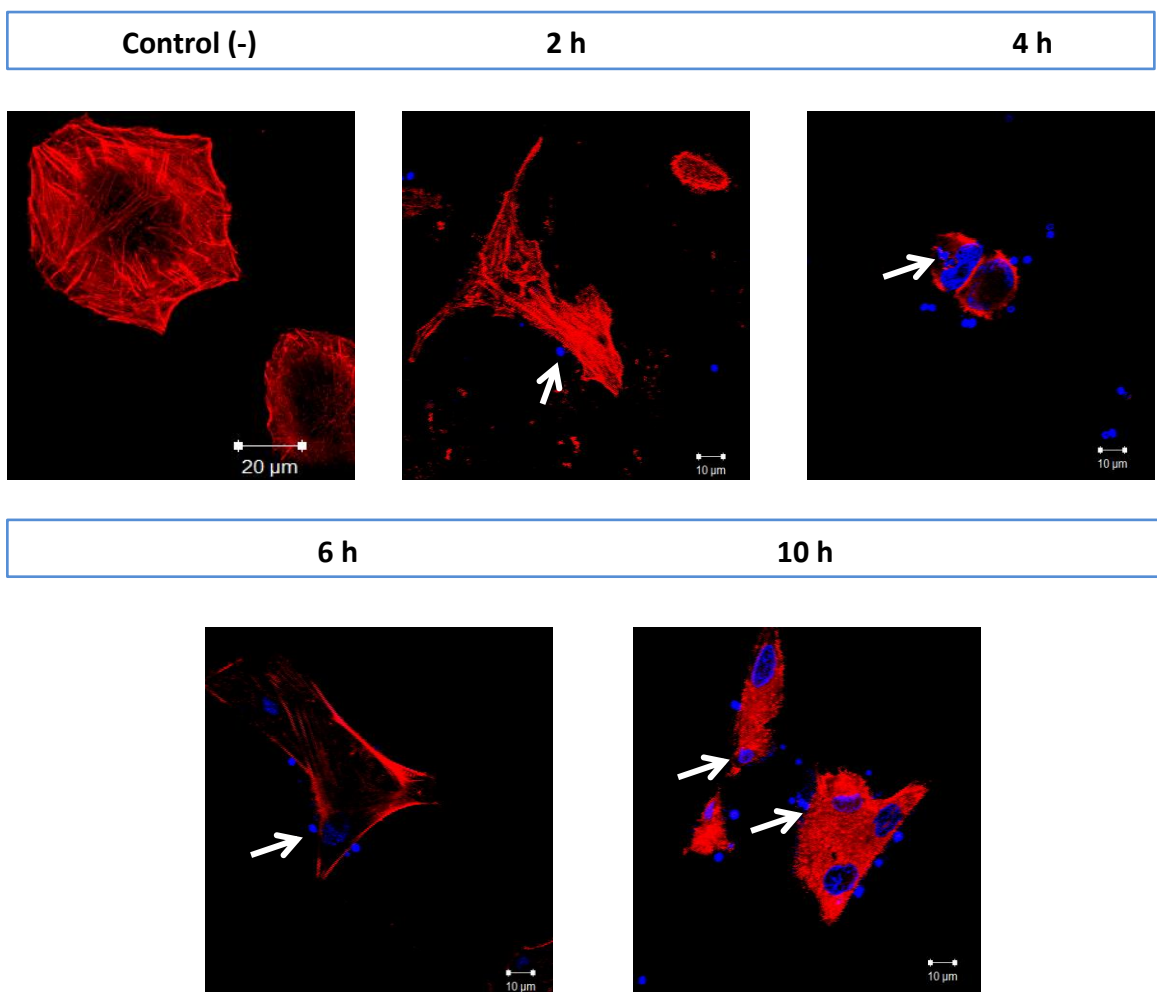


Figura 17. Internalización de conidios de *S. schenckii* en queratinocitos humanos HaCaT por Microscopía confocal. Se muestran conidios de morfología esférica, marcadas en azul.

En la infección con los blastoconidios (Figura 18) ocurre un fenómeno similar, a las 2h post- infección se visualizan estructuras de morfología ovoide típica de los blastoconidios de *S. schenckii*, interiorizadas en el citoplasma celular, mientras que a las 4 y 6 h el número aumenta en el interior de la célula y finalmente a las 10 h las células mueren. En comparación con el control negativo que son células sin infectar, permanecen con una estructura celular normal y sin la presencia de conidios y blastoconidios.

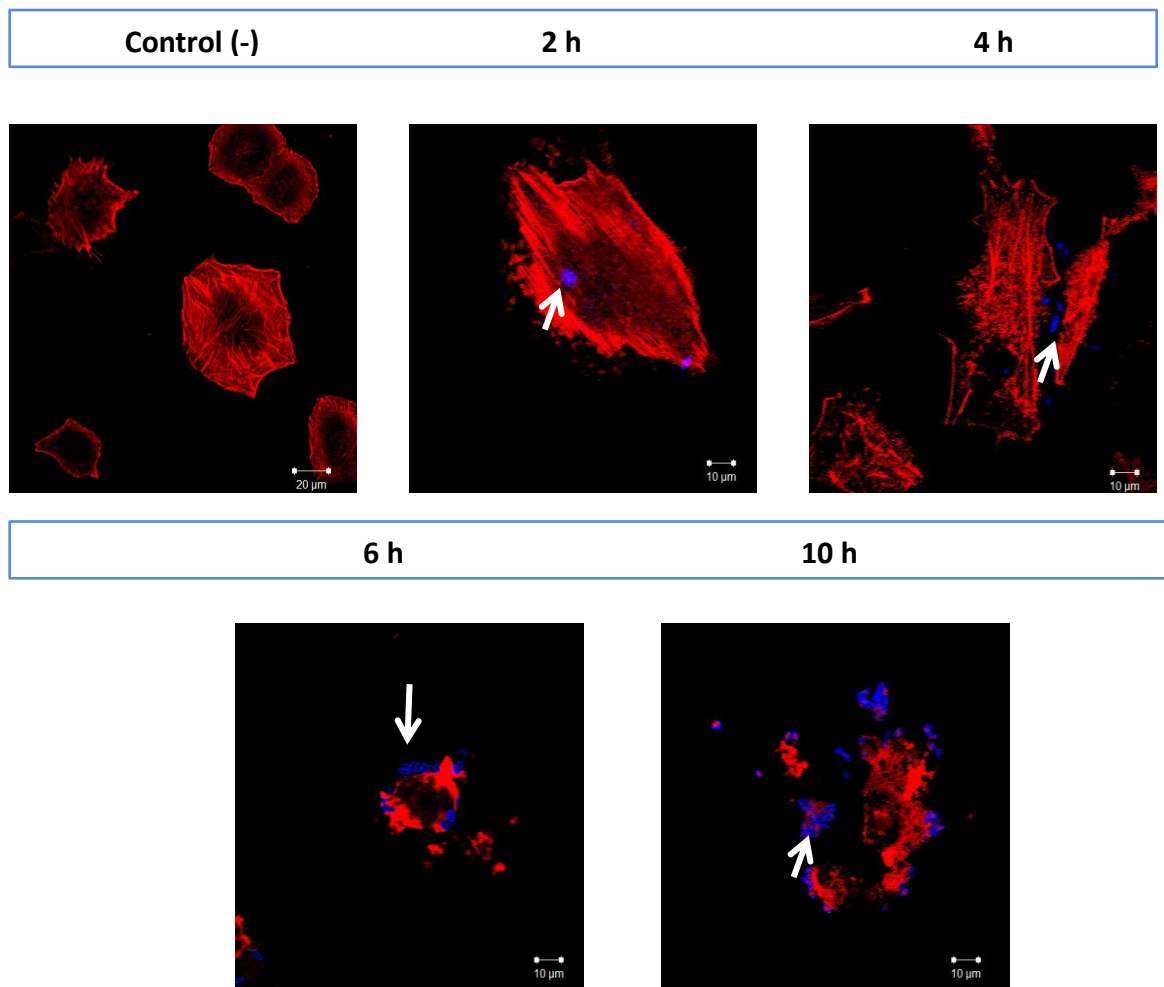


Figura 18. Internalización de blastoconidios de *S. schenckii* en queratinocitos humanos HaCaT por Microscopia confocal. Se muestran blastoconidios de morfología ovoide en color azul.

8.4 Análisis cuantitativo de la expresión de los genes para TLRs por qPCR

Los genes para los TLRs 2, 4 y 6; así como para las citocinas MCP-1, IL-8, TNF- α e IL-1 β , fueron amplificados mediante la técnica de qPCR. En cinéticas de infección de queratinocitos humanos HaCaT con conidios y blastoconidios a una MOI 1:1. Los valores representados en las gráficas corresponden a la expresión del mRNA, siendo el promedio de dos experimentos independientes y son representados como la media más el error estándar en porcentaje.

Como se muestra en la figuras 19, el análisis cuantitativo de la expresión de TLRs en cinética de Infección con conidios de *S. schenckii*, por qPCR, se observa un aumento de manera considerable en la expresión del receptor de superficie TLR-6, desde las dos horas post-infección, alcanzando un pico máximo a las 10 h con 2268 en expresión relativa y disminuyendo a las doce horas; con un diferencia significativa de $p < 0.001$, seguido de TLR-4 con un pico máximo a las 12 h con 40 unidades y por último la expresión de TLR-2 fue de 9 a las 10 h.

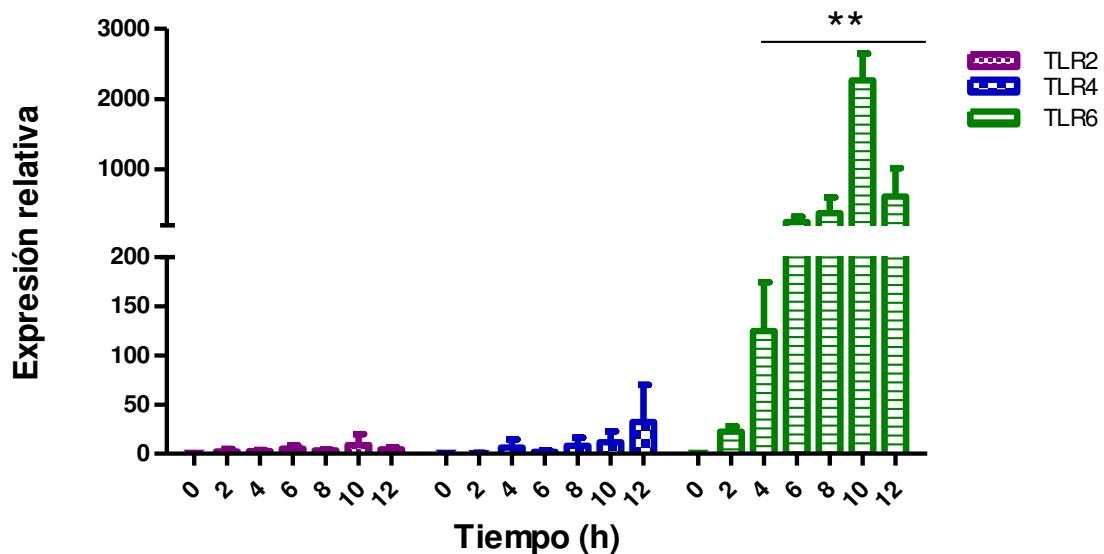


Figura 19. Análisis cuantitativo de la expresión de TLRs en cinética de Infección con conidios de *S. schenckii*, por qPCR. Se determinó la expresión de los niveles del mRNA de cada receptor por qPCR en cada tiempo post-infección. *= $p < 0.01$, **= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$.

