



**Universidad Nacional
Autónoma de México**
Facultad de Química

**Identificación de los receptores
involucrados en la internalización
de los conidios de
Sporothrix schenckii
en macrófagos humanos de la
línea celular U-937**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ADRIANA EDITH TREJO GÓMEZ



México, D.F.

2005

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

m350862



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

PRESIDENTE:	PROF. SATURNINO DE LEÓN CHAPA
VOCAL	PROF. MISAEL GONZÁLEZ IBARRA
SECRETARIO:	PROFA. HAYDÉE TORRES GUERRERO
1ER. SUPLENTE:	PROFA. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO
2º. SUPLENTE:	PROF. JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ

Sitio en donde realizo el tema:

Facultad de Medicina, UNAM 6º. Piso Edificio "A"
Dirección: Circuito Interior, Ciudad Universitaria C.P 04510
Delegación: Coyoacán

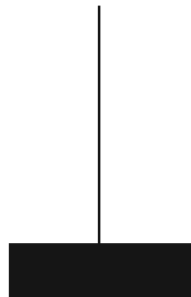
Asesor

Dra. Haydée Torres Guerrero



Sustentante

Adriana Edith Trejo Gómez





Dedicatoria y agradecimientos

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo receptonal.

NOMBRE: Adriana Edith Tejeda Gómez

FECHA: 05/Nov/03

FIRMA: [Firma]

Dedicatoria

❖ A mis padres, Víctor y Martha:

Por ser los "Patrocinadores oficiales" de este gran proyecto, por su ejemplo de honestidad, paciencia y amor al trabajo...Y porque lo que siempre me ha motivado, a pesar de los problemas, la depre y la histeria, son ellos.

Este trabajo es suyo.

Los quiero.

❖ A mi hermano, Jorge:

Por su paciencia, sobre todo cuando no lo dejaba usar la computadora y le restringía su tiempo en Internet, por desmañarlo los sábados, e incluso los domingos, para ir conmigo al laboratorio y esperarme hasta que terminaba de trabajar...pero, sobre todo, por motivarme cuando más lo necesitaba.

❖ A mis tías Juanita, Isabel y Margarita:

Porque, además de ser parte del equipo de patrocinadores, siempre han estado a mi lado cuando las he necesitado, me han escuchado y aconsejado, pero, más que nada; porque más que mis tías, han sido mis amigas y cómplices.

Las quiero mucho, gracias por todo.



❖ **A mis tíos, Felipe y José:**

Al primero, porque siempre estuvo tras de mí para que me aprendiera las tablas de multiplicar y demás cosas que todavía recuerdo (espero) y estudiara, y a mí tío José, que ha sido mi asesor técnico de cómputo y programas sin sueldo y me ha jalado las orejas cuando he llenado de virus la máquina, o borro archivos sin querer...y porque soy su sobrina favorita (Y que conste que tú lo escribiste en un correo electrónico).

❖ **A mi abue (†):**

Mis primeros recuerdos de la escuela son de mi abue, ayudándome a hacer mis primeras tareas, desde las planas del Kinder hasta las raíces cuadradas (Que siguen siendo un misterio para mí), además de que siempre nos inculcó el valor de la educación y nunca nos dejó flojear.

Desgraciadamente, ya no estás físicamente con nosotros...y que conste que tú me habías prometido estar presente en mi examen profesional....Pero espero que desde donde quiera que te encuentres te sientas muy orgulloso de mí. (Y ayudes un poquito...digo, ya que estás cerca del "Jefe")

❖ **A Ángeles, Mariela, Mayra, Patricia y Yazmín:**

Porque yo era bien portada, hasta que las conocí, (Gracias por corregirme el mal hábito) siempre me han ayudado a tener los pies bien puestos sobre la tierra, han tenido mucha paciencia por las citas canceladas y los compromisos incumplidos y han sido muy tolerantes con el mal genio y la frustración por que los experimentos no me salían, y a pesar de que casi siempre que me hablaban para salir, la respuesta era no, nunca dejaron de incluirme en los planes...pero sobre todo, con ustedes, la vida, ha sido una gran aventura.

❖ **A Betty, Esme, Guille y Yuri:**

Desde que las conocí, siempre han estado apoyándome, hemos compartido grandes momentos a lo largo de la carrera y, a pesar de que no estudiamos lo mismo, siempre hemos compartido todo, desde la frustración por un examen reprobado, hasta la alegría de tener novio...pero, además, porque han sido mis terapeutas

personales, mis tesoreras, las que pagaban las copias cuando no traía dinero, las que me pasaban los apuntes cuando no entraba a clase y más...Hicieron que mi paso por la facultad fuera, y siga siendo, algo inolvidable.

❖ **A Ady:**

Porque eres una de mis amigas más especiales, y por haber tenido la fortuna y la oportunidad de recuperar tu amistad, pero, sobre todo, por siempre darme ánimos cuando más lo he necesitado.

❖ **A Nubia:**

¡¡¡Mi hermanita!!! Siempre me has comprendido, apoyado y jalado las orejas cuando ha sido necesario. Tú sabes que pase por mucho antes de ir a Jornada y conocerte, pero bien ha valido la pena, porque desde ese momento, y espero que por mucho tiempo más, hemos compartido muchas cosas.

Mucho de este trabajo es tuyo, quizá yo hice los experimentos, escribí, hice los estadísticos (¡¡¡Hey!!!...ahora que lo pienso, ¡yo lo hice todo!) y demás, pero fue gracias a tu paciencia y apoyo, que tuve el valor de enfrentar día a día las dificultades y problemas, sin darme por vencida.

Muchísimas gracias....Por ser.

❖ **A Carlos:**

Solo puedo decir: Gracias...Siempre has confiado en mi, compartiste conmigo un grandioso proyecto de vida, llamado Shadday, y me mostraste que lo maravilloso del conocimiento era transmitirlo, pero, sobre todo, por el tiempo que hemos compartido, contándonos nuestros sueños.

❖ **A mi tutora, Dra. Haydée Torres Guerrero:**

Por todo su apoyo, paciencia y consejos, y sobre todo, por la confianza...aún cuando, a veces, ni yo misma confiaba en mi.



❖ **A Cris y Nacho:**

Por su apoyo y amistad, pero, además, porque trabajar con ustedes ha sido una experiencia muy, muy divertida y constructiva...En especial cuando Cris y yo discutíamos ampliamente sobre Harry Potter....perdón, quiero decir, sobre el proyecto.

❖ **Al Profesor Alberto Rosas Pérez:**

Porque usted ha sido el único profesor que me ha enseñado lo fantástico de las matemáticas...y por haberme dado la confianza y la oportunidad de dar asesorías, además de la gran paciencia que tuvo conmigo.

