



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

Infección experimental con *C. carrionii* en ratones Balb/c

PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO

Evaluación de productos relacionados con la salud

ALUMNO: Miguel Martínez Mendoza

MATRÍCULA: 98350693

ASESORES: M. en C. Alejandro Palma Ramos

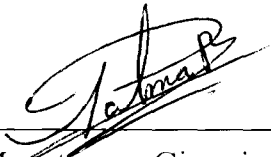
Dra. Laura Estela Castrillón Rivera

LUGAR DE REALIZACIÓN: Instalaciones de la planta piloto de la UAM-X

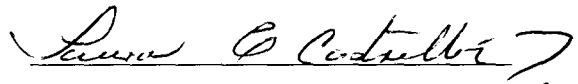
FECHAS DE INICIO Y TERMINACIÓN: Del 15 de Diciembre de 2003, al 29 de
Noviembre de 2004.

Enero, 2005.

Vo. Bo. DE LOS ASESORES



Maestro en Ciencias
Alejandro Palma Ramos



Doctora
Laura Estela Castrillón Rivera

Enero, 2005.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
<i>Introducción</i>	<i>1</i>
<i>Marco teórico</i>	<i>2</i>
<i>Objetivo general</i>	<i>9</i>
<i>Objetivos particulares</i>	<i>9</i>
<i>Desarrollo experimental</i>	<i>9</i>
<i>Resultados</i>	<i>15</i>
<i>Discusión</i>	<i>19</i>
<i>Objetivos y metas alcanzadas</i>	<i>22</i>
<i>Conclusiones</i>	<i>23</i>
<i>Referencias bibliográficas</i>	<i>24</i>

INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Cladosporium carrionii* EN RATONES Balb/c.

Introducción.

La cromomicosis es una afección micótica crónica de naturaleza granulomatosa con preferencia por los miembros inferiores, aunque también puede aparecer en los miembros superiores, glúteos, cara, abdomen, etc.^{1,6,10.}

La cromomicosis es considerada como la más superficial de las micosis profundas, ataca todas las capas de la piel sin llegar al plano muscular, aunque se han descrito casos con localización profunda y otros con afectaciones sistémicas.^{4,11,12.}

Se describió por primera vez en Brasil (1911), pero también es muy frecuente en otros países tropicales y subtropicales, como Venezuela, Australia, Madagascar, Sudáfrica y México.^{1,6}

Se plantea que la cromomicosis se presenta casi exclusivamente en hombres, frecuentemente en los trabajadores agrícolas (por razones ocupacionales), por lo que se deduce que la penetración del hongo se produce a través de heridas o traumatismos cutáneos recibidos con material contaminado con tierra, maderas o plantas, sitio donde de forma saprófita vive este hongo.^{1,6}

Se mencionan con más frecuencia en los casos de cromomicosis los siguientes por orden de incidencia: *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea pedrosi*, ***Cladosporium carrionii***, *Fonsecaea compactum*, y otros con menor frecuencia *Wangiella dermatitidis*, *Rinocladiella aquaspersa* y *Cladophialophora ajelloi*. Estos hongos se caracterizan por la producción de esporas que son diseminadas por el viento y entonces llegan a los reservorios antes mencionados. Las esporas son resistentes a los cambios de temperatura, humedad, calor y desecación y su periodo de incubación es muy variado aún entre una misma especie.⁶

C. carrionii está entre los más reportados en las cromomicosis,^{1-6,8-12} es por ésta razón que se pretende infectar a ratones Balb/c hembras con este hongo, para tener en cuenta la magnitud y evolución de la lesión practicando análisis histológicos de la misma. Ya que este hongo fue aislado de un paciente del hospital general de la Ciudad de México.

La relevancia del trabajo que se pretende realizar radica en que en México muchos de los trabajadores agrícolas no tienen el equipo (botas en lugar de huaraches) o las herramientas necesaria para realizar sus labores, por lo que están expuestos a traumatismos e infecciones con este tipo de microorganismos. Ya que este tipo de lesiones son de lenta evolución pero de gran daño para el miembro infectado.⁶

Marco teórico.

Antecedentes históricos.

Antes que en seres humanos, Carini en 1910, describió el parásito en los pulmones y riñones de una rana en Brasil. En 1911 en Sao Paulo, Pedroso observó el primer caso en seres humanos y le llamó blastomicosis negra. En 1912, Brump tomó muestras del paciente anterior para su estudio. En 1914, Rudolph, sin describir el origen fúngico informó un caso en Minas Gerais, Brasil, con el nombre de "figueira". Sin embargo, hasta 1920, Pedroso y Gomes publicaron el caso del enfermo original junto con tres casos más y en 1922, Brump en su "Précis de parasitologie" llamó al microorganismo causal *Hormodendrum pedrosoi*. En 1915, Lane y Medlar, en Boston hicieron realmente las primeras publicaciones; se trataba de un individuo de Nueva Inglaterra, que presentaba lesiones verrugosas en un pie y trabajaba como estibador en barcos procedentes de Brasil. Thaxter denominó *Phialophora verrucosa* al hongo aislado. Medlar llamó a los elementos parasitarios "sclerotic cells" por su consistencia dura, y por una deformación terminológica, se conocieron después como esclerotes. En 1922, Terra, Torres, Fonseca y Arêa Leão acuñaron el término cromoblastomicosis. En 1927, Montpellier y Catanei estudiaron en Algeria un paciente con metástasis y designaron al hongo *Hormodendrum algeriensis*. En 1932, Langeron denominó a los elementos parasitarios, células fumagoides. En 1933, Wilson, Holse y colaboradores, en Texas informaron el segundo caso en Estado Unidos. En 1935, Moore y Almeida propusieron el término cromomicosis, porque el prefijo "blasto" significa gemación; Ajello consideró conveniente restituir el término cromoblastomicosis para referirse a la dermatitis verrugosa ocasionada por hongos negros. En 1936, Carrión, de Puerto Rico, describió *H. compactum*; en ese mismo año Negróni estudió el primer caso en Argentina y propuso el género *Fonsecaea* para incluir a *Hormodendrum* y *Acrotheca*. En 1937, Conant demostró que *Phialophora verrucosa* era lo mismo que *Cladophora americana*. En 1954, Sonck encontró la enfermedad en Finlandia, en personas que frecuentaban baños sauna y en sujetos con cicatrices por aplicación de diversos instrumentos y sanguijuelas. En 1946, Simson aisló *F. Pedrosoi* var *cladosporium* y en 1954, Trejos le denominó *Cladosporium carrionii*.¹

En 1940, Martínez Báez, mediante estudios histopatológicos hizo la primera observación en México en un individuo de Zacatecas. En 1941, González Ochoa identificó al hongo como *F. Pedrosoi* var *cladosporioides*. En 1944, Latapí informó el segundo caso en un paciente de Sinaloa. En 1963, Lavalle hizo una excelente revisión de la enfermedad al escribir el capítulo cromomicosis en la obra de Jadassohn, publicada en Alemania. En 1970, González Ochoa comunicó la curación de cromomicosis con dosis altas de 5-fluorocitosina. En 1978, Lara, bajo la tutela de González Ochoa, recopiló 95 casos en México, y en 1980, Lavalle refirió 126 casos confirmados en el país.⁹

Datos epidemiológicos.

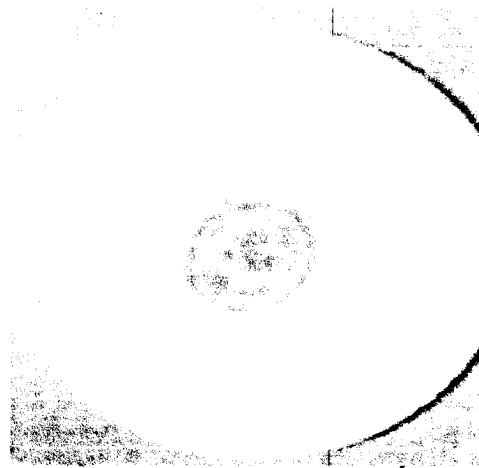
Las infecciones causantes de cromomicosis son frecuentes en climas tropicales y subtropicales (80 % de los casos reportados a nivel mundial). México ocupa el tercer lugar mundial entre las micosis profundas con el 6 %.^{5,9}

La cromomicosis se observa en cualquier raza y afecta preferentemente a adultos entre 30 y 60 años de edad³ (67 %). Predomina en varones⁴ (91 %), es rara en mujeres (9 %) o en menores de 15 años de edad. Este tipo de infección no se transmite de una persona a otra.¹

Etiopatogenia.

La clasificación y nomenclatura de los hongos ha sido cambiante y controvertida; todavía no hay acuerdo unánime en la taxonomía.