Por otra parte al realizar la infección con blastoconidios de este hongo (Figura 20), la expresión de TLR-6 es mayor alcanzando un pico máximo a las 4 horas con 280 unidades de expresión relativa, seguido por TLR-4 con 60 unidades a las 8 h y por último el TLR-2 con una mínima expresión.

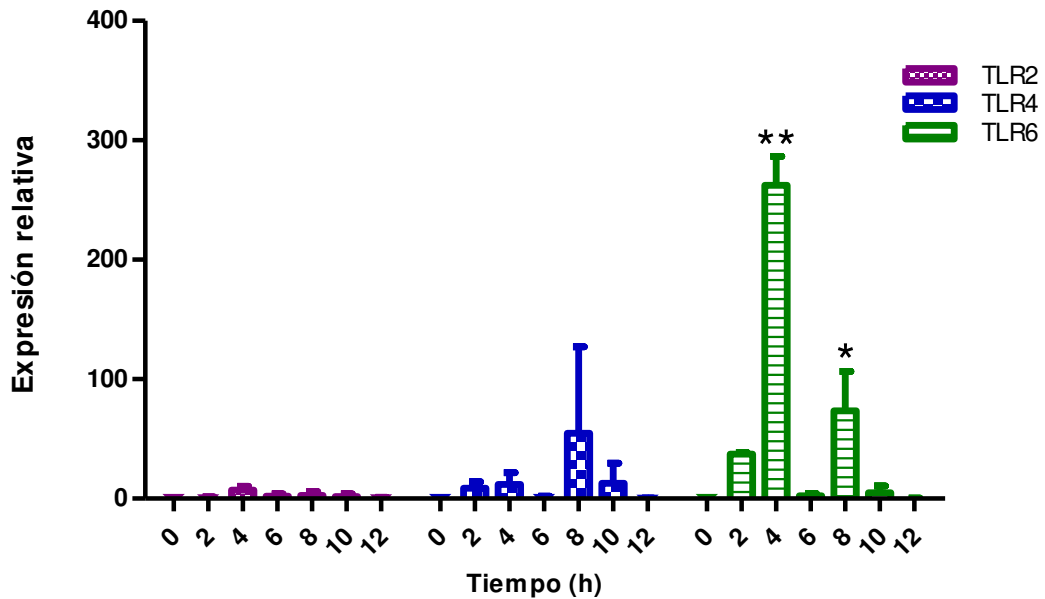


Figura 20. Análisis cuantitativo de la expresión de TLRs en cinética de Infección con blastoconidios de *S. schenckii*, por qPCR. Se determinó la expresión de los niveles del mRNA de cada receptor por qPCR en cada tiempo post infección. *= $p < 0.01$, **= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$.

8.5 Inmunofluorescencia para la detección de los receptores Tipo Toll, Manosa y CR3 en células HaCaT

La evaluación de la expresión de los receptores TLR-2, TLR-4, TLR-6, receptores a manosa y el receptor CR3, se realizó utilizando microscopía confocal, en cinéticas post-infección de 2, 6 y 10 h, infectando a las células HaCaT con conidios y blastoconidios de *S. schenckii*.

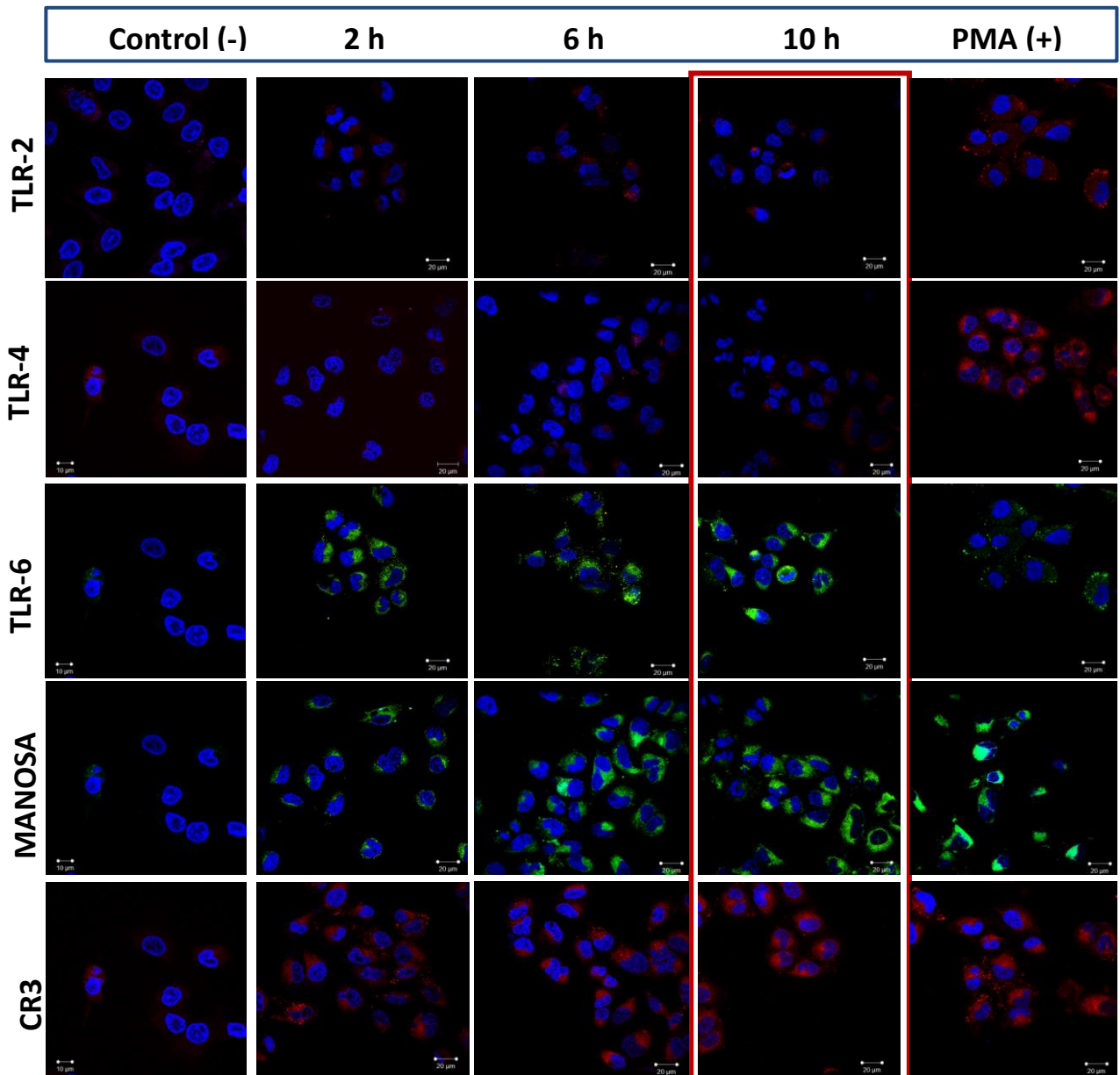


Figura 21. Expresión de los receptores tipo Toll 2, 4, 6, Receptor a Manosa y Receptor CR3 en queratinocitos humanos infectados con *S. schenckii*. Cinética de infección con conidios de *S. schenckii*. Controles: (-) células sin infectar y (+) PMA).

En la figura 21 se muestra las imágenes de la expresión de los receptores TLR-2, TLR-4, TLR-6, receptor a Manosa (RM) y receptor CR3 en queratinocitos infectados con conidios de *Sporothrix schenckii*, en este estudio se incluyó un control negativo (células sin infectar) y un control positivo de células estimuladas con PMA (0.2 µg). Encontramos que existe una discreta expresión de TLR-2, a partir de las 2 horas post-infección, sin embargo se puede notar que la máxima expresión es a las 10 h. Para TLR-4, en el control negativo se observa la expresión de este receptor de manera basal, mientras que a las 2, 6 y 10 horas se nota un ligero aumento de éste. En el caso de TLR-6 comienza la sobreexpresión a las 2 horas y su pico máximo es a las 10 horas, para el receptor a manosa y CR3 se observa el mismo fenómeno.

Al realizar la cinética de infección con blastoconidios de *Sporothrix schenckii* (Figura 22) los receptores TLR-6, receptor a manosa y receptor CR3, se observa un aumento en la expresión a partir de las 2 horas post-infección, sin embargo se puede notar que la máxima expresión es a las 10 h en comparación con el control de células sin infectar. Los receptores TLR-2 y TLR-4 muestran un aumento bajo en comparación con los otros receptores, se puede apreciar también que los receptores que se sobre expresan mayoritariamente son el TLR-6, el receptor a Manosa y el receptor CR3.

Este resultado es semejante a lo obtenido al infectar las células HaCaT con conidios.

Para corroborar de forma cuantitativa, se procedió a realizar el análisis de intensidad media de fluorescencia (IMF).