❖ **Al Profesor Misael González Ibarra:**

Porque me enseñó a valorar mi profesión...además de contagiarme su entusiasmo por los hongos...y su gran lado humano.

❖ **A Elena, Karina, Félix, Enedina, Lena, Rolando, Ángeles, Eva, Emilio, Elizabeth, Claudia, Belén, Liliana, Sarahí...**

Aún me faltan muchos nombres más...

Por confiar en mi, brindarme su amistad, por permitirme sentirme útil...y por darme la satisfacción de verlos avanzar en su carrera.



Agradecimientos

❖ **A Gaby Arenas:**

Por su paciencia para explicarme los procedimientos adecuados y recordarme siempre que debía confiar en lo aprendido en la facultad, para aplicarlo.

❖ **A Cristina Coronel Cruz (Cris):**

Por compartir conmigo todos sus conocimientos, su paciencia y su apoyo.

❖ **A la Dra. Patricia Talamás y la Dra. Amelia Ríos:**

Mi más profundo agradecimiento por su apoyo y su tiempo.

❖ **Al Dr. Juan José Bolívar:**

Por facilitarnos su equipo, para poder realizar un mejor trabajo.

❖ **A la Dra. Beatriz Gómez, Rosa Elena y Rocío:**

Por facilitarnos su equipo y compartir sus conocimientos.



❖ **Al Dr. Andrés Castell (El tío Andrés) y Miguel Herrera:**

Por facilitarnos su equipo en la elaboración de este trabajo, su paciencia y su sentido del humor.

❖ **A José Luís y Claudia:**

Por sacarme siempre del apuro de las células, yo sabía que siempre podía contar con ustedes en caso de alguna contingencia. (Que fueron varias)

❖ **A Toño:**

Mi profundo agradecimiento por su ayuda, su optimismo su disponibilidad, su mente abierta y su facilidad para trabajar en equipo.



Aun cuando haya pasado por todo lo que pasé, no me arrepiento de los problemas en que me metí, porque fueron ellos lo que me condujeron hasta donde deseé llegar.

Ahora todo lo que tengo es esta espada, y la entrego a cualquiera que deseé seguir su peregrinación. Llevo conmigo las marcas y las cicatrices de los combates; ellas son testimonio de lo que viví, y recompensas de lo que conquiste.

Son estas marcas y cicatrices queridas las que me abrirán las puertas del Paraíso.

Hubo una época en la que viví escuchando historias de hazañas. Hubo otras épocas en que viví simplemente porque necesitaba vivir. Pero ahora vivo porque soy un Guerrero y porque quiero un día estar en la compañía de Aquel por quien tanto luché.

John Bunyan



capítulo

1

Introducción

Introducción

La esporotricosis es una micosis subcutánea o profunda producida por el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*. La infección es de curso subagudo o crónico y afecta principalmente la piel y los ganglios linfáticos en forma de lesiones gomosas.

Es, sin duda, la micosis más difundida en el mundo, es rara en Europa, aunque allí fue descrita por primera vez por DeBeurmann y Gourgerot, en Francia.¹⁵

En México, la esporotricosis es frecuente, la estadística la refiere en un segundo lugar dentro de las micosis profundas, sin embargo, en el occidente del país se le reporta como la micosis más importante. Aunque se han presentado casos en todos los estados de la República, dos son las zonas más importantes, el occidente (Jalisco y Nayarit) y la zona centro incluyendo a los estados de Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Distrito Federal.

Se le ha relacionado como una enfermedad de tipo ocupacional, se presenta sobre todo en campesinos, amas de casa, niños en edad escolar, cultivadores y vendedores de flores, cazadores, mineros, pescadores, empaques de vidrio y loza, entre otros.

El mecanismo de infección más frecuente es a través de un traumatismo en piel con material contaminado con la forma micelial. Los factores predisponentes a esta enfermedad son únicamente los relacionados con la ocupación, aunque la desnutrición, el alcoholismo crónico y otras enfermedades debilitantes, exacerban la esporotricosis. Las formas clínicas más frecuentes pueden ser englobadas en:

- a) Esporotricosis linfangítica. Se inicia con una lesión nodular, que se disemina posteriormente a través de los vasos linfáticos con la formación de lesiones

secundarias nodosas. La localización más frecuente es en miembros superiores e inferiores, siendo este cuadro la forma típica de la enfermedad.

- b) Esporotricosis fija. Las lesiones se restringen al sitio de la inoculación y son placas ulceradas, verrucosas, infiltradas o eritomasas que no involucran linfáticos regionales.
- c) Esporotricosis diseminada. Es una forma secundaria de la enfermedad que se extiende a partir de un foco primario cutáneo o pulmonar y puede involucrar articulaciones, huesos, mucosas, órganos internos o sistema nervioso central.
- d) Esporotricosis pulmonar. Se considera rara, y puede presentarse asintomático o con síntomas de neumonía, tos discreta y escasa expectoración.

capítulo

2

Antecedentes

Antecedentes

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Sporothrix schenckii*.

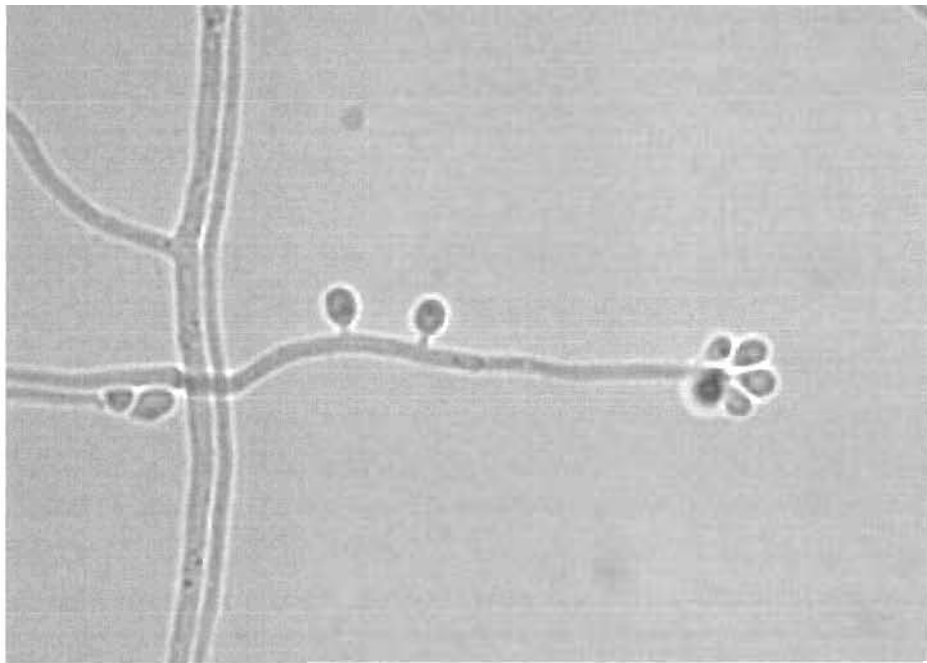


Fig. 1. *S. schenckii* en su fase micelial
(Banco de Imágenes Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Hongos
M. en C. Gabina Arenas López)

A) *In Vivo*

El hongo dimórfico *Sporothrix schenckii* presenta dos formas morfológicas: la fase micelial es la forma saprobia y se encuentra en el suelo, en detritus vegetal, madera, hojas y ramas, ya sean secas o frescas, y la fase levaduriforme, la cual es la forma infecciosa y es la que se desarrolla en el hospedero.