Los agentes causales son Hyphomycetes de la familia Dematiaceae que viven como saprofitos del suelo y vegetales; incluso se han aislado de madera transportada a otros sitios diferentes a su lugar de origen y en baños sauna. Estos son hongos negros, termosensibles a 40-42 °C. Es probable que predisponga la desnutrición y proteja el estado hormonal, ya que las infecciones son más frecuentes en personas de nivel socioeconómico bajo y muy rara en mujeres.^{1,16}



Fotografía de *Cladosporium*.⁵

El microorganismo penetra a través de un traumatismo cutáneo, se desarrolla localmente, se extiende por contigüidad y rara vez por vía linfática o hematógena.¹⁰ Estos hongos se comportan como dimorfos y en su fase parasitaria se manifiestan como células fumagoides, que es un estado intermedio entre hifas y levaduras, pues dichas células se multiplican por división directa y emiten filamentos. Este dimorfismo parece depender de la resistencia relativa del huésped.¹⁰



Células fumagoides e hifa.¹⁰



Examen directo de células fumagoides.⁵

Se ha observado cromomicosis en sujetos bajo inmunosupresión con glucocorticoides y azatioprina por trasplante de órganos.^{1,4,13}

Clasificación.

- Cutánea { Verrugosa o vegetante
Tumoral
Psoriasiforme o en placa
- Cerebral { Cicatrizal
Elefantíasis

Cuadro clínico.

Se desconoce el tiempo exacto de incubación; seguramente dura meses e incluso años.¹⁰ La dermatosis suele ser unilateral y asimétrica; afecta extremidades inferiores principalmente (80 %), sobre todo el pie, en ocasiones se presenta también en otras áreas expuestas como manos, antebrazos y brazos (18%); y rara vez es diseminada (2 %), se han observado casos localizados en tórax, abdomen, nalgas e incluso cabeza.^{2,10}



Cromomicosis diseminada: topografía y morfología. Cabeza y cuero cabelludo.¹⁰



Tronco anterior de tórax y abdomen.¹⁰



Tronco y miembro superior izquierdo.¹⁰

La lesión inicial es un pápula o nódulo eritematoso no pruriginoso, que se extiende lentamente a los tejidos vecinos y aparecen nuevas lesiones en meses o años. Con el tiempo se observan nódulos eritematosos o del color de la piel, placas verrugosas con descamación intensa o lesiones vegetantes y húmedas. El tamaño varía desde algunos milímetros hasta varios centímetros o puede afectar a todo un segmento. Los borde son activos y puede haber atrofia central, entonces la piel se torna acrómica con aspecto de “papel de cigarrillo”. A veces las lesiones son muy superficiales, con aspecto de placas de psoriasis, pueden ser crateriformes o tener forma de coliflor, con aspecto tumoral. Cuando se ulceran y presentan infección agregada hay linfostasis consecutiva a fibrosis y después, elephantiasis; este aspecto se engloba dentro del pie musgoso (“moosy foot”). No afecta músculos ni huesos, excepcionalmente hay periostitis y en algunas ocasiones se han observado lesiones en las uñas, por contigüidad. Es rara la diseminación hematógica y linfática (fotografías anteriores).^{1,10,11,12}



fotografía de infección con *C. carrionii* en Brazo. www.mja.com.au/public/issues/173_11_041200/crowe/crowe.html#text1

La evolución es crónica, lentamente progresiva y asintomática. En la mayoría de los casos no se atiende adecuadamente la infección o se atiende tardíamente (entre 1 y 5 años después del inicio de la infección), aunque hay casos de hasta más de 20 años de evolución.¹⁰

Estudio micológico.

En el examen directo, los elementos parasitarios deben buscarse en pus, fragmentos de tejidos y sobre todo en las escamas que presentan "puntos negros" que corresponden a pequeños depósitos de sangre. Se utiliza hidróxido de potasio al 10-40 %, para que haya disociación de la capa córnea se calienta un poco la laminilla o se esperan unos minutos antes de la observación. Se observan células fumagoides (esclerotes de Medlar) en grupos de dos o más, las cuales son esféricas u ovaladas, miden de 4 a 8 μm de diámetro, son de color café amarillento, presentan membrana gruesa y en ocasiones se observan divisiones o filamentos; se comparan a granos de café o monedas de cobre.^{1,14}



Células fumagoides (granos de café).⁸

Los cultivos se realizan en los medios habituales como Sabouraud simple o con antibióticos (cloranfenicol y Actidione), crecen más rápido en agar papa y fructifican mejor en agar harina de maíz ("corn meal"), se desarrollan a temperatura ambiente o a 37 °C. El crecimiento es lento, en 7 a 12 días se observan colonias de superficie vellosa o algodonosa, de color negro o ligeramente gris verdoso, verde oscuro o café.^{1,5}

Cladosporium u *Hormodendrum*, está dado por conidióforos cortos y pigmentados, con formación acropétala de conidios, esto es, solo es terminal, y cada conidio produce al subsecuente por gemación, de manera que forman cadenas; si se separan se observa una pequeña cicatriz u órgano disyuntor. Las cadenas pueden ser cortas, de 3 a 4 esporas y son muy ramificadas, o pueden ser cadenas largas, hasta de 35 conidios, poco ramificados y con conidios elípticos de tamaño constante.¹



Fotografía de esporas *C. carrionii* www.doctorfungus.org/thefungi/Cladophiala.htm

En epidermis se observa hiperqueratosis con paraqueratosis, acantosis notoria, hiperplasia pseudoepiteliomatosa y en ocasiones abscesos intraepidérmicos. En dermis media y superficial se encuentra infiltrado inflamatorio con polimorfonucleares, histiocitos, células plasmáticas y casi siempre un granuloma tuberculoide con células gigantes de tipo Langhans. En dermis o epidermis se pueden encontrar células fumagoides de 4 a 8 μm de diámetro; su pigmentación café permite observarlas con facilidad, por ello no se requieren tinciones especiales.^{1,14}



Se señalan dos esporas de *C. carrionii* y *microabscesos*. www.mja.com.au/public/issues/173_11_041200/crowe/crowe.html#text1

Complicaciones.

Una infección bacteriana oportunista, o en casos crónicos puede originarse linfostasis verrugosa y degeneración a carcinoma epidermoide. La extensión de la infección en algunos pacientes causa minusvalidez funcional. Puede requerirse amputación. Por diseminación hematogena se pueden originar abscesos cerebrales.^{1,4}

Tratamiento.

En lesiones pequeñas, la medida más adecuada es la extirpación quirúrgica, o puede practicarse la electrodesecación, crioterapia con nitrógeno líquido, criocirugía, o radioterapia, solas o combinadas. También se puede utilizar tratamiento médico y quirúrgico a la vez.^{4,5}

El itraconazol en dosis de 200 mg una o dos veces al día por vía oral, durante cuatro a ocho meses ha resultado ser eficaz en casos de cromomycosis por *C. carrionii* ; se ha utilizado con excelentes resultados en dosis de 300 mg al día. Si bien no se conoce con exactitud el tiempo de tratamiento, se recomienda el triple del tiempo necesario para obtener la negatividad clínica y micológica. Hasta ahora no se conocen efectos indeseables importantes. También se combina con 5-fluorocitosina, calciferol o calor.^{3,5,10}

Es útil el miconazol en dosis de 200-400 mg al día por vía intravenosa, pero tiene importantes efectos colaterales gastrointestinales y es hepatotóxico.¹

Se ha utilizado anfotericina B por vía intravenosa, intraarterial, intralesional y tópica; dado que es nefrotóxica y hepatotóxica, debe vigilarse en nitrógeno ureico y la creatinina, así como las transaminasas séricas. Para la aplicación local se recomienda una solución con 30 mg por ml, tres veces al día; si se inyecta por vía intralesional, se puede aplicar en una solución de procaína al 2 % una vez por semana durante cinco meses. Si se administra por vía intravenosa, la dosis se incrementará de 0.1 a 0.25 mg por kg al día y se sostendrá una dosis de mantenimiento. Por vía intraarterial (femoral) es eficaz en dosis crecientes de 5 a 50 mg según la tolerancia individual; es difícil de administrar y tiene riesgo de ocasionar necrosis distal. Es sinérgica la administración de anfotericina B con 5-fluorocitosina. Se inyectan por vía intravenosa 50 mg de anfotericina B en días alternos con 80 a 100 mg por kg de peso de 5-fluorocitosina diariamente. Este último es de los mejores fármacos aunque puede haber resistencia; para combinaciones se recomiendan 100 a 150 mg/kg de peso corporal al día dividido en cuatro dosis, durante seis a doce meses. Se presenta en tabletas de 500 mg, por lo que se administran un promedio de 20 tabletas al día, lo que puede originar falta de apego al tratamiento, pues el paciente se niega a ingerir dicho número de tabletas durante varios meses, por otra parte no siempre se encuentra disponible. En general es un medicamento seguro; se recomiendan periódicamente examen general de orina, química sanguínea y pruebas de funcionamiento hepático.¹

La isoniacida tiene cierta eficacia. Algunos pacientes mejoran con vitamina D (calciferol), en dosis de 600 000 U por vía oral o intramuscular, una o dos veces por semana durante cuatro a seis meses, después cada dos semanas otros seis meses.^{5,10}

Con tiabendazol se han observado buenos resultados en dos a tres meses en dosis de 25 mg/kg o hasta 2 gramos al día por vía oral durante seis meses a dos años. Dosis de más de 2 gramos diarios producen efectos colaterales como anorexia, náuseas y cefalea. La iontoforesis con sulfato de cobre al 1 % se ha utilizado también, además de la aplicación local de dimetilsulfóxido y de calor con agua, compresas o con bolsas especiales ("pocket warmers") por lo menos durante seis meses.¹

Cede parcialmente con yoduro de potasio en dosis de 1 a 9 g al día, durante varios meses a más de un año.¹⁰

Objetivo general.