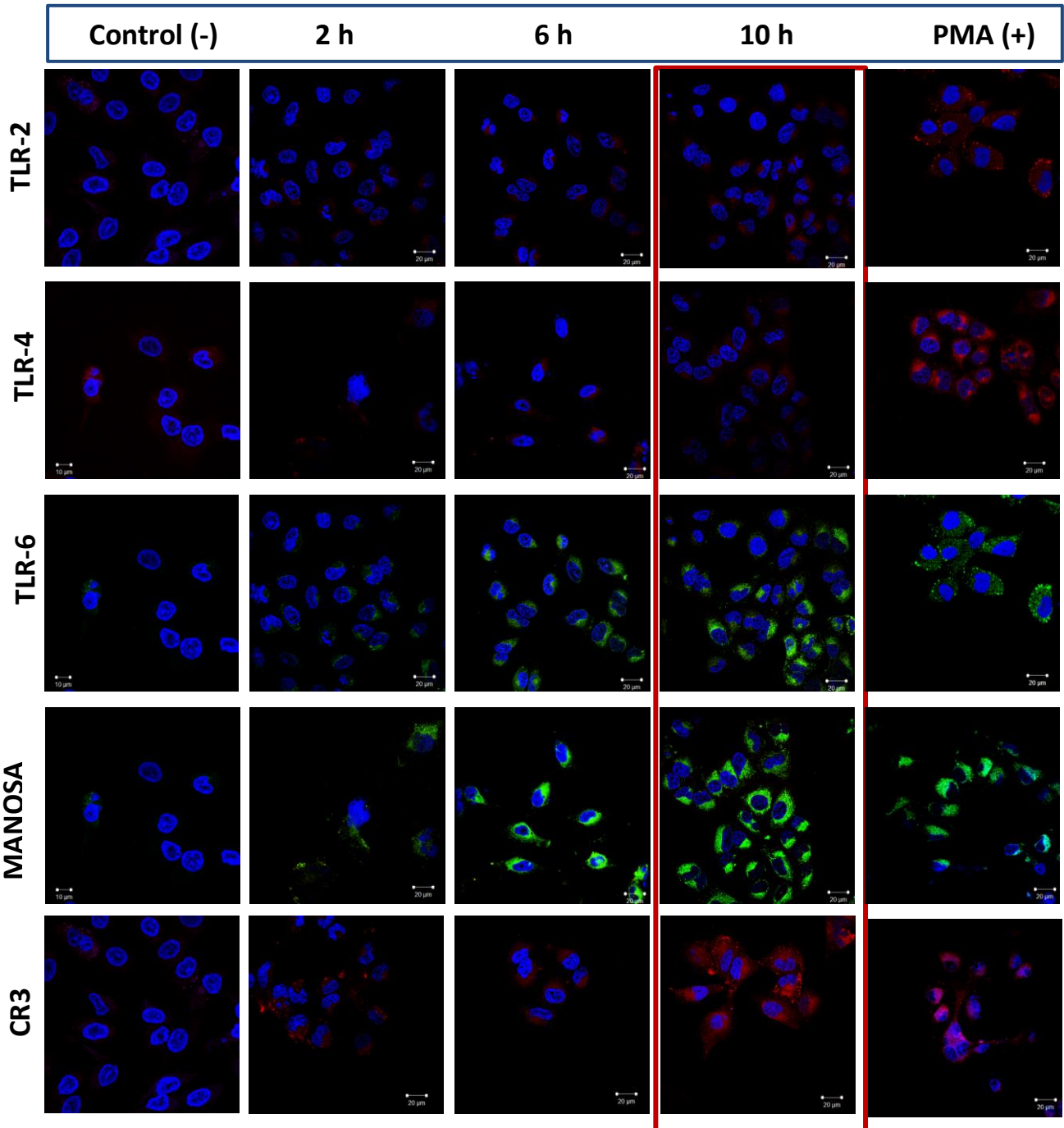


Figura 22. Expresión de los receptores tipo Toll 2, 4, 6, Receptor a Manosa y Receptor CR3 en queratinocitos humanos infectados con *S. Schenckii*. Cinética de infección con blastoconidios de *S. schenckii*. Controles: (-) células sin infectar y (+) PMA.

8.5.1 Análisis de la intensidad media de fluorescencia

El análisis numérico de la intensidad media de fluorescencia se realizó contando 50 células por campo observado, de imágenes obtenidas por un sistema de escaneo de microscopía confocal y calculando la intensidad de fluorescencia media, con el programa LSM Image Examiner Pascal (Confocal Zeiss).

Como se muestra en la figura 23, el análisis de la intensidad media de fluorescencia (IMF) en la cinética de Infección con conidios, para el TLR-2 muestra una IMF de 6, 9 y 10 ($p < 0.001$), a las 2, 6 y 10 horas post-infección, para TLR-4 la IMF es menor a 10 en todos los tiempos y no hay diferencia significativa comparado con el control. Sin embargo para el TLR-6 tiene una IMF de 26, 25 y 32 ($p < 0.001$) a las 2, 6 y 10 horas respectivamente. En el caso del receptor a manosa tiene una IMF de 13, 29 y 41 ($p < 0.001$) en los tiempos 2, 6 y 10 respectivamente. Para el receptor CR3 tiene 13, 20 y 21 de IMF en los tiempos 2, 6 y 10 post-infección con una significancia de $p < 0.001$.

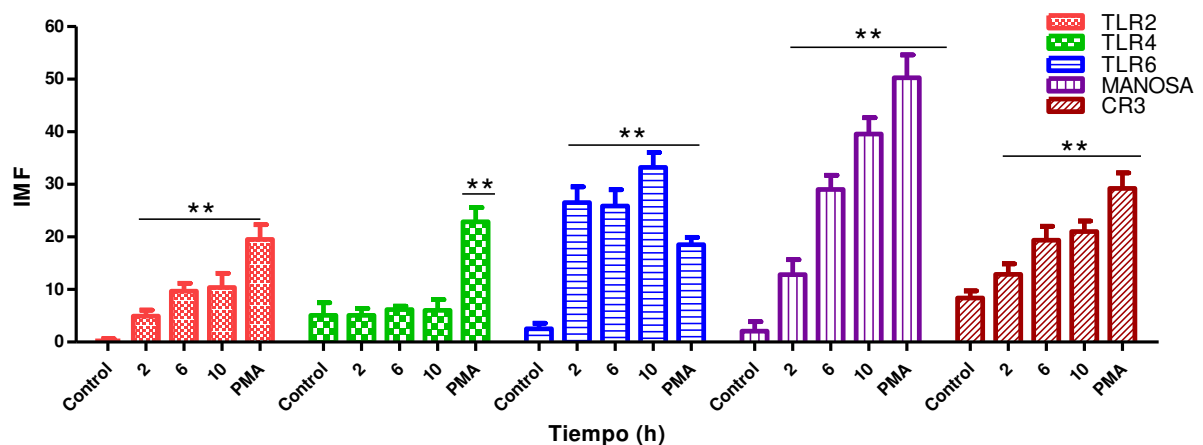


Figura 23. Análisis de la intensidad media de fluorescencia (IMF) en cinética de Infección de queratinocitos infectados con conidios de *S. schenckii*.

Tiempos post-infección: 2, 6 y 10 horas. *= $p < 0.01$, **= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$.

En la figura 24 se muestra el análisis de intensidad media, en la infección con blastoconidios, para el TLR-2 muestra una IMF máxima de 15 ($p < 0.001$) a las 10 horas post-infección, para TLR-4 la IMF es igual a 6, en todos los tiempos, en el cual no hay diferencia significativa comparado con el control negativo. Sin embargo para el TLR-6 tiene una IMF de 5 ($p < 0.01$) a las 2 h, 15 y 39 ($p < 0.001$), a las 6 y 10 horas respectivamente. En el caso del receptor a manosa tiene una IMF de 13, 31 y 51 ($p < 0.001$), en los tiempos 2, 6 y 10 h. Para el receptor CR3 tiene 6, 7 y 31 de IMF en los tiempos 2, 6 y 10 post-infección con una significancia de $p < 0.001$.

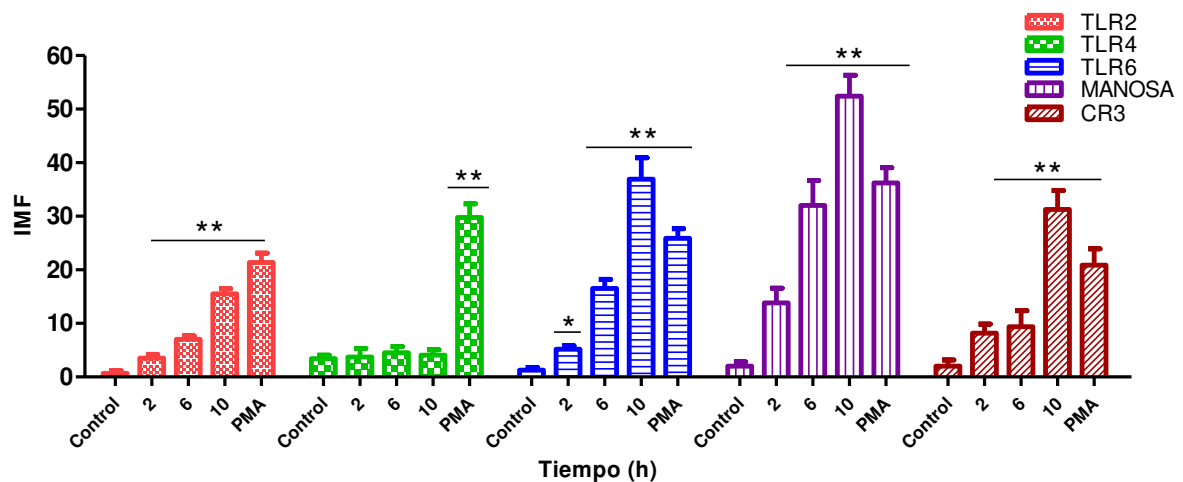


Figura 24. Análisis de la intensidad media de fluorescencia (IMF) en cinética de Infección de queratinocitos infectados con blastoconidios de *S. schenckii*. Tiempos post-infección: 2, 6 y 10 horas. *= $p < 0.01$, **= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$.

8.6 Análisis cuantitativo de la expresión de los genes para citocinas por qPCR

La expresión de RNAm para las citocinas evaluadas en el queratinocito ante la infección con conidios (Figura 25), se obtiene una mayor expresión de la quimiocinas MCP-1 con 800 unidades a las 10 h post-infección, seguido de IL-8 con 200 unidades a las 10 y 12 h; mientras que en las citocinas proinflamatorias se expresa IL-1 β con 40, TNF- α con 20 unidades de expresión relativa, en los tiempos: 10 y 2 h respectivamente.

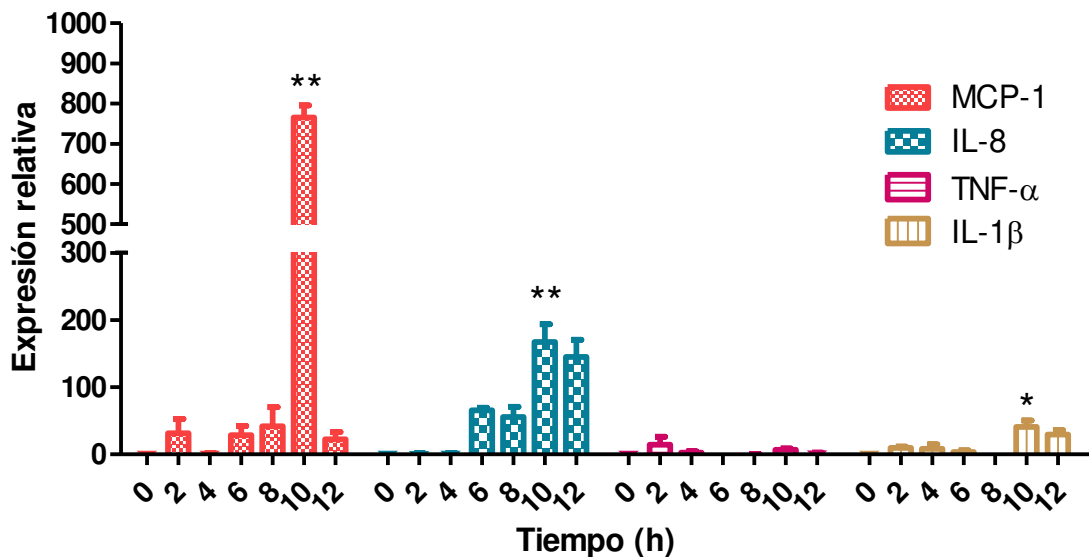


Figura 25. Análisis cuantitativo de la expresión de citocinas en cinéticas de Infección con conidios de *S. schenckii*, por qPCR. Se determinó la expresión de los niveles del mRNA de cada citocina por qPCR en cada tiempo post-infección. *= $p < 0.01$, **= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$.