La principal vía de entrada del hongo es a través de traumatismos y escoriaciones con material contaminado con conidios y/o hifas; dentro del hospedero, se encuentran las condiciones óptimas de nutrientes y temperatura, por lo que se lleva a cabo la transición dimórfica de micelio a levadura. Es por ello que solo se encuentra la fase levaduriforme en las lesiones crónicas.

A la fecha, no se ha descrito si esta transición se lleva a cabo intracelularmente en las células de la piel o en los PMN (Polimorfonucleares)

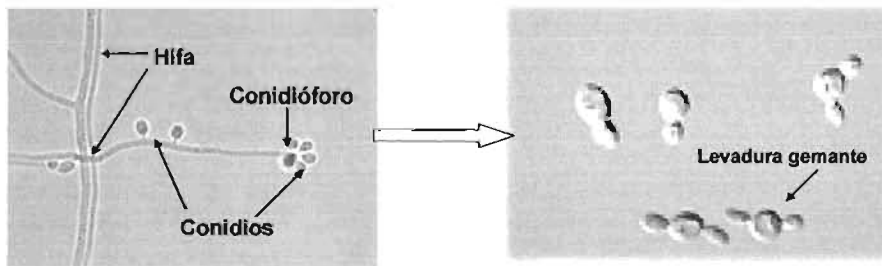


Fig. 2. Transición dimórfica de *S. schenckii*

Dimorfismo

El término **dimorfismo** se ha empleado para describir la capacidad que tienen algunos hongos de modificar su morfología, implicando muchas veces que la fase saprobia corresponde a hifas y conidios y la parasitaria a levaduras.

Los hongos dimórficos patógenos del hombre se pueden dividir en tres grupos dependiendo de las condiciones requeridas para llevar a cabo la transición morfológica de la fase parasitaria⁵⁴. En el primer grupo se encuentran aquellos que necesitan solo la temperatura de 37°C de incubación; en este grupo se encuentran *B. dermatitidis* y tradicio-

nalmente *Sporothrix schenckii*. En el segundo grupo, además de la temperatura, se requieren de factores nutricionales específicos; como es el caso de *P. brasiliensis* e *H. capsulatum*, que necesitan cisteína. En el último grupo se encuentran aquellos hongos que requieren condiciones ambientales y nutricionales complejas y no bien establecidas, en este grupo se encuentran englobados los mucorales y *Candida albicans*.

Los cambios morfológicos pueden estar dados por una gran variedad de factores que involucran alteraciones en los patrones de síntesis de pared celular, estructura que participa de manera importante en la determinación de la forma de la célula fúngica y en el reconocimiento por parte de los macrófagos

En los hongos patógenos, esta capacidad de transformación morfológica también está relacionada con la habilidad de invadir los tejidos del hospedero, provocando así la enfermedad^{12, 17, 34, 39.}

Actualmente, se sabe que el dimorfismo de *S. schenckii* está regulado por factores nutricionales, temperatura y concentración de CO₂, sin embargo, se desconoce como estos factores se interrelacionan para modular la expresión de genes involucrados en la inducción de morfogénesis.

Este hongo, cuyas paredes celulares tienen como componentes polisacáridos glucanas y mananas, posee un azúcar poco común en los hongos: ramnosa, que le confiere características inmunológicas particulares entre los hongos patógenos del hombre. El contenido de glucana varía dependiendo de la morfología celular; los trabajos de Mendoza y cols³⁸ muestran diferencias en cuanto a la composición química de un polisacárido amorfo entre hifas, conidios y levaduras, demostrando estructuras de monoramnosil ramnomananas para la fase levaduriforme y conidios, y dirramnosil ramnomananas para las hifas, lo cual puede servir para aumentar su supervivencia y facilitar su diseminación en los tejidos del hospedero.

B) *In Vitro*

Sporothrix schenckii se caracteriza por presentar hifas hialinas, septadas y macrosifonadas. A partir de la hifa se desarrolla el conidióforo que es una estructura que mide entre 10 y 30 µm, disponiéndose alrededor de él microconidios piriformes, elongadas y ovales, de manera que presenta un aspecto de "flores de durazno o margaritas". También puede presentar microaleuroconidios alternados. Presenta una agrupación de micelio característica, conocida como coremium, el cual consiste en formar pequeños "paquetes" de hifas. Esta fase se obtiene a 28°C en los medios de Agar dextrosa de

Sabouraud (ADS) y Agar de Micosel, también en los medios YEPD y Medio RV pH 5.4. Las colonias se desarrollan rápidamente, al inicio (3 a 4 días) son de aspecto membranoso, radiadas y de color blanquecino, posteriormente se desarrolla micelio aéreo y la colonia se hace acuminada, conservando su aspecto mucoide. En cultivos viejos o medios pobres en nutrientes, como Agar de papa dextrosa, el conidio cambia de color de hialino a café oscuro o negro. Este color se debe a la síntesis de melanina, polímero de DHN (1,8-dihidroxi-naftaleno). Se ha encontrado que la presencia de pigmento está involucrada con la patología del hongo, ya que es más resistente a los mecanismos de eliminación por los macrófagos^{30, 31, 48}

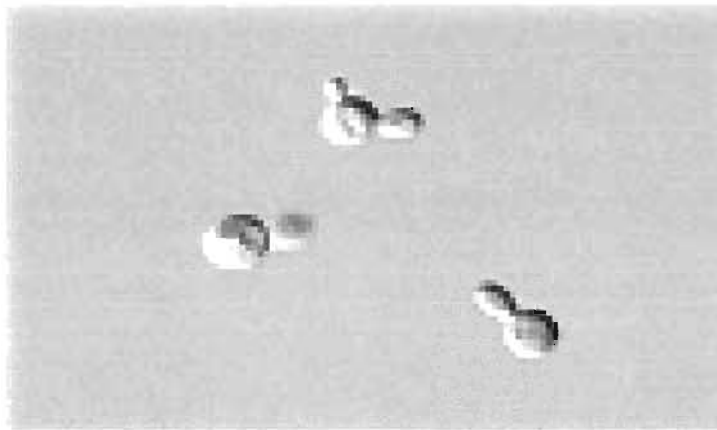


Fig. 3. *S. schenckii* en su fase levaduriforme
(Banco de Imágenes Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Hongos
M. en C. Gabina Arenas López)

La fase levaduriforme, conocida también como la fase infectiva, se obtiene a 37°C en medios ricos en nutrientes tales como Agar de gelosa sangre, Agar BHI o medio RV pH 7.2, y puede estimularse su crecimiento en presencia de 5% de CO₂. El desarrollo inicia a partir de los conidios y/o hifa en un intervalo de 3 a 5 días. Las colonias son cremosas, blanco-amarillentas y ligeramente acuminadas. Al microscopio se observan células levaduriformes gemantes, ovoides o alargadas, de 2-4 x 3-6µm.