“Inducir cromomicosis con *C. carrionii* en el cojinete plantar de los ratones Balb/c hembra”

Objetivos particulares.

1. Inducción de cromomicosis con *C. carrionii* en el cojinete plantar de ratones Balb/c hembra, inmunosuprimidos.
2. Inducción de cromomicosis con *C. carrionii* en el cojinete plantar de ratones Balb/c hembra, sin inmunosuprimir.

Desarrollo experimental.

Cultivo y preparación de la muestra para la 1ª Inoculación.

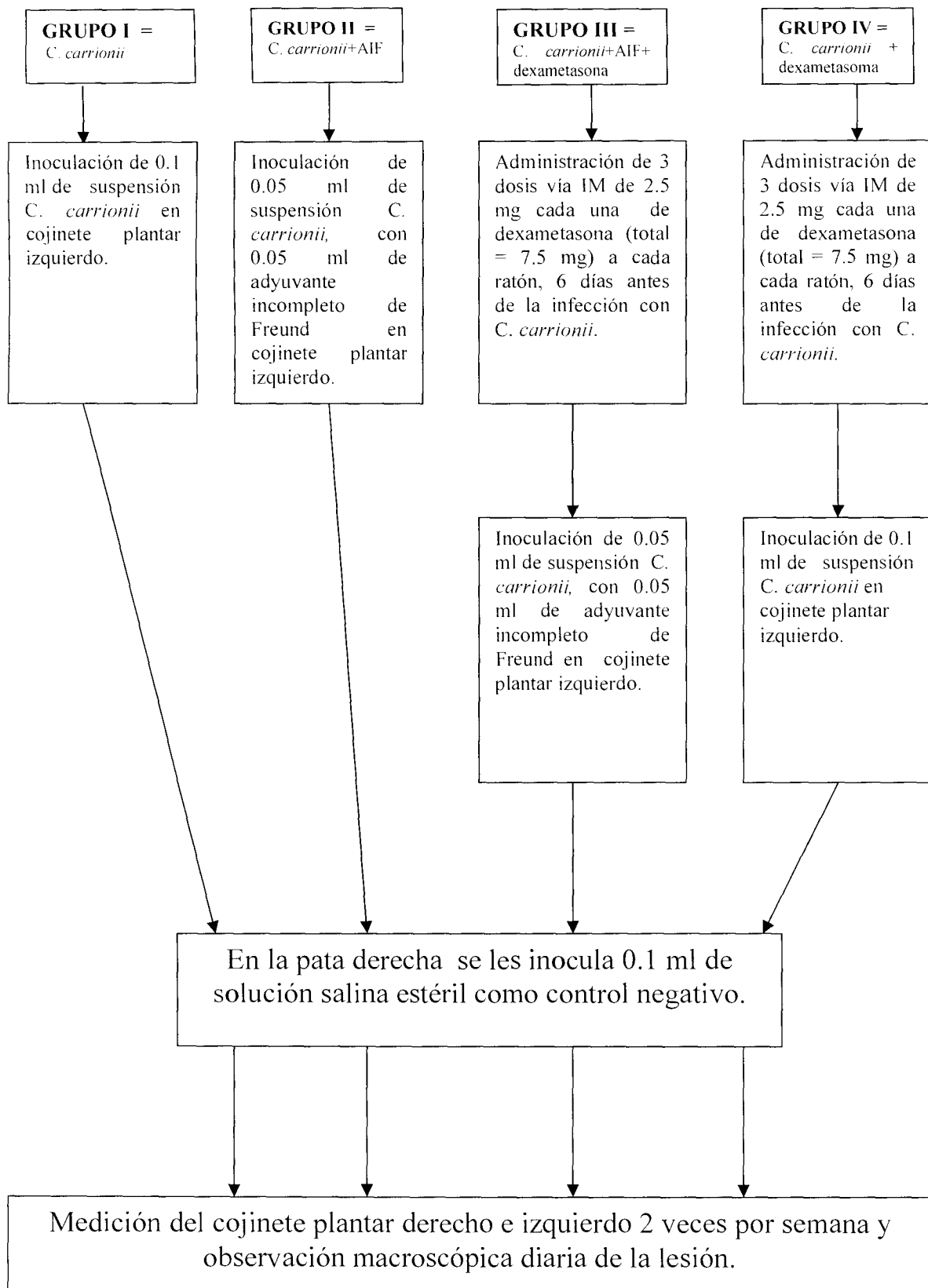
- Crecer en agar de dextrosa Sabouraud el hongo *Cladosporium carrionii*, se realizan siembras en 3 tubos que se mantuvieron por 2 semanas a temperatura ambiente.
- De la siembra anterior se toman varias colonias y se traspasa a un tubo con solución salina y perlas de vidrio, todo esto en condiciones de esterilidad.
- El tubo anterior se agita vigorosamente hasta alcanzar una suspensión homogénea. Esta se ajusta al tubo # 3 de Mc. Farland que corresponde a 900×10^6 UFC/ml, misma que es utilizada para la inoculación de los ratones Balb/c hembra.

1ª Inoculación.

- Para la 1ª inoculación se utilizaron 13 ratones Balb/c hembra de 20 g cada uno aproximadamente los cuales fueron divididos en 4 grupos como se describe a continuación.¹⁷
 - Grupo I: (4 ratones). A 3 de ellos se les inocula en el cojinete plantar izquierdo 0.1 ml. de la suspensión de *C. carrionii*, en la pata derecha se les inocula solución salina estéril solamente. Al ratón 4 se le mantiene como testigo, inoculándole solución salina estéril en la pata izquierda solamente.
 - Grupo II: (3 ratones). Se les inocula en el cojinete plantar izquierdo 0.1 ml de la suspensión de *C. carrionii* (0.05 ml) con adyuvante incompleto de Freund (0.05 ml) en proporción 1:1, y en la pata derecha se les inocula solución salina estéril solamente.
 - Grupo III: (3 ratones). Se les administran 3 dosis de 2.5 mg cada una de dexametasona 6 días antes de la inoculación con *C. carrionii*.¹³ Posteriormente se les inocula en el cojinete plantar izquierdo 0.1 ml de suspensión de *C. carrionii* (0.05 ml) con adyuvante incompleto de Freund (0.05 ml) en proporción 1:1, en la pata derecha se les inocula solución salina estéril solamente.
 - Grupo IV: (3 ratones). Se les administran 3 dosis de 2.5 mg cada una de dexametasona 6 días antes de la inoculación con *C. carrionii*.¹³ Posteriormente se les inocula en el cojinete plantar izquierdo 0.1 ml de suspensión de *C. carrionii*, en la pata derecha se les inocula solución salina estéril solamente.

La dexametasona fue utilizada como inmunosupresor, ya que se les inoculó a los ratones Balb/c en concentraciones 25 veces mayor que la terapéutica.^{7,13}

Diagrama de flujo 1ª inoculación.



Cultivo y preparación de la muestra para la 2ª Inoculación.

- Crecer en un tubo con agar de dextrosa Sabouraud el hongo *Cladosporium carrionii* y mantenerlo por 2 semanas a temperatura ambiente.
- De la siembra anterior se toma una colonia y se traspasa a un matraz Erlenmeyer con caldo de dextrosa Sabouraud y se mantiene por una semana a 32 °C para su óptimo crecimiento.
- Transcurrido este tiempo, la biomasa del matraz es filtrada y desecada a 32 °C durante 24 horas, todo esto en condiciones de esterilidad.
- Una vez obtenido el hongo seco, se procede a pesar en la balanza analítica un miligramo de *C. carrionii* para preparar una suspensión con un mililitro adyuvante incompleto de Freund (concentración = 1mg/ml). Esta suspensión es la que se utiliza para la segunda inoculación.