Para las células infectadas con blastoconidios de este hongo (Figura 26), la expresión más alta es por la citocina proinflamatoria TNF- α , teniendo el pico máximo a las 6 h con 700 unidades de expresión relativa, seguido de IL-1 β a las 8h con 70 unidades; sin embargo la expresión de quimiocinas se sigue presentando con 58 UER a las 2 horas para IL-8, después de este tiempo su expresión va en decremento; para MCP-1 el pico máximo es a las 6 horas con 25 UER.

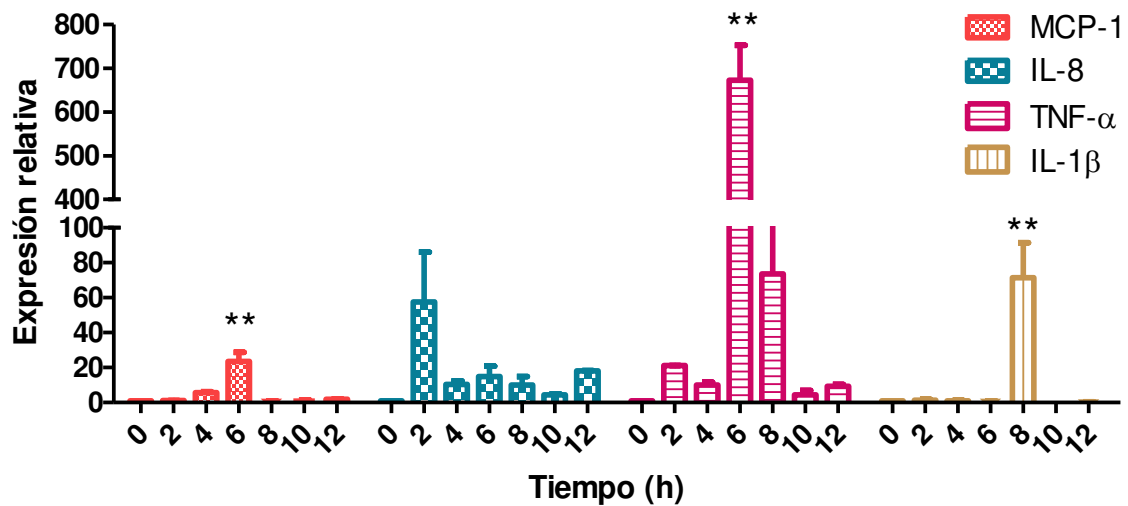


Figura 26. Análisis cuantitativo de la expresión de citocinas en cinéticas de Infección con blastoconidios de *S. schenckii*, por qPCR. Se determinó la expresión de los niveles del mRNA de cada citocina por qPCR en cada tiempo post-infección. *= $p < 0.01$, **= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$.

8.7 Cuantificación de citocinas por ELISA

Se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos de queratinocitos, infectados con *Sporothrix schenckii* de las cinéticas descritas anteriormente.

En la figura 27 se observa la concentración de las citocinas evaluadas en los diferentes tiempos de infección con conidios. En el cual los valores más altos, son para las quimiocinas: MCP-1, que comienza a presentarse a partir de las 2 h, con una concentración máxima a las 6 h con 76 pg/mL y disminuyendo a las 8h, hasta su nula producción a las 10 y 12 h post-infección. Para IL-8 comienza su producción a las 2h con 111 pg/mL manteniéndose hasta las 8 h donde se alcanza la concentración máxima de esta citocina con 149 pg/mL, para la IL-1 β su máxima producción es a las 8 h con 2.25 pg/mL.

Sin embargo para las citocinas proinflamatorias: IL-6 y TNF- α no se encontraron en el medio.

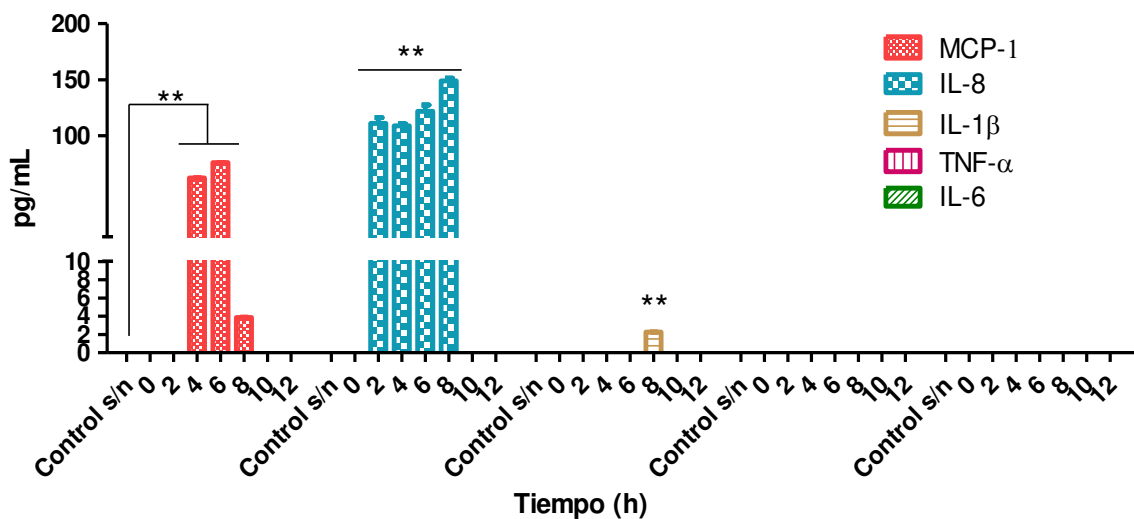


Figura 27. Cuantificación de citocinas en cinéticas de Infección de queratinocitos humanos infectados con conidios de *S. schenckii*, por la técnica de ELISA. Tiempos post-infección: 2-12 horas. *= $p < 0.01$, **= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$.

La producción de citocinas en las células HaCaT al ser infectadas con blastoconidios (Figura 28), se obtiene una mayor concentración de las quimiocinas: MCP-1 que a los 15 minutos post infección (tiempo 0), se presenta la máxima producción con 58 pg/mL, disminuyendo a las 2h a 34 pg/mL y posteriormente no se detectan concentraciones en ninguno de los demás tiempos evaluados.

En el caso de IL-8, comienza su producción a las 2 h con 43 pg/mL, aumentando ligeramente en cada tiempo para alcanzar su máxima concentración a las 12 h con 70 pg/mL. Para las citocinas proinflamatorias: IL-6 a las 2h presenta una concentración mínima de 7.6 pg/mL y TNF- α a las 8 h 21.23 pg/mL, mientras que IL-1 β no se encuentra presente en el medio.

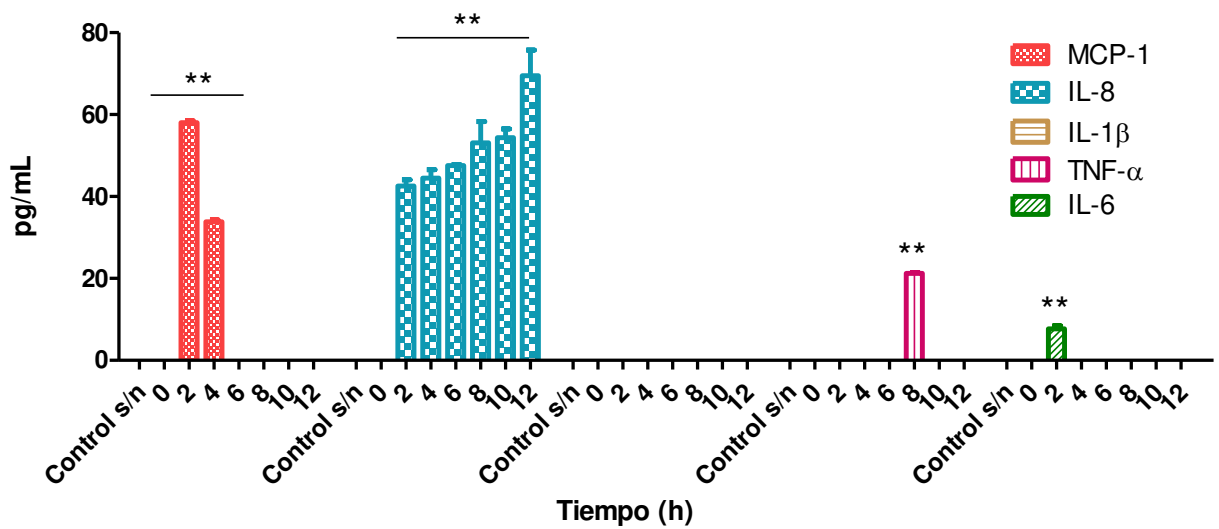


Figura 28. Cuantificación de citocinas en cinéticas de Infección de queratinocitos humanos infectados con blastoconidios de *S. schenckii*, por la técnica de ELISA. Tiempos post-infección: 2-12 horas. *= $p < 0.01$, **= $p < 0.001$ y ***= $p < 0.0001$.

8.8 Inmunofluorescencia para la determinación de los cambios estructurales en el citoesqueleto (filamentos de actina) de los queratinocitos infectados con *S. schenckii*.

Con el fin de determinar los cambios en la distribución del citoesqueleto de actina, como resultado de la interacción de las células HaCaT por conidios y blastoconidios de *S. schenckii*, se realizó una tinción con faloidina-Rho.

Como se observa en la figura 29, a las 2 h post-infección con conidios, las células comienzan a sufrir un rearrreglo de las fibras de actina, a las 6 y 10 h el cambio es más evidente, en el cual se observan células más pequeñas probablemente por la retracción de las fibras de actina, en comparación con el control de células sin infectar.

De la misma forma, ocurre para las células infectadas con blastoconidios, a las 2 h post-infección, se observan células pequeñas contraídas, sin embargo a las 4 h se puede notar que se está induciendo una polimerización de los filamentos de actina, formando proyecciones celulares (Figura 30).