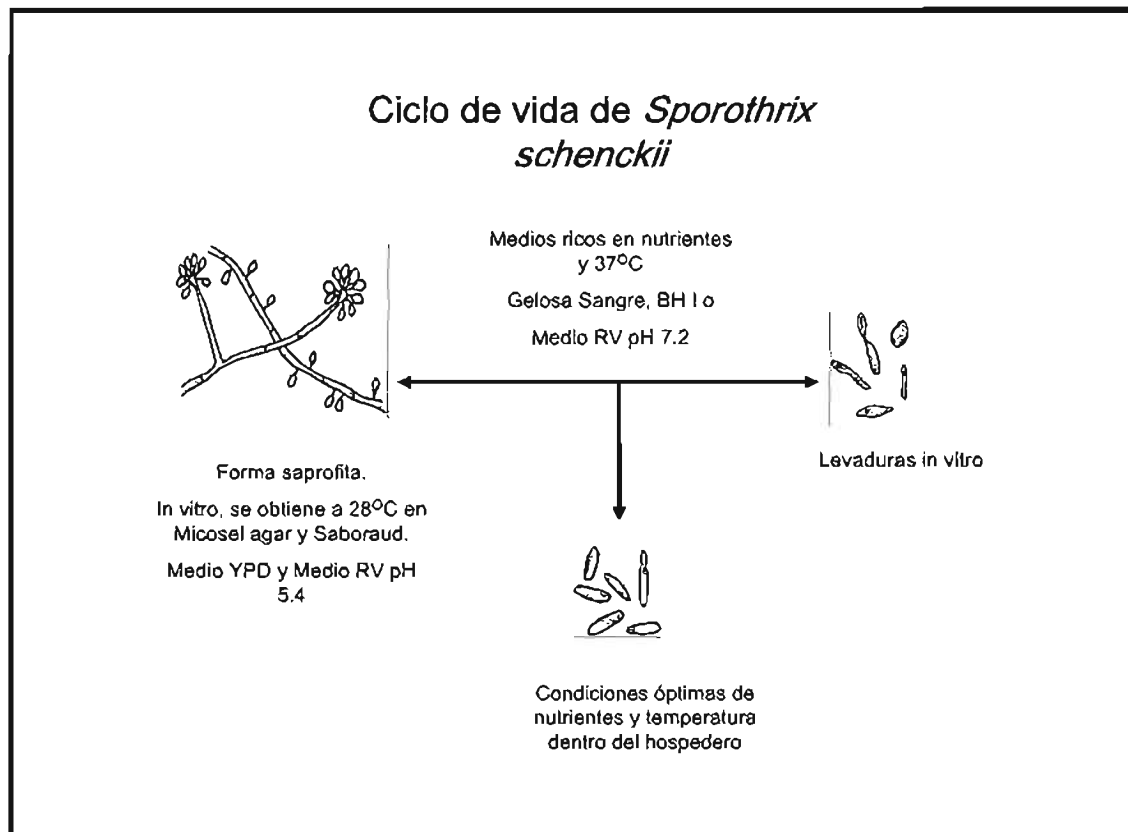


Fig. 4. Ciclo de vida de *Sporothrix schenckii*

El mecanismo o mecanismos de resistencia y susceptibilidad a adquirir esporotricosis es aún desconocido. Se ha visto que la adquisición de la enfermedad depende de:

- El tamaño del inóculo inicial.
- La virulencia del hongo.
- La profundidad de la inoculación y, especialmente,
- El estado inmunitario del hospedero.

Este último puede verse alterado por alguna terapia con fármacos inmunosupresores o por deficiencias de este; sin embargo, pueden ocurrir infecciones locales o sistémicas de este hongo sin que existan evidencias de alteraciones inmunológicas²⁹.

En las etapas tempranas de la esporotricosis la primera barrera de defensa a la que se enfrenta el patógeno es el **Sistema Inmune Innato**, la cual es una forma antigua y universal de defensa del hospedero que impide la infección y cuyos mecanismos efectores se utilizan para eliminar microorganismos, como es la respuesta inflamatoria, inducida por la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y PAF (Factor activador de plaquetas).

Los macrófagos y neutrófilos forman parte de esta barrera y son esenciales para el control de infecciones. Los neutrófilos, en general, son más eficientes en la función de fagocitosis, a excepción de que la partícula sea más grande que él. Bajo estas circunstancias los macrófagos representan una mejor defensa contra la invasión de una gran variedad de microorganismos, entre ellos, *Sporothrix schenckii*.

El reconocimiento e ingestión de microorganismos son un sello distintivo de los macrófagos, cuyas funciones dependen de interacciones altamente específicas receptor-ligando y es claro que este reconocimiento es mediado funcional y estructuralmente por diversos receptores que pueden disparar una gran variedad de mecanismos de defensa como activación del complemento, expresión de citocinas pro-inflamatorias y, por su puesto, la fagocitosis.

En los estudios del mecanismo de defensa contra esporotricosis se ha establecido que la inmunidad adaptativa juega un papel muy importante en la defensa del hospedero contra el patógeno; específicamente la Inmunidad mediada por células, en la cual, participan linfocitos T CD⁴ y a su vez, macrófagos⁵⁴.

Componentes estructurales de *Sporothrix schenckii* involucrados en el reconocimiento del Sistema Inmune Innato.