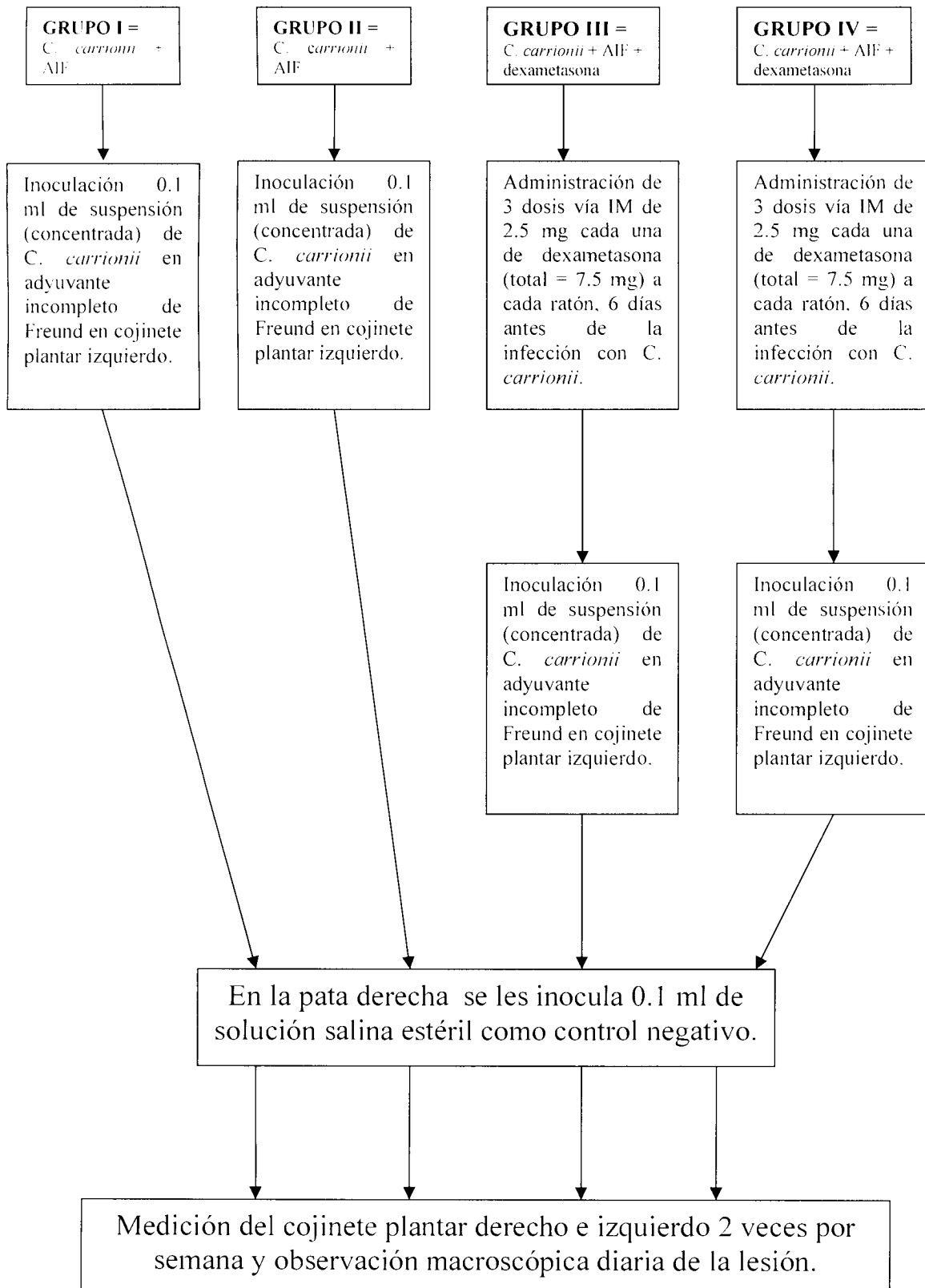
2ª Inoculación.

Para la 2ª inoculación se utilizaron los mismos 13 ratones Balb/c hembra de la 1ª inoculación, los cuales fueron divididos en 4 grupos como se describe a continuación.¹⁷

- Grupo I: (4 ratones). A 3 de ellos se les inocula en el cojinete plantar izquierdo 0.1 ml de suspensión de *C. carrionii* con adyuvante incompleto de Freund en la pata derecha se les inocula solución salina estéril solamente. Al ratón 4 se le mantiene como testigo, inoculándole solución salina estéril en la pata izquierda solamente.
- Grupo II: (3 ratones). Se les inocula en el cojinete plantar izquierdo 0.1 ml de suspensión *C. carrionii* con adyuvante incompleto de Freund, en la pata derecha se les inocula solución salina estéril solamente.
- Grupo III: (3 ratones). A este lote se les administran 3 dosis de 2.5 mg cada una de dexametasona 6 días antes de la inoculación con suspensión de *C. carrionii*.¹³ Posteriormente se les inocula en el cojinete plantar izquierdo 0.1 ml de suspensión de *C. carrionii* con adyuvante incompleto de Freund, en la pata derecha se les inocula solución salina estéril solamente.
- Grupo IV: (3 ratones). Se les administran 3 dosis de 2.5 mg cada una de dexametasona 6 días antes de la inoculación con suspensión de *C. carrionii*.¹³ Posteriormente se les inocula en el cojinete plantar izquierdo 0.1 ml de suspensión de *C. carrionii* con adyuvante incompleto de Freund, en la pata derecha se les inocula solución salina estéril solamente.

La dexametasona fue utilizada como inmunosupresor, ya que se les inoculó a los ratones Balb/c en concentraciones 25 veces mayor que la terapéutica.^{7,13}

Diagrama de flujo 2^a inoculación.



Evaluación de la lesión.

- A cada lote se le determinara lo siguiente:

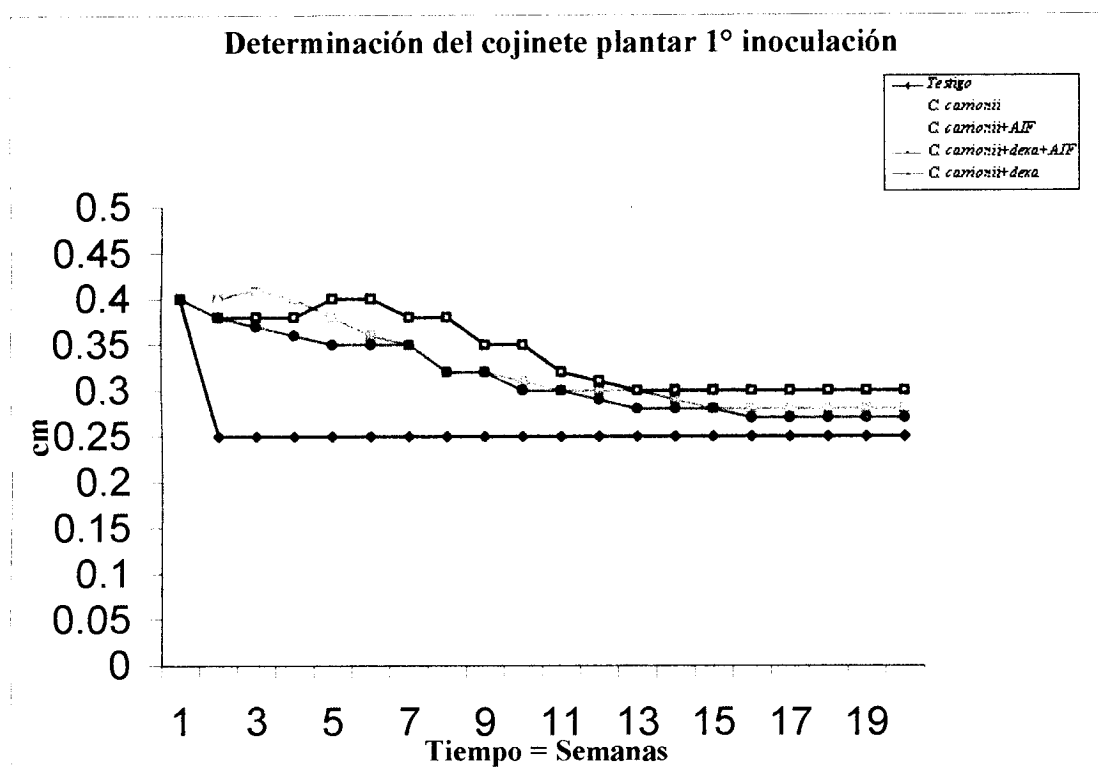
-Medición del cojinete plantar 2 veces por semana en la pata tratada y en la pata testigo, para el cálculo del índice del pulpejo.¹⁵

$$\frac{\text{Tamaño pata tratada}}{\text{Tamaño pata testigo}} = \text{Índice de pulpejo}$$

-Evaluación diaria del desarrollo de la lesión por apreciación macroscópica, reportándose los cambios evidentes en las patas de los ratones, tales como; descamación, cambio de color, etc.¹⁵

Resultados.

En la gráfica 1. Se puede observar la inflamación del cojinete plantar de los cuatro grupos de animales durante la primera inoculación. De los cuales, a dos de ellos se les administró la suspensión de *C. carrionii* con adyuvante incompleto de Freund, mismos que tuvieron una mayor inflamación en comparación con los que fueron inoculados con suspensión de *C. carrionii* solamente. Por otra parte, la inflamación del cojinete plantar del grupo que fue tratado con dexametasona e inoculado con suspensión de *C. carrionii* más adyuvante incompleto de Freund, fue ligeramente menor en comparación con el grupo inoculado con suspensión de *C. carrionii* más adyuvante incompleto de Freund sin inmunosupresor.