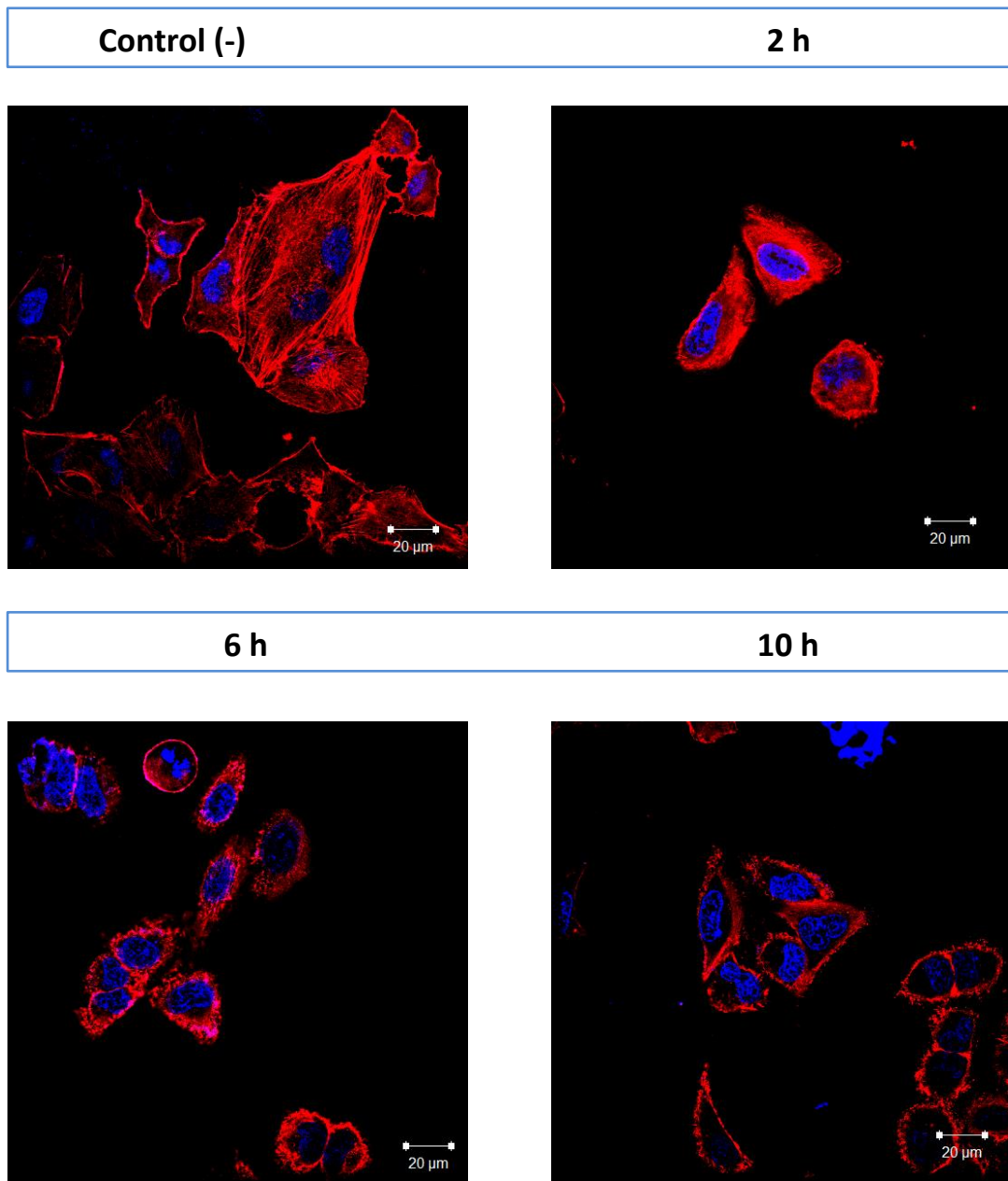


Figura 29. Cambios en el rearrreglo de las fibras de actina en células HaCaT infectados con conidios de *S. schenckii*. La imagen muestra las fibras de actina en rojo (Faloidina) y el núcleo celular en azul (DAPI).

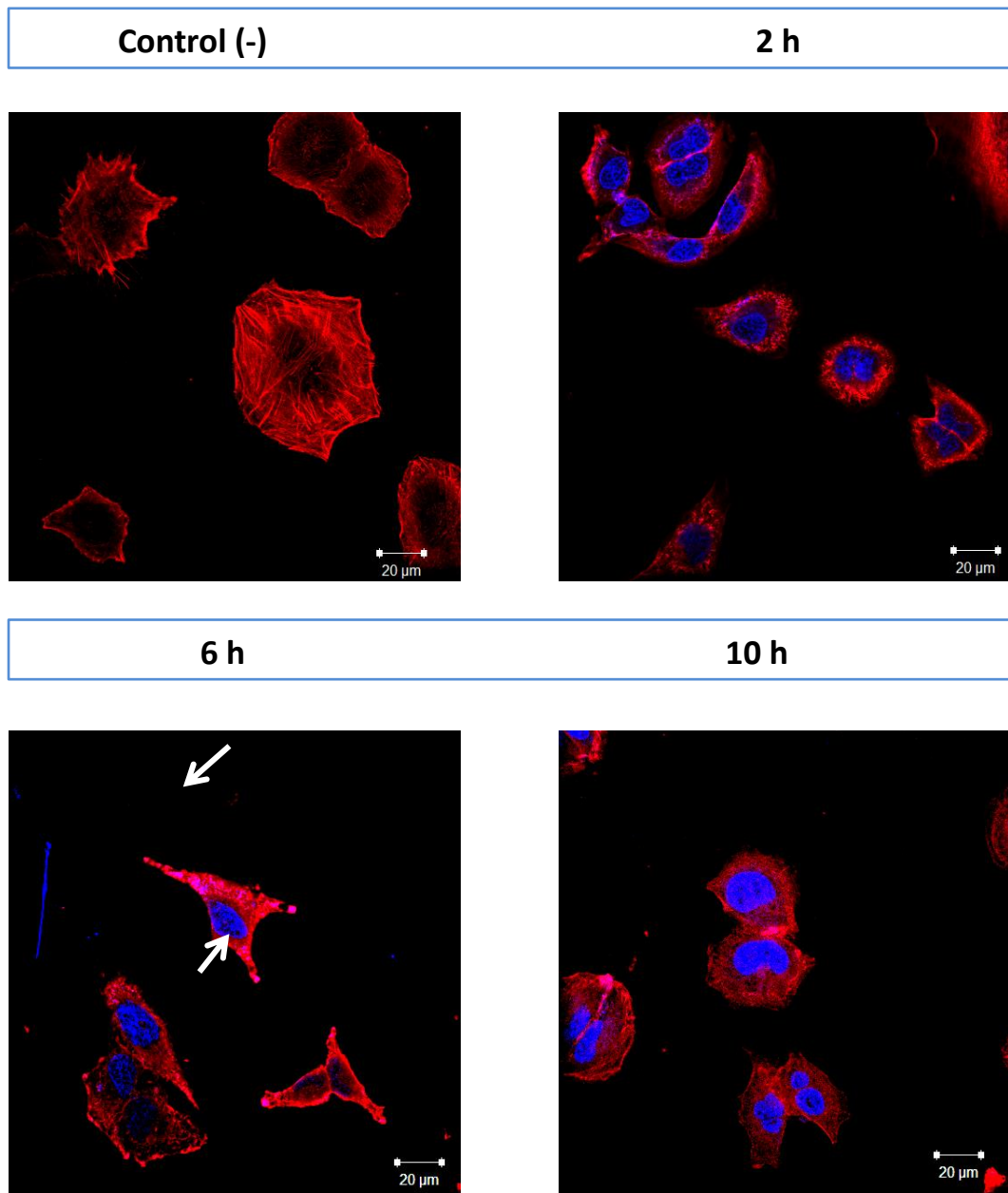


Figura 30. Cambios en el rearrreglo de las fibras de actina en células HaCaT infectados con blastoconidios de *S. schenckii*. La imagen muestra las fibras de actina en rojo (Faloidina) y el núcleo celular en azul (DAPI).

DISCUSIÓN

Desde la aparición del primer caso de esporotricosis en el año 1898 en Estados Unidos por Schenk, hasta la actualidad [1], la respuesta inmune del huésped contra *S. schenckii* no se entiende a fondo, como la descrita para otros hongos patógenos en humanos, por lo tanto, los mecanismos inmunológicos implicados en la prevención y control de la infección todavía no es clara y parecen ser desencadenadas por antígenos distintos de la superficie celular [16]. Como se ha descrito, su principal vía de entrada de *S. schenckii* es la cutánea, por inoculación traumática de conidios (fase infectante), una vez en el tejido, los conidios se transforman en blastoconidios (fase parasitaria), produciendo una respuesta inmunológica en el huésped. El primer contacto con este patógeno es a través de la piel, por lo tanto este juega un papel determinante en el control de la infección. La piel se considera como una barrera externa dinámica, formada por diferentes estirpes celulares capaces de desempeñar mecanismos de resistencia innata y adaptativa [12]. Se tomó como modelo al queratinocito humano por ser la población celular más abundante en la epidermis, además de que se ha reportado su papel como célula inmunocompetente en infecciones contra hongos [14].

En este trabajo se evaluó en un modelo *in vitro*, la respuesta inmunológica de los queratinocitos al ser infectados con conidios y blastoconidios de *Sporothrix schenckii*, esto mediante la sobreexpresión de los receptores TLR-2, TLR-4, TLR-6, receptor a manosa (RM), receptor CR3 y en consecuencia la producción de diversas citocinas, en el cual se consideró evaluar tres citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) y dos quimiocinas (IL-8 y MCP-1).

La primera parte de este trabajo consistió en comprobar que los queratinocitos se infectaban con *S. schenckii*, con una MOI: 1:1, esto se realizó mediante un análisis por Microscopía confocal, las imágenes sugieren que los blastoconidios se internalizan en las células huésped después de las 2 h post-infección, en donde se logra apreciar cúmulos de conidios y blastoconidios. Cabe mencionar que el tamaño de los conidios de *S. schenckii* oscilan entre 3-5 μ m, mientras que los

blastoconidios es de 1-3 x 3-10 μm [1], comparado con los queratinocitos, estos son de un tamaño considerablemente menor, por lo que su endocitosis resulta factible en cuanto a tamaño y teniendo en cuenta que la mayoría de los patógenos pueden invadir células no fagocíticas para garantizar su supervivencia. Por otra parte, en la literatura se encuentra reportado que *Sporothrix schenckii* es un hongo que permanece intracelularmente en las células huésped, por lo tanto nuestros resultados son semejantes a lo obtenido por Figuerero y colaboradores en el 2004, donde estudiaron la interacción entre *S. schenckii* y las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), teniendo como resultado que *S. schenckii* interactúa con HUVEC de una manera dependiente del tiempo. Su análisis morfológico mostró que los blastoconidios se localizaban en las uniones interendoteliales, mientras que los estudios ultraestructurales mostraron que los blastoconidios estaban internalizados dentro de vacuolas endocíticas, después de dos horas post-infección sin causar ningún daño detectable a HUVECs. [74]. En comparación con nuestro trabajo, los queratinocitos (HaCaT) si sufrieron un daño en el transcurso de la cinética, ya que a partir de las 12 horas comenzaban a morir, pero esto depende de la virulencia de la cepa, ya que al ser un aislado clínico de un paciente con un cuadro clínico de esporotricosis sistémica con dos meses de evolución y que lamentablemente falleció; se podría intuir que la cepa tiene un alto grado de virulencia.

Sin embargo se desconoce el mecanismo de internalización, los receptores y moléculas de señalización que pudieran participar en esta vía endocítica.

Bajo este contexto, son conocidas las dificultades que existen para evidenciar en los tejidos las formas parasitarias del hongo; se dice que los blastoconidios son muy pequeños, difíciles de teñir y en más del 95% de los casos no se visualiza la forma parasitaria [75], esto puede deberse a que los blastoconidios se encuentran internalizados en las células del huésped y por ello es difícil visualizarlos en los tejidos, sólo en aquellos casos de esporotricosis sistémicas.

El rápido reconocimiento de bacterias, hongos, virus y algunos parásitos, se lleva a cabo mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR's), presentes en los queratinocitos que reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos

(PAMPs) [50,51]. La evaluación de la expresión de los receptores por el análisis de IMF (Intensidad Media de Fluorescencia) para TLR-2, TLR-4, TLR-6, receptores a manosa (RM) y el receptor CR3, en la infección con conidios de *S. schenckii* en células HaCat, dio como resultado una mayor sobreexpresión a las 10h de los receptores a Manosa, seguido del TLR-6 y CCR3 y una baja expresión de TLR-2 y TLR-4. Mientras que en la infección con blastoconidios los resultados fueron similares, una alta sobreexpresión del receptor a manosa, seguido del TLR-6, CR3 y una baja expresión de TLR-2 y TLR-4.