La participación de los componentes de la pared celular en la respuesta inmune a la esporotricosis es de suma importancia, ya que son estos los que interactúan con los receptores que se encuentran en los fagocitos profesionales. Se sabe que *Sporothrix schenckii* posee antígenos de naturaleza glucopeptídica. Entre los diferentes carbohidratos que componen la pared se encuentra la ramnosa (47.5%), la cual no ha sido detectada en otras entidades fúngicas patógenas, manosa y glucosa (46.2%), galactosa (6.2%), mientras que la estructura peptídica está compuesta por treonina (14.2%), serina (13.2%), ácido aspártico (9.6%), y ácido glutámico (9.0%). La composición de carbohidratos y la relación entre ellos varía dependiendo de la fase del ciclo de vida de *S. schenckii*. La pared celular en la fase micelial está compuesta por la diramnosil-ramno-manana, integrada por una cadena principal de unidades α -D-manopiranosas, unidas por enlaces α (1 \rightarrow 6) y cadenas laterales O- α -D-ramnopiranosil (1 \rightarrow 2) ramnopiranosas^{38, 58}. Por otra parte, se determinó que las levaduras tienen como componente de pared una cadena principal, igual que en la forma micelial, pero con cadenas laterales de unidades terminales no reductoras de α -L-ramnopiranosas.

En resumen, observaron que la forma levaduriforme contiene cadenas laterales mono-ramnosil y la forma micelial cadenas diramnosil, éstas últimas parecen el antígeno más específico en este hongo.

Es precisamente la parte polisacárida la que debe ser reconocida por los receptores de los Monocitos/Macrófagos, neutrófilos y células dendríticas.

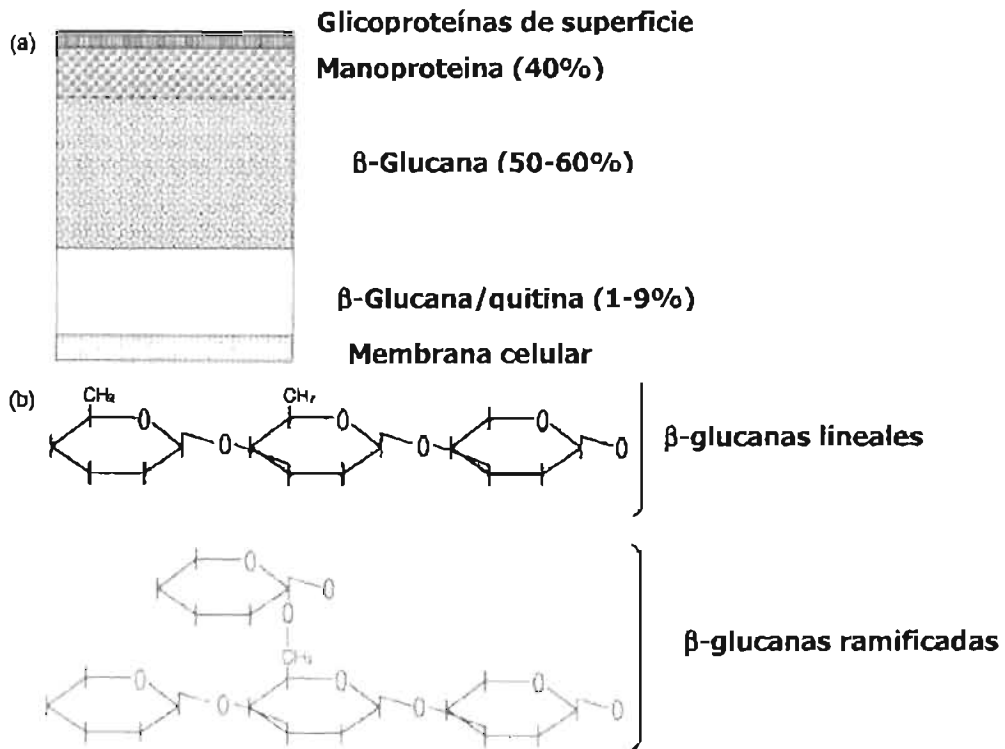


Fig. 5. Componentes de la pared celular en hongos.

- A) Organización estructural de la pared celular y B) Estructura de las β -glucanas que componen la pared celular. (Herre, J. Gordon S. and Brown G. D. "Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages." Molecular Immunology 40 (2004): 869-76.)

A

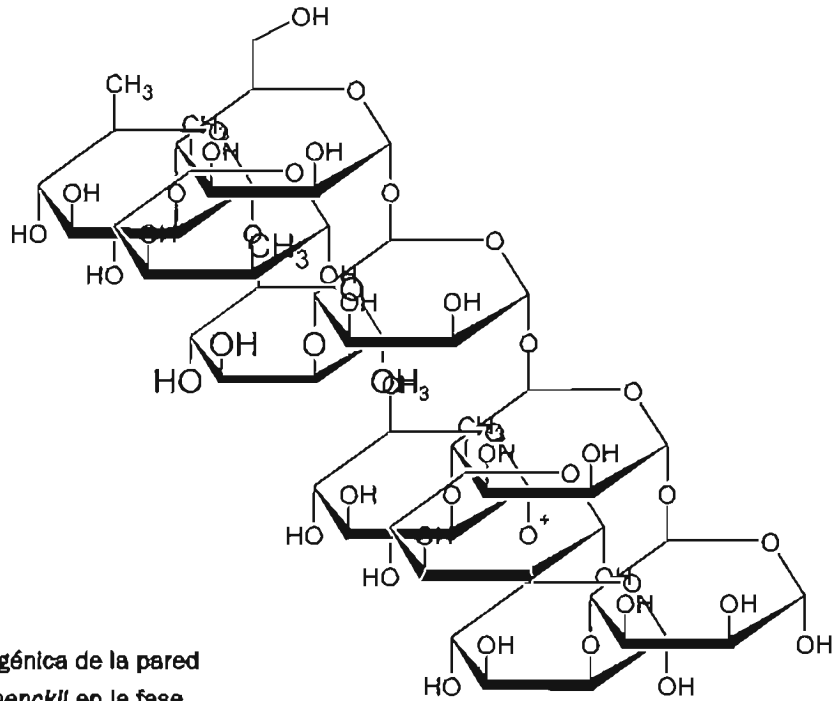


Figura 6. Estructura antigénica de la pared celular de *Sporothrix schenckii* en la fase micelial