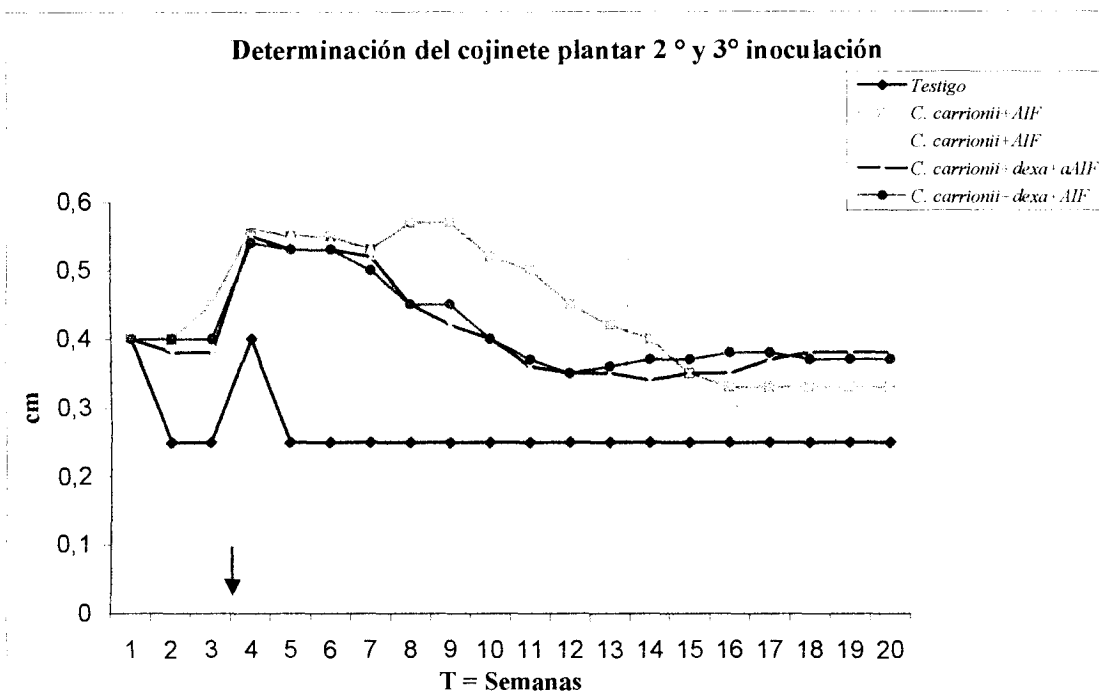


Gráfica 1 (primera inoculación). Dimensión del cojinete plantar del testigo (solución salina) y de los 4 grupos de ratones Balb/c inoculados con suspensión *C. carrionii*. Se puede observar claramente una mayor inflamación del cojinete plantar en los grupos de animales a los cuales se les inoculó solución de *C. carrionii* con adyuvante incompleto de Freund (AIF) que los inoculados con suspensión de *C. carrionii* solamente. Se hicieron registros semanales de la dimensión del cojinete plantar.

A finales de la primera semana de la primera inoculación, hubo descamación de las patas infectadas de los 4 grupos, solo que esta fue ligera y cedió casi por completo durante la segunda semana en los grupos sin inmunosuprimir. Mientras que en los grupos que fueron inmunosuprimidos cedió en la tercera semana.

En la gráfica 2. Se observa la dimensión del cojinete plantar de los animales durante la segunda y tercera inoculación. Se puede observar con claridad que los ratones tratados con dexametasona tuvieron un menor grado de inflamación durante las primeras 13

semanas que los que no fueron tratados con este inmunosupresor. Después de esta semana la dimensión del cojinete plantar de los grupos inmunosuprimidos fue aumentando gradualmente hasta el punto de ser mayor que la inflamación del cojinete plantar de los grupos sin inmunosuprimir. Por otra parte los dos grupos inmunosuprimidos tuvieron una inflamación semejante y los grupos sin inmunosuprimir se comportaron de manera similar entre ellos.

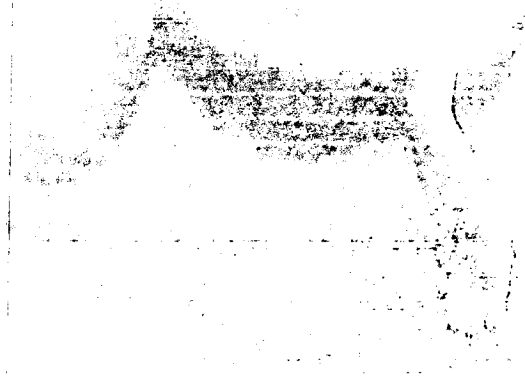
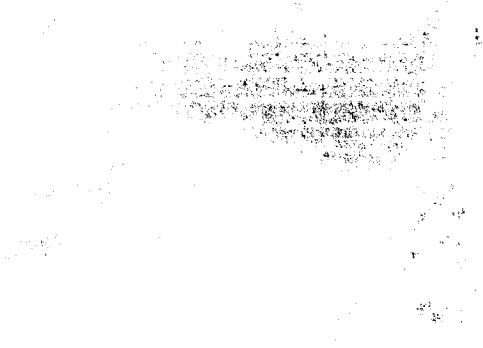


Gráfica 2 (segunda y tercera inoculación). Dimensión del cojinete plantar en ratones Balb/c inoculados con suspensión de *C. carrionii* mas adyuvante incompleto de Freund (AIF). Se preparó una suspensión de 1mg de *C. carrionii* (seco) en 1 ml de AIF y se les administró a los ratones vía cojinete plantar 0.1 ml de esta suspensión (se indica con una flecha el momento de la tercera inoculación), a dos de estos grupos se les administró dexametasona como inmunosupresor. Al testigo se le inculó 0.1 ml de solución salina estéril. Se hicieron registros semanales de la dimensión del cojinete plantar.

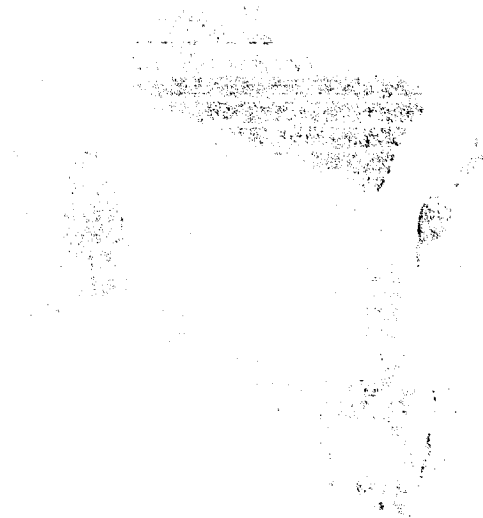
En los grupos tratados con dexametasona; durante la segunda semana se observó descamación severa que persistió hasta la cuarta semana, después de esta semana la descamación siguió hasta la sexta pero fue moderada. De la sexta semana a la 20 la descamación cedió significativamente, hasta el grado de no ser detectada sin la ayuda de una lupa.

Para los grupos que no fueron inmunosuprimidos la descamación fue ligera durante las primeras dos semanas, después de la tercera semana la descamación fue menor. En la quinta semana la descamación fue más intensa que durante las cuatro semanas anteriores, pero de la sexta semana a la vigésima la descamación disminuyó significativamente.

Se seleccionaron las fotografías más representativas de cada grupo de animales infectados con suspensión de *C. carrionii* más adyuvante incompleto de Freund para apreciar y comparar el grado de inflamación entre ellos. Todas las fotografías fueron tomadas en la semana 18 de la segunda inoculación.



Ratones tratados con dexametasona e infectados con *C. carrionii* más adyuvante incompleto de Freund. Fotografías tomadas en la semana 18 de la segunda inoculación.



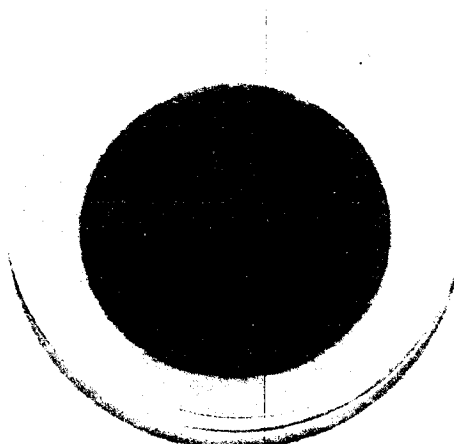
Ratones sin inmunosuprimir e infectados con *C. carrionii* más adyuvante incompleto de Freund. Fotografías tomadas en la semana 18 de la segunda inoculación.

A un ratón del grupo de los inmunosuprimidos más adyuvante incompleto de Freund se le detectó un gránulo que fue aumentando su tamaño desde la cuarta semana de la segunda inoculación hasta alcanzar un diámetro de aproximadamente 4 milímetros en la semana quince. Después de esta semana fue disminuyendo paulatinamente hasta desaparecer casi por completo en la semana 20.



Ratón Balb/c inmunosuprimido e inoculado con *C. carrionii* más adyuvante incompleto de Freund. Se señala con la flecha el gránulo detectado. Fotografía tomada en la semana 18 de la segunda inoculación.