La alta sobreexpresión del receptor a manosa se justifica debido a que este reconoce por medio de sus dominios de lectina de tipo C (CTDLs), diversos PAMPs presentes en hongos, principalmente la manosa y otros azúcares como la fucosa. Se considera un receptor de endocitosis, porque su función es unir e internalizar una gran variedad de glicoproteínas desde la membrana plasmática, vía vesículas recubiertas de clatrina hasta el sistema endosomal [62,63]. Un informe de Guzmán y Col., sugiere la participación del Receptor a Manosa (RM) en la fagocitosis de conidios de *S. schenckii* por macrófagos THP-1, mediante el empleo de competidores de unión a manosa como: D-manosa, α -D-manopiranosido de metilo, D-fucosa y N-acetil glucosamina, el cual bloquean dicho proceso [21]. Ya que la participación de este receptor en la fagocitosis por macrófagos se encuentra comprobado, se podría intuir la misma función en la endocitosis de conidios y blastoconidios de *S. schenckii* por queratinocitos (células no fagocíticas).

Para el caso de TLR-6, este actúa de manera sinérgica con TLR-2 como un homodímero y reconoce diferentes productos bacterianos como lipoproteínas de bacterias Gram negativas, peptidoglicano de bacterias Gram positivas, ácido lipoteicoico y LPS; sin embargo el aumento en su expresión se debe a que también reconoce moléculas de zimosan y β -glucanos presentes en la pared celular de los hongos [56].

La sobreexpresión del receptor CR3 es atribuido al reconocimiento del fragmento C3bi del complemento que tiene la capacidad de fijarse de manera covalente a

grupos $-OH$ y $-NH_2$, presentes en la superficie de los patógenos, los microorganismos opsonizados son rápidamente eliminados por endocitosis [60]. Además, el CR3 también se puede unir a diferentes moléculas encontradas en la superficie de los patógenos como el LPS, polisacarido de *Mycobacterium tuberculosis* y el Zimosan de los blastoconidios, permitiendo la endocitosis directa de estos [60].

Cabe enfatizar que la participación de los receptores endocíticos RM y el receptor CR3, no se encuentran reportados en la endocitosis de conidios y blastoconidios de *S. schenckii*, en ello radica su importancia y por lo tanto podrían estar involucrados en la vía de internalización de este hongo en el queratinocito, no obstante se requiere elucidar todo el mecanismo endocítico, así como las moléculas que participan en esta vía de señalización y la búsqueda de otros receptores que pudieran participar.

La expresión de TLR-4, se debe al reconocimiento de LPS en bacterias [36], pero también se ha reportado que reconoce moléculas de manano, presentes en hongos [39], por tal motivo aumenta su expresión al reconocer estas moléculas de la pared celular de *S. schenckii*. Estos resultados son similares a los obtenidos por dos grupos de investigación. Sassá y colaboradores, valoraron la respuesta inmunitaria a través de la medición de mediadores pro-inflamatorios, como, el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α), Óxido Nítrico e Interleucina 10 (IL-10) en macrófagos peritoneales, en el cual reportaron cantidades reducidas de los mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios en ratones deficientes de TLR-4, lo que sugiere la implicación de este receptor en el reconocimiento de este agente infeccioso [13], Otro grupo de investigadores demostraron que los conidios y los blastoconidios de *S. schenckii* activan la respuesta inflamatoria caracterizada por la producción de citocinas y quimiocinas como IL-6 e IL-8, además de la activación del TLR-2 y TLR-4 en queratinocitos humanos de prepucio neonatal [28].

Al realizar el análisis de expresión relativa del mRNA de los receptores tipo toll 2, 4 y 6 por qPCR, se obtuvo como resultado que en la infección con conidios y blastoconidios de *S. schenckii*, se obtiene una mayor expresión del receptor TLR-6

a las 4 y las 10 h post-infección. Esto se correlaciona con lo obtenido por el análisis de intensidad media de fluorescencia. En ambos casos tanto por microscopia confocal como por qPCR se puede observar que el mayor nivel de expresión de TLRs en los queratinocitos humanos tras la infección con conidios y blastoconidios de *S. schenckii* es del TLR-6, a las 10 h seguido por TLR-4 y TLR-2, cabe mencionar que la participación del TLR-6 es estimular la producción de IL-1 β , TNF α e IL-6, dependiente de la proteína adaptadora MyD88 y la activación del factor de transcripción NF- κ B [56] y quimiocinas (MCP-1 e IL-8).

En el análisis de expresión relativa de mRNA de citocinas por qPCR, se obtuvo en la infección con conidios una mayor expresión de las quimiocinas MCP-1 e IL-8 a las 10 h, esto indica que al ser infectado el queratinocito con esta fase del hongo (fase infectiva), se expresan los genes para la producción de quimiocinas y crear un ambiente quimiotáctico para el reclutamiento de células PMN y monocitos. Sin embargo en la infección con blastoconidios (fase parasitaria) la mayor expresión es para las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β con una máxima expresión a las 6 y 8 h respectivamente.

Esta diferencia en la expresión relativa de las citocinas en el queratinocito, al ser infectado con conidios y blastoconidios, podría indicarnos que los queratinocitos son capaces de reconocer estructuras específicas de cada una de las fases, promoviendo una respuesta inmunológica diferente para cada una de ellas. Esta diferencia en la respuesta de la célula huésped entre cada una de las fases del hongo ha sido reportada en *C. albicans* [76].

Estos resultados se compararon con los ELISA, en el cual se obtuvo una mayor concentración de las quimiocinas MCP-1 (76 pg/mL) e IL-8 (149 pg/mL) a las 6 y 8h respectivamente, estos datos coinciden con lo obtenido por qPCR en la infección con esporas.

Por otra parte, al infectar con blastoconidios hay una mayor concentración de MCP-1 (58 pg/mL) e IL-8 (70 pg/mL), seguido por TNF- α (21 pg/mL) e IL-6 (8 pg/mL), estos resultados no son semejantes con los datos de qPCR en el que había una mayor expresión de las citocinas pro-inflamatorias. Esto podría deberse por dos motivos: 1) la traducción del mRNA a proteína se está llevando a cabo, sin

embargo la proteína no se está transportando hacia el medio exterior, lo que sugiere un problema en el sistema de secreción de la célula, causada por la infección, 2) los diferentes factores de virulencia que tienen los hongos, en el cual pueden regular a nivel transcripcional y traduccional la producción de ciertas proteínas, como son las citocinas y de este modo evadir la respuesta inmunológica del huésped.

Durante la infección se determinaron los cambios estructurales en el citoesqueleto de los queratinocitos, donde se observa que hay un rearrreglo de estas fibras de actina en el transcurso de la infección de conidios y blastoconidios; sin embargo es más evidente en la primera. Estos cambios en el citoesqueleto podrían ser estimulados por la interacción de *S. schenckii* para inducir la polimerización de los filamentos de actina, lo que conduciría a la formación de proyecciones celulares que se observan en las imágenes de microscopia confocal y que a su vez podrían atrapar a los conidios y blastoconidios, estos cambios en el rearrreglo de las fibras de actina inducidos por hongos los reporta Muñoz-Duarte y colaboradores [77] en un estudio del citoesqueleto de actina en la captación de *C. glabrata* por osteoblastos.

Como se muestra en la figura 31, se propone un esquema de la interacción de *S. schenckii* con el queratinocito, en el cual sabemos que los conidios y blastoconidios se internalizan en la célula huésped, sin embargo desconocemos el mecanismo por el cual lo hacen, las moléculas y receptores que participan en esta vía endocítica. Una vez dentro de la célula éstos inducen la sobreexpresión de los Receptores a Manosa, TLR-6 y CR3; así como también la producción de quimiocinas: MCP-1 e IL-8, creando un ambiente quimiotáctico, además se observaron cambios importantes en el rearrreglo de las fibras de actina, estos cambios pueden atribuirse a la endocitosis del hongo, sin embargo se necesitan más estudios para corroborarlo. Subsecuentemente a esto, se propone que una vez dentro de la célula el hongo podría replicarse, causando la muerte celular, su liberación y posible diseminación a otros tejidos, aunque para demostrarlo se requieren más investigaciones.

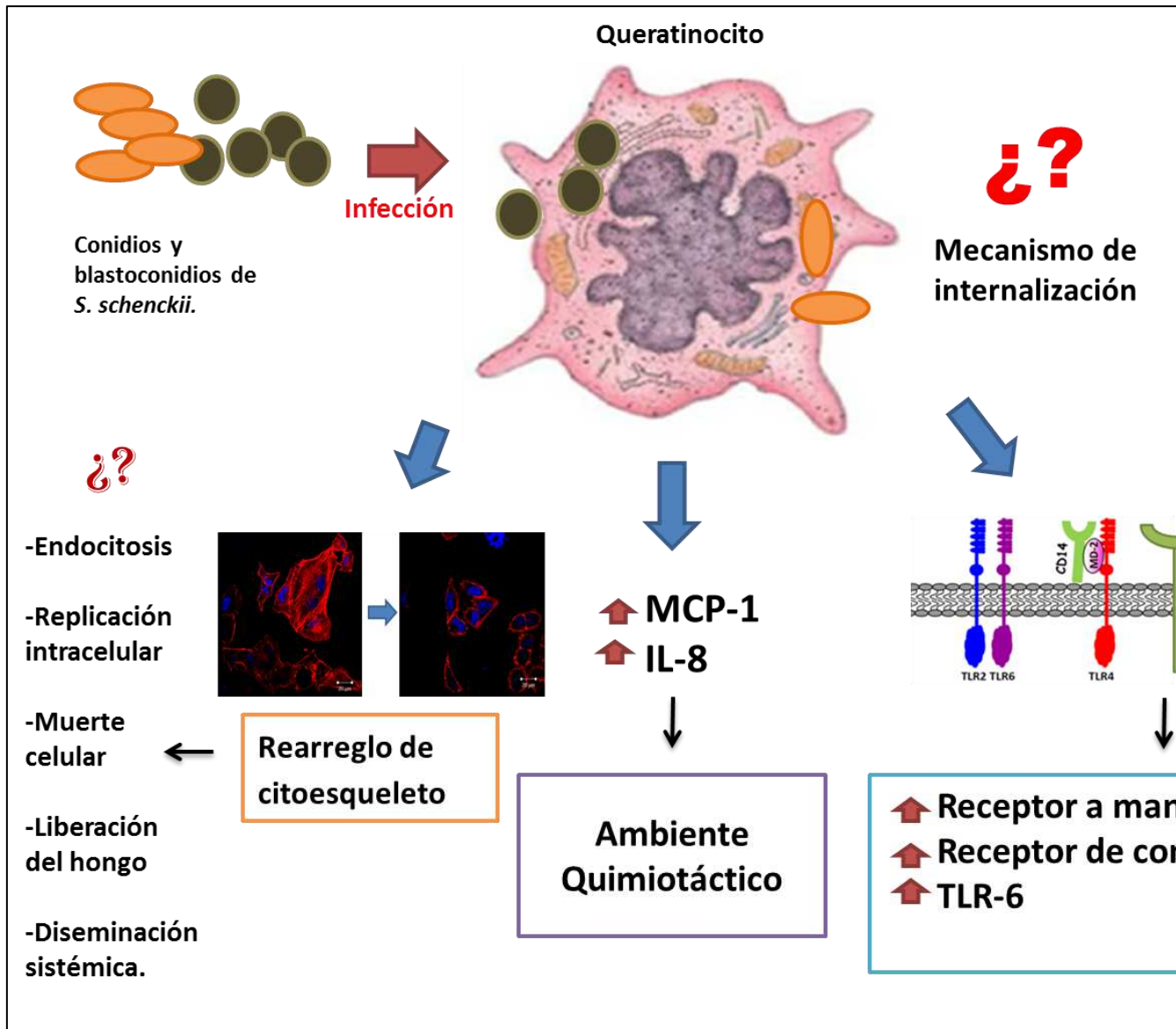


Figura 31. Esquema propuesto de la interacción de *S. schenckii* con los queratinocitos de la línea HaCaT.