B

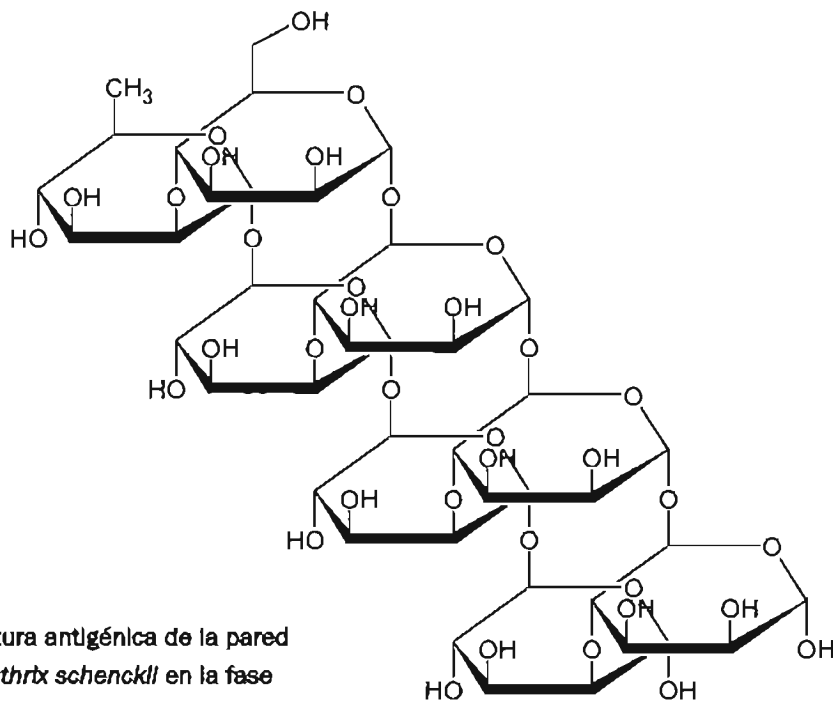


Figura 7. Estructura antigénica de la pared celular de *Sporothrix schenckii* en la fase levaduriforme

CARACTERÍSTICAS DE RECEPTORES A PATÓGENOS PRESENTES EN MACRÓFAGOS

El Sistema Inmune Innato se enfrenta principalmente a dos retos importantes: Necesita discriminar entre los antígenos propios y del patógeno, por otro lado se enfrenta a la habilidad de los patógenos de variar sus antígenos como un mecanismo de defensa y evasión del sistema inmune. Existen una gran variedad de receptores que reconocen motivos conservados en los microorganismos que no se encuentran presentes en el hospedero. Esos motivos conservados juegan un papel esencial en la biología de los agentes invasores y no se ha observado alta frecuencia de mutación^{2, 7, 33, 59}.

Janeway ha propuesto^{32, 33} llamar a esos receptores "Pattern recognition receptors" (PRRs) y a los blancos para esos receptores "Pathogen associated molecular patterns" (PAMPs). Los motivos asociados a patógenos incluyen carbohidratos como: mananas y glucanas de la pared celular de hongos, péptidos formilados en bacterias, LPS y ácido lipoteicoico en las superficies de las bacterias Gram negativas y Gram positivas, respectivamente. El reconocimiento de patrones específicos guía a que la fagocitosis se lleve a cabo.

Los receptores celulares que reconocen esos patrones, incluyen al receptor de manosa (MR), al receptor Endo 180, el de β -glucanas, Dectin-1, los receptores Toll-like y los receptores Scavengers, que reconocen los componentes de superficie de hongos y bacterias, incluido LPS.

Los componentes humorales que opsonizan a los agentes infecciosos pueden ser reconocidos por receptores fagocíticos, incluidos MBP (Proteína de unión a manosa), el cual une mananas y es reconocido por el receptor C1q, la proteína surfactante A, la cual es reconocida por un receptor transmembranal, el SPR210 y también Dectin-1.

En el caso específico de los hongos, el receptor de manosa (MR) y el receptor CR3 del complemento han sido considerados los receptores mayormente involucrados en el reconocimiento de antígenos fúngicos; sin embargo, se ha demostrado que el receptor de β -glucanas, Dectin-1, tiene un papel más importante en el reconocimiento de los carbohidratos presentes, junto con los receptores Toll-like (TLR), en especial TLR2 y TLR4, los cuales están ligados directamente a la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, mediante vías de transducción diferentes o que, en algún momento, convergen en algún punto, dando como resultado la activación de la respuesta inmune adaptativa^{9, 20, 56}.

Receptores asociados a Carbohidratos

- **Dectin-1**

Es un receptor recientemente identificado en un modelo murino, sin embargo, se ha demostrado que su homólogo humano es estructural y funcionalmente similar.

Dectin-1 es un pequeño receptor transmembranal, que contiene dominios de reconocimiento a carbohidratos, los cuales detectan enlaces β -1-3 y/o β -1-6 en la glucana y en componentes de pared celular de levaduras, y medía los efectos biológicos de este carbohidrato.

El dominio NH₂ intracelular es corto y contiene Motivos de Activación de Inmunoreceptor basados en Tirosina (ITAM's, por sus siglas en inglés), una estructura que se encuentra en una gran variedad de receptores señalizadores de la inflamación, incluyendo al receptor FC, receptores de células T y NK, lo que sugiere que Dectin-1 juega un papel importante en la respuesta inflamatoria a partículas que contengan β -glucanas, en adición a su función fagocítica.

Este receptor es expresado en altos niveles en macrófagos y neutrófilos y en menos frecuencia en células dendríticas y en subpoblaciones de Linfocitos T.

- **Endo-180**

Fue el primer receptor endocítico que se identificó que se recicla en Fibroblastos.

Pertenece a la familia de receptores de manosa, los cuales se caracterizan por ser receptores transmembranales, con un dominio N-terminal rico en cisteína, un dominio para fibronectina tipo II y 8 dominios semejantes a los de lectina tipo C (CTLDS). El dominio citoplasmático cuenta con motivos de tirosina, que es capaz de guiar la función de este receptor, ya sea únicamente como receptor fagocítico (para partículas mayores a 0.5 μ m), o que sea endocitado vía vesículas cubiertas de clatrina (para partículas pequeñas o nutrientes, menores a 0.2 μ m).

Una característica de esta familia es que los receptores son rápidamente internalizados de la membrana plasmática vía vesículas cubiertas de clatrina, mediante endocitosis. Esto significa que en un estado de reposo, solo del 10-30% de los receptores se encuentran en la superficie celular.

Este receptor reconoce N-acetilglucosamina, manosa y fucosa. Es expresado en células endoteliales, y hay evidencia de que es expresado en macrófagos.

- **Receptor FC**

Los anticuerpos representan una intersección entre la inmunidad Innata y la Inmunidad adaptativa: Ellos reconocen los agentes infecciosos con gran especificidad, pero son unidos e internalizados a través del dominio Fc por la familia de receptores Fc.

Estos receptores están divididos en dos clases: los que realizan funciones efectoras y los que transportan inmunoglobulinas a través de barreras epiteliales.

Hay dos divisiones mayores de los receptores Fc γ : receptores que activan funciones efectoras y receptores que inhiben esas funciones.

Los receptores que activan funciones son: Fc γ RI, Fc γ RII. El receptor que inactiva las funciones es Fc γ RIIB.

Al hacer contacto la fracción Fc con este receptor se liberan mediadores de la inflamación, ácido araquidónico y se forman ROS (Especies Reactivas de Oxígeno) y NOS. (Oxido nítrico sintasa).