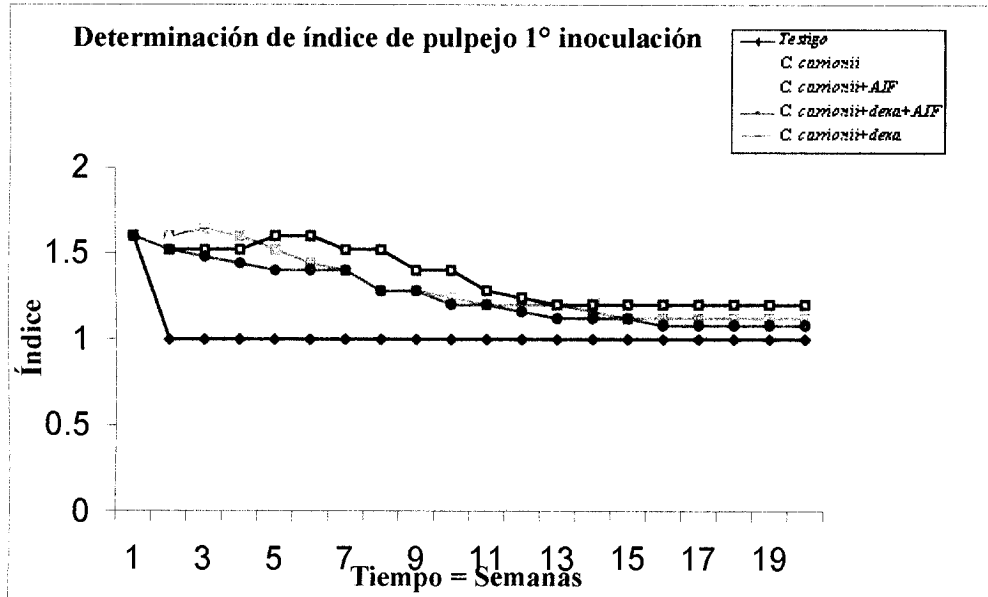
Se cultivó *C. carrionii* en agar de dextrosa Sabuoraud a partir de las cepas que nos fueron otorgadas por el Hospital General de México y se obtuvo una colonia negra aterciopelada como la descrita en la literatura.^{1-6, 9-12, 16}



C. carrionii en agar de dextrosa Sabuoraud, mantenido a 32 °C durante 7 días.

Discusión.

Los valores que se muestran en las gráficas 3 y 4, se obtuvieron de la comparación del grado de inflamación entre la pata infectada y la pata testigo de cada ratón. Dichos valores reflejan el “índice de inflamación real” de cada grupo de animales durante la primera, segunda y tercera inoculación respectivamente.

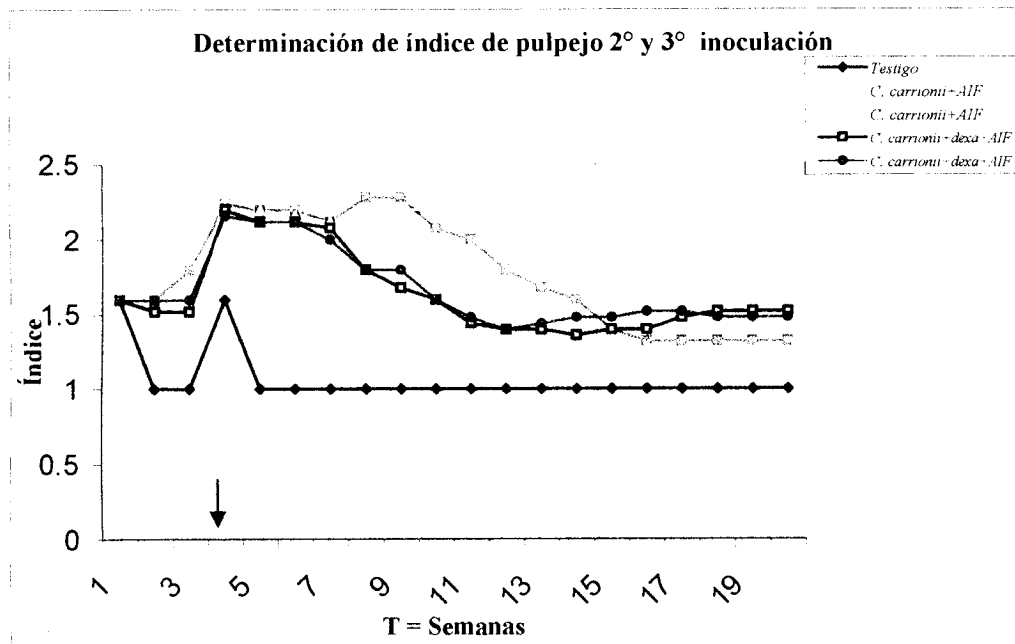


Gráfica 3. Muestra el índice de inflamación del cojinete plantar de cada grupo de animales. Los valores aquí mostrados están directamente relacionados con los de la gráfica 1. Ya que los valores de la gráfica 1 fueron divididos entre 0.25, que corresponde al tamaño en centímetros de la pata testigo (solución salina). De tal manera que lo presentado en esta gráfica son los “valores reales” de la inflamación del cojinete plantar de cada grupo de animales infectados con la suspensión de *C. carrionii*.

Durante la primera inoculación, se observó una mayor inflamación del cojinete plantar de los ratones a los cuales se les administró suspensión de *C. carrionii* con adyuvante incompleto de Freund en comparación con la inflamación del cojinete plantar de los ratones inoculados con suspensión de *C. carrionii* solamente, misma tendencia que se mantuvo paralela desde la primera semana hasta la semana 20 de la primera inoculación.

Por otra parte, hubo un menor índice de inflamación del cojinete plantar de los ratones tratados con dexametasona e inoculados con suspensión de *C. carrionii* más adyuvante incompleto de Freund (línea verde), que la inflamación del cojinete plantar de los ratones que no se les administró este inmunosupresor y fueron inoculados con suspensión de *C. carrionii* más adyuvante incompleto de Freund (línea amarilla).

De la misma manera, el índice inflamación del cojinete plantar de los ratones tratados con dexametasona e inoculados con suspensión de *C. carrionii* solamente (línea roja) fue menor en comparación con la inflamación del cojinete plantar de los ratones que no fueron tratados con dexametasona e inoculados con suspensión de *C. carrionii* solamente (línea fucsia). El mecanismo de acción antiinflamatoria de la dexametasona se explica más adelante.



Gráfica 4. Muestra el índice de inflamación del cojinete plantar de cada grupo de animales durante la segunda y tercera inoculación (señalada con una flecha). Los valores aquí mostrados están directamente relacionados con los de la gráfica 2. Ya que dichos valores fueron divididos entre 0.25, que corresponde al tamaño en centímetros de la pata testigo (solución salina). De tal manera que lo presentado en esta gráfica son los “valores reales” de la inflamación del cojinete plantar de cada grupo de animales infectados con la suspensión de *C. carrionii*.

Durante las primeras 13 semanas de la segunda inoculación; en los grupos tratados con dexametasona se tuvo un menor índice de inflamación del cojinete plantar de los ratones, comparado con el índice de inflamación de los ratones sin inmunosuprimir, esto se debe al efecto antiinflamatorio de la dexametasona que es un glucocorticoide 25 veces más potente que la hidrocortisona, y que al igual que los demás glucocorticoides, actúa a nivel celular ligándose a los receptores esteroides citoplásmicos intracelulares y ejerce su efecto antiinflamatorio a nivel de todos los tejidos, previniendo la respuesta tisular y la reacción en cascada del proceso inflamatorio por bloqueo en la producción de prostaglandinas y leucotrienos. Su concentración en los tejidos estabiliza las enzimas lisosomales y actúa manteniendo la integridad capilar y evitando la migración de complejos inmunes a través de las membranas del basamento. Su efecto sobre los distintos componentes celulares del proceso inflamatorio se ejerce alterando la función de los monocitos, macrófagos y linfocitos-T. Durante la reacción antígeno anticuerpo previene la reacción del macrófago y del mastocito a los factores de migración y de la granulación de este último; asimismo inhibe la fagocitosis y digestión del antígeno. La dexametasona Inhibe la producción de interleucinas 1 y 2, y el mediador de proliferación de linfocitos-T que normalmente se produce en la exposición de mitógenos. Estos efectos se consideran la base de su efecto antiinflamatorio y bloqueador de la respuesta inmune.⁷