CONCLUSIONES

- Los conidios y blastoconidios de *S. schenckii* se internalizan en los queratinocitos de la línea HaCaT, a través de un mecanismo aún desconocido.
- La infección por conidios y blastoconidios de *S. schenckii* producen la sobreexpresión de los receptores: RM, TLR-6 y CR3 en queratinocitos.
- Al infectar el queratinocito con conidios y blastoconidios de *S. schenckii*, se producen en mayor concentración las quimionas MCP-1 e IL-8.
- La infección por *S. schenckii* origina cambios en el rearrreglo de las fibras de actina.

PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo sugieren que los queratinocitos humanos son células inmunocompetentes que participan en el control de la infección por *Sporothrix schenckii* a través de la activación de los diferentes mediadores de la respuesta inmunológica. Sin embargo todavía hay preguntas sin resolver y que nos pueden proporcionar más datos acerca de esta interacción hospedero/patógeno.

Dentro de las perspectivas del trabajo se encuentran los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar todo el mecanismo de internalización de los conidios y blastoconidios de *S. schenckii*.
- Evaluar los factores de virulencia de *S. schenckii* en la regulación de la expresión génica de citocinas.
- Realizar un ensayo de replicación intracelular.
- Confirmar el papel del citoesqueleto de actina en la captación de *S. schenckii* por los queratinocitos, mediante la inhibición de la polimerización de actina utilizando inhibidores específicos como Citocalasina D, entre otros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 4a ed. McGraw-Hill, 2012.
2. Arenas R., Sporotrichosis. In: Topley & Wilsons, Microbiology and Microbial Infections. Merz WG, Hay R (eds). 10th ed. London, 2005.
3. Bonifaz A, Vázquez G.D. Sporotrichosis: Un update. G Ital Dermatol Venerol 2010; 145: 659-673.
4. Mayorga R. J, Barba R. J., Muñoz E. VF. Esporotricosis en el Estado de Jalisco, estudio clínico-epidemiológico (1960-1996). Dermatol Rev Mex 1997; 41: 105-108.
5. Mayorga J, Martínez D, Méndez P. Aislamiento de *Sporothrix schenckii* en la naturaleza (suelos y plantas). Med Cutan Iber Lat Am 1999; 27: 25-28.
6. Lavallo P. Epidemiología del micetoma y de la esporotricosis con especial referencia al Estado de Puebla. Mem VI Cong Mex Dermatol, 1975: 50-56.
7. Munguía P. R., Romo L. Y., Castañeda R. E., Velázquez E. MC, Espinoza T. A. Epidemiología de la esporotricosis en el municipio de Huauchinango, Puebla. Microbiol. 2007; 27: 38-43.
8. Marimon R., Cano J., Gené J., Sutton D., *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. Mexicana* three new *Sporothrix* species of clinical interest. J Clin Microbiol 2007; 45: 3198-3206.
9. Marimon R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 732-734.
10. Rippon J. "Sporotrichosis" Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Philadelphia. WB Saunders 1998; 327-338.
11. Di Silva A. "Occupational mycosis" Philadelphia: Lea & Febiger, 1983:247.
12. Castrillón R. L. E, Palma R. A., Padilla D. C. La función inmunológica de la piel. Dermatol Rev Mex 2008; 52 (5):211-24.
13. Sassá MF, Satri AE, Sousa LF, Ribeiro LC, et al. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. Immunology 2009; 128:301-309.
14. Niebuhr M., Baumert K. y Werfel T. TLR-2-mediated cytokine and chemokine secretion in human keratinocytes. Experimental dermatology, 2010; 19, 873-877.
15. Martínez Á. J., Pérez G. L., Flores C. A., Mora M. H., The immune response against *Candida spp.* and *Sporothrix schenckii*, Rev Iberoam Micol. 2014;31 (1):62-66.
16. Barros B., M., Paes de A. R., Oliveira S. A., *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. CLIN. MICROBIOL. REV., 2011; 0893-8512.
17. Plouffe JF, Silva J, Fekety R, Reinhalter E, Browne R. Cell-mediated immuneresponses III sporotrichosis. J Infect Dis. 1979; 139:152-7.
18. Kajiwara H, Saito M, Ohga S, Uenotsuchi T, Yoshida S-I. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. Infect Immun. 2004; 72:5073-9.

19. Shiraishi A, Nakagaki K, Arai T. Role of cell-mediated immunity in the resistance to experimental sporotrichosis in mice. *Mycopathologia*. 1992; 120:15–21.
20. Scott EN, Muchmore HG, Fine DP. Activation of the alternative complement pathway by *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun*. 1986; 51:6–9; Torinuki W, Tagami H. Complement activation by *Sporothrix schenckii*. *Arch Dermatol Res*. 1985; 277:332–3.
21. Guzman B. S, Perez T. A, Coronel C. C, Torres G. H. Phagocytic receptors on macrophages distinguish between different *Sporothrix schenckii* morphotypes. *Microbes Infect*. 2012; 14:1093–101.
22. De Lima F. D, Nascimento RC, Ferreira KS, Almeida SR. Antibodies against *Sporothrix schenckii* enhance TNF- α production and killing by macrophages. *Scand J Immunol*. 2012; 75:142–6.
23. Carlos IZ, Sassá MF, Graca Sgarbi DB, Placeres MCP, Maia DCG. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*. 2009; 168:1–10.
24. Sassá M, Ferreira L, Abreu Ribeiro L, Carlos I. Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-deficient mice. *Mycopathologia*. 2012; 174:21–30.
25. Negrini T. de C., Ferreira LS, Alegranci P, Arthur RA, Sundfeld PP, Maia DC, et al. Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*. *Immunol Invest*. 2013; 42:36–48.
26. Maia DCG, Sassá MF, Placeres MCP, Carlos IZ. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 2006; 161:11–9.
27. Tachibana T, Matsuyama T, Mitsuyama M. Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Med Mycol*. 1999; 37:397–404.
28. Li M, Chen Q, Sun J, Shen Y, Liu W. Inflammatory response of human keratinocytes triggered by *Sporothrix schenckii* via toll-like receptor 2 and 4. Letters to the Editor. *Journal of Dermatological Science* 66, 2012; 71–84.
29. Carrada B. T. Esporotricosis: Avances recientes en el diagnóstico de laboratorio, histopatología y la epidemiología en México., *Rev Latinoamer Patol Clin*, pp 147-171.
30. Madrid, H., Cano, J., Gene, J., Bonifaz, A., Toriello, C. & Guarro, J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Rev Iberoam Micol* 2009; 26, 218–222.
31. Lopez R. E., del Rocio R. M., M., Perez-Torres, A., Ruiz-Baca, E., Villagomez-Castro, J. C., Mora-Montes, H. M., Flores- Carreón, A. & Toriello, C. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol* 2011; 6, 85–102.
32. Rodrigues, A. M., de Hoog, S. & de Camargo, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med Mycol* 2013; 51, 405–412.
33. Arenas R., *Micología Médica Ilustrada*, 5ª ed. McGraw-Hill, 2014, ISBN: 9786071511256.

34. Lopez B. L. M., Schubach, A. & Costa, R. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. An Acad Bras Cienc 2006; 78, 293–308.
35. Tellez, M. D., Batista D. A., Portuondo D., Quinello C., Bonne H. R. and Carlos I. Z. Review: *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. Microbiology 2014; 160, 2352–2365.
36. Padilla D. MC, Saucedo A. Esporotricosis de doble inoculación. Comunicación de un caso. Rev Cent Dermatol Pascua 2001; 10:25-30.
37. Amado Saúl A., Bonifaz A. Clasificación de la esporotricosis. Una propuesta con base en el comportamiento inmunológico. Dermatología Rev Mex 2011;55(4):200-208.
38. Palma R. A., Castrillón R. L., Fernández L. S., Paredes R. A., Castañeda S., J. Padilla D. M., Vega M. M., Arenas G. R., Lactoferrina en 11 pacientes diagnosticados con esporotricosis cutánea. Dermatol Rev Mex 2015;59:280-287.
39. Bailey & Scott; Diagnostico microbiológico, 12^a Ed., Médica Panamericana, Buenos Aires, 2009.
40. Mora M. H. M., Ponce N. P., Villagomez C. J. C., Gow, N. A. R., Flores C. A. & Lopez R. E. Protein glycosylation in *Candida*. Future Microbiol 2009; 4, 1167–1183.
41. Travassos, L. R., de Sousa, W., Mendonça, a-Previato, L. & Lloyd, K. O. (1977). Location and biochemical nature of surface components reacting with concanavalin A in different cell types of *Sporothrix schenckii*. Exp Mycol 1, 293–305.
42. Bhutia, P., Gurung, S., Yegneswaran, P., Pradhan, J., Pradhan, U., Peggy, T., Pradhan, P., & Bhutia, C. A case series and review of sporotrichosis in Sikkim. The Journal Of Infection In Developing Countries 2011; 5(08), 603-608.
43. Nestle F. O., Di Meglio P., Qin J. and Nickoloff B. J. Skin immune sentinels in health and disease. Nature reviews Immunology 2009; 9:679-691.
44. Krishna S. & Miller L. S. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections Seminars in Immunopathology. 2012; 34:261–280.
45. Velásquez P. D., Pineda M. C., Cardona C. M. E., Gómez S. N. E., Gartz M. G.J., Úsuga G. I. C., Tróchez W. D. F., Londoño P. C. Soluciones terapéuticas para la reconstrucción de la dermis y la epidermis. Oportunidades en el medio antioqueño. Revista Ingeniería Biomédica Medellín, Colombia, 2008; 2(3):72-83.
46. Rojas E. O. Inmunología: (de Memoria). 3^a Ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2006.
47. Nossal, G.J. The skin and to the immune system New. Eng. J. Med. 1989; 317:1320.
48. Palma R. A, Castrillón R. L. E, Encinas PMG, Padilla DC, Arenas GR. Participación de los queratinocitos en la respuesta inmunitaria contra actinomicetoma. Dermatol Rev Mex 2009; 53(5):225-33.
49. Barker JN, Mitra RS, Griffiths CE, Dixit VM, Nickoloff BJ. Keratinocytes as initiators of inflammation. Lancet 1991; 337(8735):211-4.