Estos receptores se encuentran en Macrófagos, Neutrófilos, Células cebadas y Linfocitos B.

- **Receptor de Manosa (MR)**

Fue identificado inicialmente en macrófagos alveolares de conejo como un receptor transmembranal de 175 kDa que reconoce glicoproteínas y cadenas de azúcares terminadas en manosa, fucosa o N-acetilglucosamina.

Pertenece a la familia de receptores de manosa, está formado por una sola cadena citoplasmática transmembranal, un dominio N-terminal rico en cisteína, un dominio para fibronectina tipo II y 8 dominios semejantes a los de lectina tipo C (CTLDs). Al igual que los miembros de esta familia, el receptor de manosa tiene dos funciones, la fagocitosis mediada por receptor (para partículas mayores a 0.5 μ m), o la endocitosis vía vesículas cubiertas de clatrina (para partículas pequeñas o nutrientes, menores a 0.2 μ m).

Este receptor reconoce manosa, fucosa, N-acetilglucosamina, glucosa y xilosa de la superficie de los patógenos y media la fagocitosis de estos organismos, además de ser este un proceso pro-inflamatorio, ya que hay producción de citocinas proinflamatorias.

Se encuentra distribuido en los macrófagos y células dendríticas.

- **Receptores tipo Toll (TLR)**

El papel de los receptores Toll en la inmunidad innata fue descrito por primera vez en *Drosophila*; un año después del descubrimiento del papel de Toll en este organismo en la defensa contra la infección por hongos, el homólogo Toll en mamíferos fue descubierto. La familia de receptores tipo Toll (TLRs) está caracterizada por la presencia de un dominio rico en leucina en el dominio intracelular y un dominio TIR (Toma su nombre de Toll/IL-1 receptor).

La familia de receptores Toll está constituida por 11 miembros (TLR1-TLR11) y reconocen una gran cantidad de componentes microbianos, TLR2 y TLR 4 reconocen zimosán (una mezcla de -glucanas, mananas, manoproteínas y quitina)

TIPO DE TLR	LIGANDO
TLR1	Tri-acil lipopeptidos Factores solubles
TLR2	Lipoproteínas/Lipopéptidos Peptidoglucanas Ácido lipoteicoico Lipoarabinomananas Glicoinositolfosfolipidos Glicolipidos Porinas Zimosán LPS atípico HSP70 (hospedero)
TLR3	RNA de doble cadena
TLR4	LPS Taxoí Proteínas de fusión Proteínas de envoltura HSP60 (<i>Chlamydia pneumoniae</i>) HSP60 (hospedero) HSP70 (hospedero) Fibronectina tipo III Oligosacaridos del ácido hialurónico (hospedero) Fibrinógeno (hospedero)
TLR5	Flagelina
TLR6	Di-acil-lipopéptidos
TLR7	Imidazolquinolina Loxoribina Bropirimina (Todos son compuestos sintéticos)
TLR8	¿?
TLR9	CpG DNA
TLR10	¿?
TLR11 ⁶⁰	<i>Escherichia coli</i> uropatogénica (UPEC)

La vía de señalización de estos receptores llega a la activación de NFκB y la producción de citocinas proinflamatorias, están ampliamente distribuidos en macrófagos y en mayor número en células dendríticas.

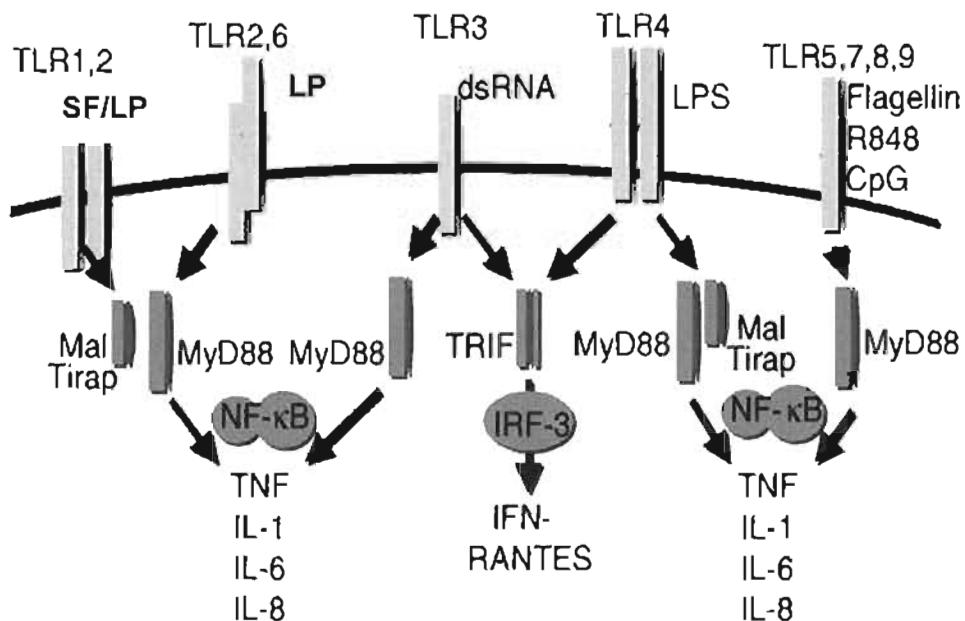


Fig.8. Receptores parecidos a Toll, algunos de sus ligandos, e Interleucinas que producen. (Ulevitch, R.J., Mathlson J.C., Da silva Correia, J. "Innate Immune responses during infection. *Vaccine*. 22S (2004): S25-S30.)

FS/LP	Factores solubles, Lipoproteínas/lipopéptidos
LP	Lipopéptidos
dsRNA	RNA de doble cadena.
LPS	Lipopolisacárido.
R848	Imidazoquinolina sintética relacionada estructuralmente con los ácidos nucleicos.
CpG	Motivos CG sin metilar, presentes en el DNA bacterial.
IFN	Interferon, molécula proinflamatoria.
TNF	Factor de Necrosis Tumoral, molécula proinflamatoria.
RANTES (Regulated on Activation Normal T expressed and Secreted)	Quimiocina, miembro de la superfamilia de IL-8, selectivo para linfocitos T de memoria y Monocitos.
Mal Tirap MyD88 TRIFF	Miembros de la familia de MyD88 de proteínas adaptadoras.
NFκB/IRF-3	Factor de transcripción. Activa la transcripción de genes de citocinas.