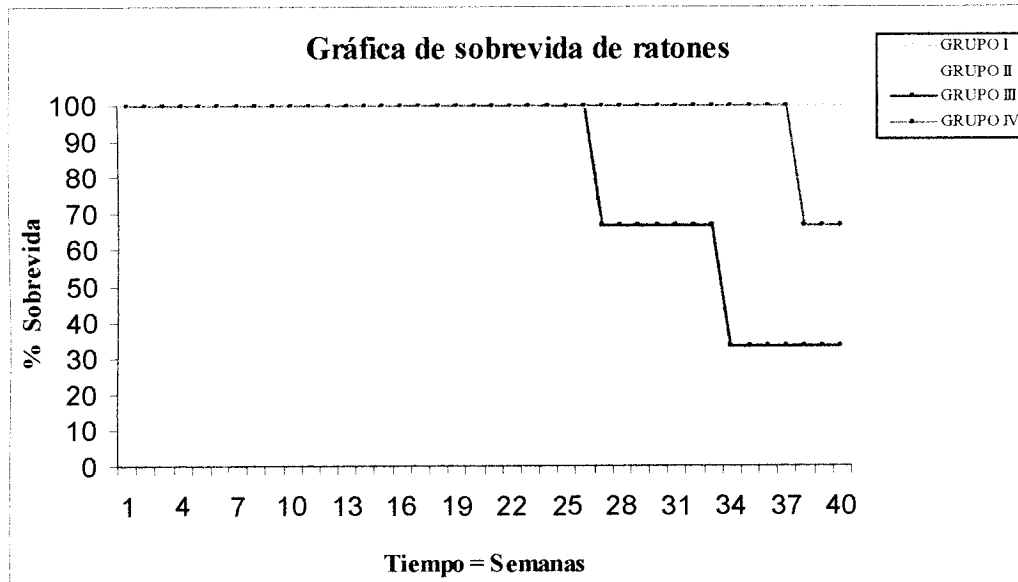
La inhibición de los procesos anteriormente descritos por efecto de los glucocorticoides a nivel celular disminuye las manifestaciones clínicas de los procesos patológicos inflamatorios y algunos de tipo inmunológico.

Los corticosteroides como la dexametasona, pueden exacerbar o enmascarar algunos signos de infección por virus, bacterias u hongos y durante su empleo pueden aparecer nuevas infecciones.⁷

Después de la semana 14 y hasta la semana 20 de la segunda inoculación, se registró un elevado índice de inflamación del cojinete plantar de los ratones inmunosuprimidos, inclusive es mayor, que el índice de inflamación del cojinete plantar de los ratones sin inmunosuprimir. Este efecto que persistió hasta la semana 13 se debe a lo antes descrito en el mecanismo de acción de la dexametasona. Cuando el índice de inflamación del cojinete plantar de los ratones inmunosuprimidos comienza a ser mayor que el de los ratones sin inmunosuprimir (semana 14), se entiende que los ratones inmunosuprimidos no tuvieron defensas naturales suficientes para atenuar o eliminar la infección causada por *C. carrionii*, misma que fue desarrollándose con mayor libertad durante las primeras 13 semanas aunque no se manifestaba inflamando el cojinete plantar por el efecto de la dexametasona, aunque macroscópicamente se observó una mayor descamación causada por *C. carrionii* en el cojinete plantar de los ratones inmunosuprimidos en comparación con los ratones sin inmunosuprimir.

Lo antes descrito también justifica que al ratón del grupo de los inmunosuprimidos le haya sido detectado en la semana 12 de la segunda inoculación el gránulo de 4 milímetros en la parte superior de la pierna izquierda, lo cual nos proporciona indicios de que la infección con *C. carrionii* puede ser diseminada en este ratón.

El porcentaje de ratones muertos durante el experimento fue mayor en el grupo III. Este grupo correspondió al lote de los ratones inmunosuprimidos, por ello se entienden estos decesos, ya que éstos animales son agresivos entre ellos por naturaleza, de tal manera que atacan y matan al ratón más débil. Es por este motivo que se utilizaron ratones hembra en lugar de ratones macho, por la razón que éstos son mucho más agresivos que las hembras y en un experimento tan longevo se terminaría con un porcentaje de supervivencia muy bajo y poco representativo. Que es lo que se explica con la gráfica 5; con lo que se puede deducir que los valores obtenidos a partir de la semana 33 del grupo III no son tan representativos como los resultados obtenidos a partir del grupo I.



Gráfica 5. Aquí se muestra el porcentaje de ratones vivos y muertos de cada lote durante el tiempo que duró el experimento (40 semanas). Se observa una mayor mortalidad en el grupo III (línea verde; con 2 decesos; semanas 26 y 33), y una mortalidad del 0 % en el grupo I. Cada 33.33 % equivale a un ratón (n =3).

El análisis histológico está programado para dentro de ocho semanas más aproximadamente, esto se debe a que las lesiones deben desarrollarse durante más tiempo, ya que se lo contrario no se encontrarán células fumagoides en el tejido del cojinete plantar de los ratones que es el indicativo que la infección se desarrollo por completo. Sin embargo, el índice de inflamación del cojinete plantar de los ratones nos indica que la infección se está desarrollando.

Objetivos y metas alcanzadas

Se logró desarrollar la infección con *C. carrionii* en el cojinete plantar de los ratones Balb/c hembras, tanto en los inmunesuprimidos como en los ratones sin inmunesuprimir. Ya que de acuerdo al desarrollo de las lesiones macroscópicas, estas coincidieron con las lesiones reportadas en la literatura.

Por otra parte, se desarrolló mejor la infección con *C. carrionii* el cojinete plantar de los ratones Balb/c hembras, a los cuales se les administró suspensión concentrada de *C. carrionii* con adyuvante incompleto de Freund (segunda inoculación).

Lo anteriormente descrito se puede demostrar con las imágenes de las patas infectadas y la patas testigo de cada ratón, además de las gráficas que representan el índice del cojinete plantar de los ratones Balb/c hembras, durante la primera, segunda y tercera inoculación.

Conclusiones

Se concluye que los cuatro grupos de ratones arrojaron resultados más significativos durante la segunda y tercera inoculación, por la razón que estas inoculaciones que fueron aplicadas con una mayor cantidad de *C. carrionii* más adyuvante incompleto de Freund para los cuatro grupos. Así mismo se observó y comparó el desarrollo y evolución de la infección en los ratones inmunosuprimidos, los ratones sin inmunosuprimir, de lo que se deduce que la infección se desarrolló mejor en los ratones inmunosuprimidos, ya que en estos grupos la descamación del cojinete plantar de los ratones fue mayor que la descamación de las lesiones de los ratones sin inmunosuprimir, además el índice de inflamación del cojinete plantar de los ratones inmunosuprimidos al inicio fue ligera pero a partir de la semana 16 fue mayor al índice de inflamación del cojinete plantar de los ratones sin inmunosuprimir, lo que sugiere que la infección en este grupo fue desarrollándose de una manera “discreta” y paulatina por el efecto de la dexametasona, para después manifestarse de una manera más agresiva. Esto que nos corrobora que este tipo de lesiones son de naturaleza crónica.

El uso de adyuvante incompleto de Freund durante la segunda y tercera inoculación de los cuatro grupos de ratones fue de gran utilidad para el desarrollo de la infección, ya que la concentración de *C. carrionii* (1mg *C. carrionii*/ml AIF) fue mayor que en la primera inoculación, de esta manera se logró la exposición del agente patógeno (*C. carrionii*) durante más tiempo.

Para futuros experimentos se sugiere aumentar el número de ratones por cada lote para tener un porcentaje de sobrevivencia que no sea influenciado significativamente por la muerte de alguno de ellos.

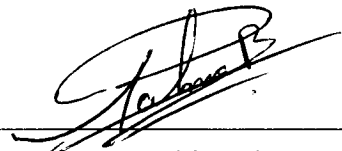
El análisis histológico es el elemento confirmatorio de que la infección se logró con éxito, pero para ello es conveniente esperar a que la infección tenga el tiempo necesario para aislar del tejido las células fumagíodes que es el indicativo de que *C. carrionii* está parasitando al huésped.

Existe una buena cantidad de tratamientos para el manejo de infecciones causadas por *C. carrionii*, sin embargo, se debe poner atención al diagnóstico en un tiempo oportuno, debido a que pequeñas lesiones pueden estar presentes durante mucho tiempo (20 años o más) sin manifestarse de una manera más agresiva, pero una vez desarrollada la infección se requieren largas terapias con medicamentos que pueden resultar tóxicos, o peor aún, este tipo de infecciones pueden ocasionar incapacidad funcional de algún miembro y puede requerirse un tratamiento quirúrgico.