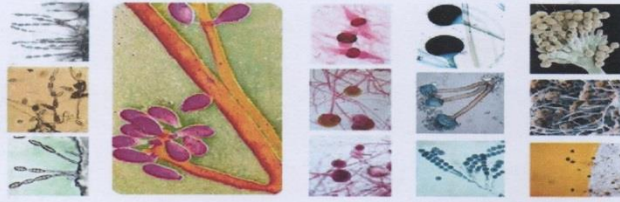
50. Sabroe, I., Parker, L. Receptores Símil Toll: Su papel e Enfermedades Inflamatorias Alérgicas y no Alérgicas. *Clinical and Experimental Allergy*. 2002; 32: 984-989.
51. Bautista, C., Mosqueda, J. Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria. *Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria*. México. 2005; 36(4).
52. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783–801.
53. Morris R., J., Innate immunity and the regulation and mobilization of keratinocyte stem cells: Are the old players playing a new game? Ashok Singh. *Experimental Dermatology*, 2012; 21,660-664.
54. Mesa V. M, Patiño PJ. Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. 2006; 115-130.
55. Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*, 1991; 351:355–356.
56. Kawai T., Akira S., Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *j.immuni*.2011; 05.006.
57. Guzmán M., K., La inmunidad innata y los receptores tipo Toll (TLR'S), UPG veterinaria, 2010.
58. Kumar H.,Kawai T., Akira S., Toll-like receptors and innate immunity., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009; 621–625.
59. Akira S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 311:1–16.
60. Rugeles M. T., Patiño G. P. Montoya C. J., *Inmunología: Una ciencia activa*, 2ª Ed. Colombia., 2009, ISBN: 978-958-714-230-3.
61. Wileman, T. E., Lennartz, M. R. and Stahl, P. D., Identification of the macrophage mannose receptor as a 175-kDa membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 2501-2505.
62. East, L. and Isacke, C. M., The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 364-386.
63. Ezekowitz, R. A., Sastry, K., Bailly, P. and Warner, A., Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 1990; 172: 1785-1794.
64. Zamze, S., Martínez-Pomares, L., Jones, H., Taylor, P. R., Stillion, R. J., Gordon, S. and Wong, S. Y., Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* 2002; 277: 41613-41623.
65. Owen J., Kuby. *Inmunología*, 7 Ed. McGraw Hill. 2014; ISBN: 9786071511263.
66. Scott, E. N., H. G. Muchmore, and D. P. Fine. Activation of the alternative complement pathway by *Sporothrix schenckii*. *Infect. Immun.* 1986; 51:6–9.
67. Torinuki, W., and H. Tagami. Complement activation by *Sporothrix schenckii*. *Arch. Dermatol. Res.* 1985; 277:332–333.
68. Tachibana, T., T. Matsuyama, and M. Mitsuyama. Involvement of CD4 T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. *Med. Mycol.* 1999; 37:397–404.

69. Fernandez, K. S. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix schenckii*. *Immunology* 2008; 123:469–479.
70. Carlos, I. Z. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia* 1994; 127:189–194.
71. Maia, D. C., M. F. Sassá, M. C. Placeres, and I. Z. Carlos. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* 2006; 161:11–19.
72. Carlos, I. Z., M. F. Sassá, D. B. da Graca Sgarbi, M. C. Placeres, and D. C. Maia. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*, 2009; 168:1–10.
73. Bastos de Lima B. M., de Almeida P. R., Oliveira S. O., *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2011; 24(4):633.
74. Figueiredo C. C , De Lima O. C. , De Carvalho L. , López B. L. M , Morandi V. The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. *Microbial Pathogenesis*. 2004, 36(4):177-188.
75. Amado S., Bonifaz A., Clasificación de la esporotricosis. Una propuesta con base en el comportamiento inmunológico. *Dermatología Rev Mex* 2011; 55(4):200-208.
76. Louis Y. A., Chai S., Mihai G. N., Alieke G. V., & Bart J., Kullberg. Fungal strategies for overcoming host innate immune response. *Medical Mycology* May 2009; 47(3):227-36.
77. Muñoz D. A. R., Castrejón J. N. S., Baltierra U. S. L., Rangel P. S. J., Carapia M. N., Castañeda S. J. I., Luna H. J., López S. R., Rodríguez T. A. V., Garcia P. B. E. *Candida glabrata* survives and replicates in human osteoblasts. *Pathogens and Disease*, 74, 2016.

ANEXOS



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Departamento de Sistemas Biológicos



Otorga la presente

CONSTANCIA

A: Araceli Paredes-Rojas, Alejandro Palma-Ramos,
Laura Estela Castrillón-Rivera, Silvia Alvarado-Hernández,
Jorge Ismael Castañeda-Sánchez.

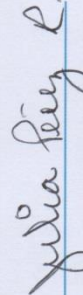
Por su Participación como Ponente con el tema:


“Respuesta inmune innata de queratinocitos humanos infectados
con *Sporothrix schenckii*”

“XIX Simposium de Micología”

Realizado los días 5 y 6 de noviembre de 2015
en la Unidad Xochimilco


Mtro. Rafael Díaz García
Director de la División CBS


Dra. Julia Pérez Ramos
Jefa del Departamento
de Sistemas Biológicos


M. en C. Alejandro Palma Ramos
Presidente del Comité organizador

La Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Otorgan la presente

A: **QFB. Araceli Paredes Rojas**

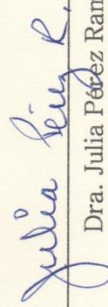
Maestría en Ciencias Farmacéuticas

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos



Dr. Martín Gómez Hernández
Coordinador de la
Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Por haber impartido el seminario de actualización: "Estudio in vitro de la respuesta inmunológica en la esporotricosis cutánea" celebrado el día 24 de febrero de 2016, dentro del Ciclo de Seminarios del trimestre 16-Invierno de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas.



Dra. Julia Pérez Ramos
Jefa del Depto. de Sistemas Biológicos

Artículo publicado:

ARTÍCULO ORIGINAL
Dermatol Rev Mex 2015;59:280-287.

Dermatología
REVISTA MEXICANA

Lactoferrina en 11 pacientes diagnosticados con esporotricosis cutánea

Alejandro Palma-Ramos¹
Laura E Castrillón-Rivera¹
Silvia Elena Fernández-López¹
Araceli Paredes-Rojas²
Jorge Ismael Castañeda-Sánchez¹
María del Carmen Padilla-Desgarennes²
María Elisa Vega-Memije³
Roberto Arenas-Guzmán⁴

¹Laboratorio de Inmuno potenciadores, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

²Laboratorio de Micología, Centro Dermatológico Dr. Ladislao de la Pascua, Secretaría de Salud, México, DF.

³Servicio de Dermatología.

⁴Servicio de Micología.

Hospital General Dr. Manuel Gea González, Secretaría de Salud, México, DF.

RESUMEN

Antecedentes: la esporotricosis es una infección fúngica crónica causada por el complejo *Sporothrix schenckii*, se distingue por granulomas epitelioides, tuberculoideos o de cuerpo extraño, formados por histiocitos que rodean un área central de neutrófilos que contribuyen en el sistema de inmunidad inespecífica. En los polimorfonucleares neutrófilos se encuentra la lactoferrina que ejerce una acción protectora contra hongos y levaduras; el efecto antifúngico se atribuye a su capacidad de secuestrar un átomo de Fe³⁺ o Fe²⁺, y también puede unirse a iones Cu²⁺, Zn²⁺ y Mn²⁺. Existe evidencia de que la lactoferrina aumenta la actividad fagocítica de los neutrófilos sanguíneos, la actividad de las células NK, el número de células progenitoras de neutrófilos en la sangre y la producción de interferón gamma, es capaz de mostrar actividad antimicrobiana en un amplio espectro de agentes patógenos, entre los que se incluyen bacterias, levaduras, hongos, protozoarios y virus.

Objetivo: demostrar la existencia de lactoferrina sobre las levaduras de *Sporothrix* sp. presentes en los cortes histológicos de pacientes con esporotricosis cutánea.

Material y método: estudio retrospectivo en el que se usaron 11 biopsias de pacientes con diagnóstico de esporotricosis cutánea, atendidos en el Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua y el Hospital General Dr. Manuel Gea González. Se realizaron dos cortes por biopsia, uno para la realización de la técnica de PAS y el otro para el marcaje de lactoferrina. Se utilizó el paquete comercial Cell and Tissue Staining Kit, Goat Kit HRP-AEC System (catálogo número CT5009) R&D Systems, y el anticuerpo primario fue el IgG policlonal anti-lactoferrina humana hecho en cabra por los laboratorios Santa Cruz Biotechnology.

Resultados: encontramos lactoferrina adherida a las levaduras de *Sporothrix* sp. previamente observadas por la reacción de PAS en los cortes estudiados de los 11 pacientes diagnosticados con esporotricosis.

Conclusión: la lactoferrina presente en los gránulos específicos de los neutrófilos polimorfonucleares la encontramos adherida a las levaduras del complejo *Sporothrix schenckii*, ejerciendo la función de secuestro de iones Fe²⁺ y Fe³⁺, tratando de evitar el desarrollo y la proliferación de este hongo en la esporotricosis cutánea.

Palabras clave: *Sporothrix schenckii*, esporotricosis cutánea, lactoferrina.

Recibido: 13 de enero 2015

Aceptado: 29 de abril 2015

Correspondencia: Alejandro Palma Ramos
Departamento de Sistemas Biológicos
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Calle del Hueso 1100
04960 México, DF
alpalma@correo.xoc.usm.mx

Este artículo debe citarse como

Palma-Ramos A, Castrillón-Rivera LE, Fernández-López SE, Paredes-Rojas A y col. Lactoferrina en 11 pacientes diagnosticados con esporotricosis cutáneas. Dermatol Rev Mex 2015;59:280-287.

Artículo aceptado:

Dermatología

Revista mexicana

ISSN-0185-4038

México D.F. a 25 de Noviembre de 2015


Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez.
Departamento de Sistemas Biológicos,
UAM, Unidad Xochimilco
Presente

Estimados Dr. Castañeda:

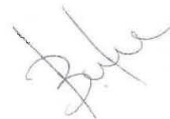
Por medio de la presente queremos comunicarles que su trabajo original enviado a *Dermatología Revista Mexicana*, **APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA LA OBSERVACIÓN DE LEVADURAS EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON ESPOROTRICOSIS CUTÁNEA CON EL USO DE ANTICUERPOS ANTI-LEVADURAS Y ANTI-ESPORAS**, ha sido aceptado para su publicación y quedado programado tentativamente para que se publique en el Volumen 60, número 3 ó 4, del 2016.

Agradecemos de antemano el sometimiento de su trabajo a nuestra revista y esperamos en un futuro nuevas colaboraciones.
Sin más por el momento le enviamos nuestro saludo

Atentamente



Clemente Moreno Collado



Alexandro Bonifaz

Editores

Academia Mexicana de Dermatología

AB/smp