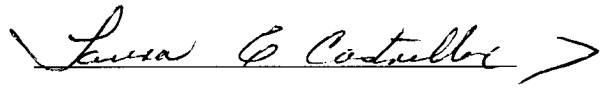
Referencias bibliográficas

1. Arenas, R. *Micología ilustrada*. 1ª edición. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. México 1993: 153-160.
2. Bonifaz, A., Carrasco-Gerard, A. *Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases*. *Mycoses*. 44: 1-7 (2001).
3. Castro, G., Mendoza, M. *Cromomicosis: Uso del tratamiento combinado de itraconazol y 5-Fluorouracilo en *Fonsecaea pedrosi* e itraconazol y criospray en *exophiala jeanselmei* var. *Lecanii-cornii**. *Derm. Venez.* 39:11-15 (2001).
4. Collazo H., González, E. *Amputación interescapulotorácica por cromomicosis y carcinoma epidermoide*. *Rev. Cubana Ortop. Traumatol.* 15:27-31 (2001).
5. Daniel, DC., Padilla, MC., Novales, J. *Cromomicosis esporotricoides. Presentación de un caso*. *Rev Cent Dermatol Pascua.* 13:21-24 (2004).
6. Daniel, R., Moya, S. *Cromomicosis. Hongos dematiáceos que intervienen en su etiología*. *Rev. Cubana Ortop. Traumatol.* 37:136-40 (1998).
7. Diccionario de especialidades farmacéuticas. *Alin (dexametasona)*. 49ª edición. Ed. Thomson. México 2003.
8. Incorporating The Official Newsletter Of The Australasian Federation Of Medical And Veterinary Mycology. *Mycoses Newsletter.* 7:23-39 (1998).
9. Lavallo P. *Chromoblastomycosis in Mexico*. Proceedings of the Fifth International Conference on the Mycoses, Scientific Publication. 396: 235-47 (1980).
10. Lavallo P., Padilla, MC., Mora, S., Reynoso, S., Rodríguez, J. *Micetomas, cromomicosis y esporotricosis en el estado de Veracruz. Datos del servicio de micología del Centro Dermatológico Pascua (1956-2001)*. *Dermatología Rev Mex.* 48:13-27 (2004).
11. Matsumoto, T., Matsuda, T. *Chromoblastomycosis and phaeoerythromycosis*. *Sem Dermatol* 4: 240-51 (1985).
12. McGinnis, MR. *Chromoblastomycosis and phaeoerythromycosis: New concepts, diagnosis, and mycology*. *J Am Acad Dermatol.* 8:1-16 (1983).
13. Mishra S. K., Sandhu R. S., *Effect of cortisone administration on experimental Nocardiosis*. *Infection and immunity.* 7:123-129 (1973).
14. Padilla, MC. *Laboratorio de micología*. *Rev Cent Dermatol Pascua.* 6:182-184 (1997).
15. Palma, A., Castrillón, L. E., *Infección experimental por *Actinomyces madurae* en ratón*. *Rev Cent Dermatol Pascua.* 9:96-101 (2000).
16. Rippon, J. *Tratado de micología médica*. 3ª Ed. Interamericana-McGraw-Hill. México, 1990: 299-320.
17. Zlotnik H., Buckley H. R., *Experimental production of Actinomycetoma in balb/c mice*. *Infection and Immunity.* 29:1141-1145 (1980).

Vo. Bo. DE LOS ASESORES



Maestro en Ciencias
Alejandro Palma Ramos



Doctora
Laura Estela Castrillón Rivera

Enero, 2005.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

Infeción experimental con *C. carrionii* en ratones Balb/c

PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO

Evaluación de productos relacionados con la salud

ALUMNO: Miguel Martínez Mendoza **MATRÍCULA:** 98350693

DIRECCIÓN: Zaragoza # 8, Col. Magdalena Petlacalco, Tlalpan, D.F. C.P. 14480

TELÉFONO: 58 46 31 48

ASESORES: M. en C. Alejandro Palma Ramos
Dra. Laura Estela Castrillón Rivera

LUGAR DE REALIZACIÓN: Instalaciones de la planta piloto de la UAM-X

FECHAS DE INICIO Y TERMINACIÓN: Del 15 de Diciembre de 2003, al 29 de
Noviembre de 2004.

Enero, 2005.

INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Cladosporium carrionii* EN RATONES Balb/c.

RESUMEN

Introducción

La cromomicosis es una afección micótica crónica de naturaleza granulomatosa con preferencia por los miembros inferiores, aunque también puede aparecer en los miembros superiores, glúteos, cara, abdomen, etc.

La cromomicosis es considerada como la más superficial de las micosis profundas, ataca todas las capas de la piel sin llegar al plano muscular, aunque se han descrito casos con localización profunda y otros con afectaciones sistémicas.

C. carrionii está entre los más reportados en las cromomicosis, es por esta razón que se pretende infectar a ratones Balb/c hembras con este hongo, para tener en cuenta la magnitud y evolución de la lesión practicando análisis histológicos de la misma. Ya que este hongo fue aislado de un paciente del hospital general de la Ciudad de México.

Las infecciones causantes de cromomicosis son frecuentes en climas tropicales y subtropicales (80 % de los casos reportados a nivel mundial). México ocupa el tercer lugar mundial entre las micosis profundas con el 6 %.

La cromomicosis se observa en cualquier raza y afecta preferentemente a adultos entre 30 y 60 años de edad (67 %). Predomina en varones (91 %), es rara en mujeres (9 %) o en menores de 15 años de edad. Este tipo de infección no se transmite de una persona a otra.

La relevancia del trabajo que se pretende realizar radica en que en México muchos de los trabajadores agrícolas no tienen el equipo (botas un lugar de huaraches) o las herramientas necesaria para realizar sus labores, por lo que están expuestos a traumatismos e infecciones con este tipo de microorganismos. Ya que este tipo de lesiones son de lenta evolución pero de gran daño para el miembro infectado.

Objetivo general

“Inducir cromomicosis con *C. carrionii* en el cojinete plantar de los ratones Balb/c hembra”

Objetivos particulares

1. Inducción de cromomicosis con *C. carrionii* en el cojinete plantar de ratones Balb/c hembra, inmunosuprimidos”
2. Inducción de cromomicosis con *C. carrionii* en el cojinete plantar de ratones Balb/c hembra, sin inmunosuprimir”

Conclusiones

Se concluye que los cuatro grupos de ratones arrojaron resultados más significativos durante la segunda y tercera inoculación, por la razón que estas inoculaciones que fueron aplicadas con una mayor cantidad de *C. carrionii* más adyuvante incompleto de Freund para los cuatro grupos. Así mismo se observó y comparó el desarrollo y evolución de la infección en los ratones inmunosuprimidos, los ratones sin inmunosuprimir, de lo que se deduce que la infección se desarrolló mejor en los ratones inmunosuprimidos, ya que en estos grupos la descamación del cojinete plantar de los ratones fue mayor que la descamación de las lesiones de los ratones sin inmunosuprimir, además el índice de inflamación del cojinete plantar de los ratones inmunosuprimidos al inicio fue ligera pero a partir de la semana 16 fue mayor al índice de inflamación del cojinete plantar de los ratones sin inmunosuprimir, lo que sugiere que la infección en este grupo fue desarrollándose de una manera “discreta” y paulatina por el efecto de la dexametasona, para después manifestarse de una manera más agresiva. Esto que nos corrobora que este tipo de lesiones son de naturaleza crónica.

El uso de adyuvante incompleto de Freund durante la segunda y tercera inoculación de los cuatro grupos de ratones fue de gran utilidad para el desarrollo de la infección, ya que la concentración de *C. carrionii* (1mg *C. carrionii*/ml AIF) fue mayor que en la primera inoculación, de esta manera se logró la exposición del agente patógeno (*C. carrionii*) durante más tiempo.

Para futuros experimentos se sugiere aumentar el número de ratones por cada lote para tener un porcentaje de sobrevida que no sea influenciado significativamente por la muerte de alguno de ellos.

El análisis histológico es el elemento confirmatorio de que la infección se logró con éxito, pero para ello es conveniente esperar a que la infección tenga el tiempo necesario para aislar del tejido las células fumagiodes que es el indicativo de que *C. carrionii* está parasitando al huésped.

Existe una buena cantidad de tratamientos para el manejo de infecciones causadas por *C. carrionii*, sin embargo, se debe poner atención al diagnóstico en un tiempo oportuno, debido a que pequeñas lesiones pueden estar presentes durante mucho tiempo (20 años o más) sin manifestarse de una manera más agresiva, pero una vez desarrollada la infección se requieren largas terapias con medicamentos que pueden resultar tóxicos, o peor aún, este tipo de infecciones pueden ocasionar incapacidad funcional de algún miembro y puede requerirse un tratamiento quirúrgico.

Bibliografía.

1. Arenas, R. *Micología ilustrada*. 1ª edición. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. México 1993: 153-160.
2. Bonifaz, A., Carrasco-Gerard, A. *Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases*. *Mycoses*, 44: 1-7 (2001).
3. Castro, G., Mendoza, M. *Cromomicosis: Uso del tratamiento combinado de itraconazol y 5-Fluorouracilo en Fonsecaea pedrosi e itraconazol y criospray en exophiala jeanselmei var. Lecanii-corni*. *Derm. Venez.* 39;11-15 (2001).
4. Collazo H., González, E. *Amputación interescapulotorácica por cromomicosis y carcinoma epidermoide*. *Rev. Cubana Ortop. Traumatol.* 15;27-31 (2001).
5. Mishra S. K., Sandhu R. S., *Effect of cortisone administration on experimental Nocardiosis*. *Infection and immunity.* 7;123-129 (1973).
6. Palma, A., Castrillón, L. E., *Infeción experimental por Actinomadura madurae en ratón*. *Rev Cent Dermatol Pascua.* 9;96-101 (2000).
7. ZlotnikH., Buckey H. R., *Experimental production of Actinomycetoma in balb/c mice*. *Infection and Immunity.* 29;1141-1145 (1980).