TABLA 2. RECEPTORES DE SUPERFICIE DE MONOCITOS Y MACRÓFAGOS

Receptores Fc.	IgG _{2g} , IgG _{2b} , IgG ₃ , IgA/ IgE
Receptores del complemento	C3b, C3bi, C5b, C1q
Receptores de citocinas	MIF, MAF, LIF, LF, MFF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4 INF α , INF β , IFN γ Factores estimuladores de colonias (GM-CSF, M-CSF)
Receptores para péptidos y pequeñas moléculas	H1, H2, 5-HT, 1, 3, 5-Dihidroxitamina D ₃ , Encefalinas/Endorfinas, Sustancia P, Vasopresina
Receptores de hormonas	Insulina, Glucocorticoesteroides, Angiotensina
Receptores de Transferrina y lactoferrina	
Receptores de Lipoproteínas	Lipoproteínas aniónicas de baja densidad, PGE ₂ , LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ , PAC, Apo B, Apo E
Receptores para coagulantes/anticoagulantes	Fibrinogeno/fibrina, Factor VII de coagulación, α -1 Antitripsina, Heparina
Receptores de fibronectina	
Receptores de Laminarina	
Receptores de AGEs	
Receptores de carbohidratos	Manosa, fucosa, galactosa, ácido siálico, LPS
Receptores de la familia Toll-like	TLR4, TLR2, TLR5, TLR9
Dectin-1	β -Glucana

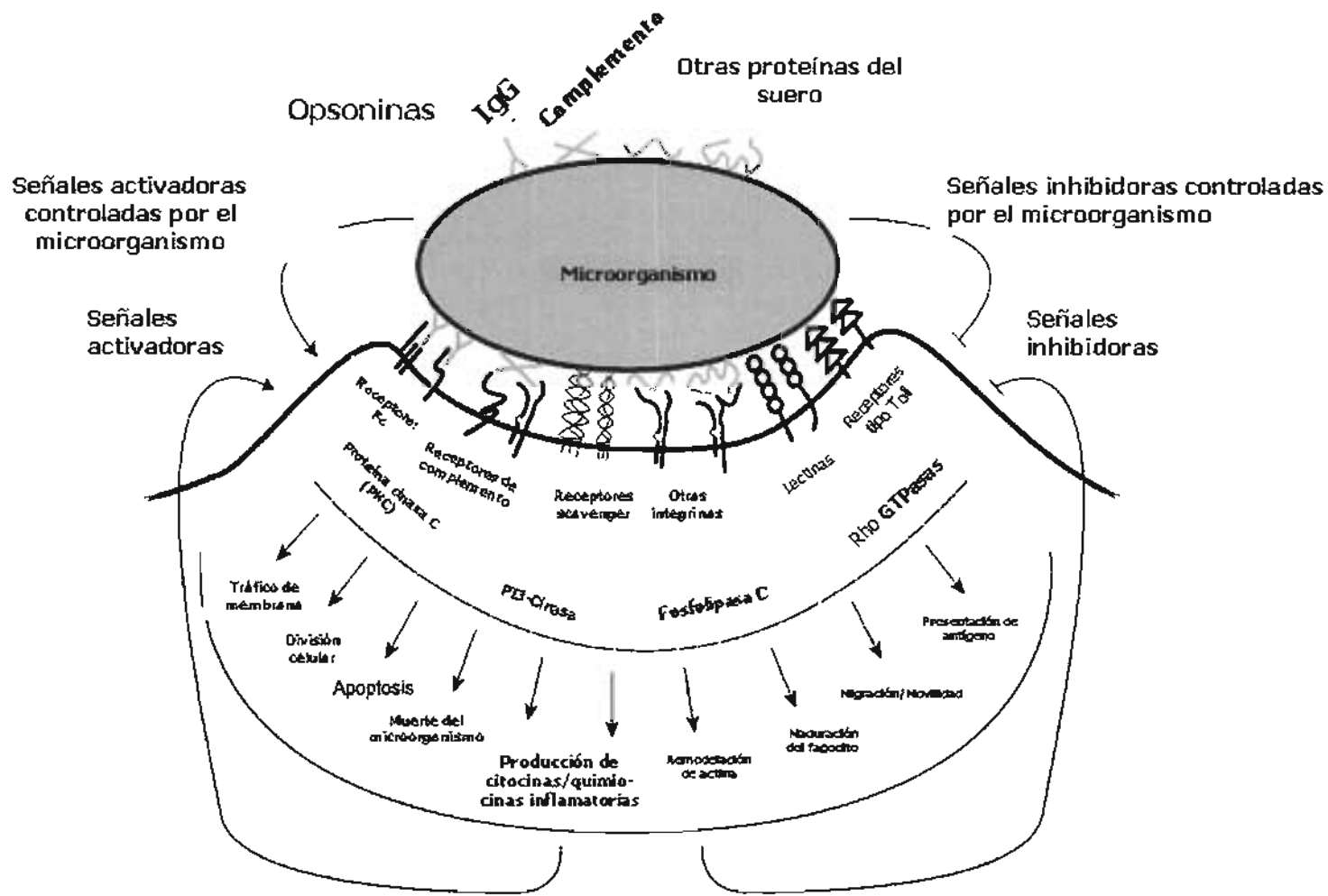


Fig. 9. Receptores asociados al proceso de fagocitosis. Eventos que se llevan a cabo (Underhill, D. 2002. Annu. Rev. Immunol)

MECANISMO DE LA FAGOCITOSIS

La fagocitosis de patógenos inicia la respuesta Inmune Innata, la cual, en su momento, dirigirá la respuesta adaptativa. Es un proceso activo mediado por receptores específicos presentes en los macrófagos, y con el fin de discriminar entre agentes infecciosos y lo propio, los macrófagos cuentan con un número restringido de receptores fagocíticos, estos receptores reconocen motivos conservados en los patógenos, como carbohidratos, entre ellos β -glucanas, mananas, glucosa. Estos agentes también pueden ser fagocitados mediante los receptores de complemento, después de una opsonización no específica con proteínas del complemento o también, mediante el receptor Fc después de una opsonización específica con anticuerpos. Todos estos receptores inducen reorganización en el citoesqueleto de actina, que guían a la internalización de la partícula.

La fagocitosis llevada a cabo por los macrófagos es crítica, debido a su papel en el reconocimiento de los patógenos y destrucción de estos. Este mecanismo es extremadamente complejo, debido a la cantidad de receptores y las diferentes vías de señalización asociadas a ellos, sin embargo, de forma general, ocurre de la siguiente forma:

- 1) Unión de los antígenos del microorganismo al receptor específico expresado en el macrófago.
- 2) Internalización de partículas mediante la polimerización de actina en el sitio de contacto o ingestión
- 3) Después de la internalización, la actina es separada del fagosoma, y los fagosomas maduran durante una serie de eventos al fusionarse con vesículas de la vía endocítica, que culmina con la formación del fagolisosoma².

Mientras que el tráfico asociado a la vía endosoma-lisosoma ocurre en asociación con los microtúbulos, la maduración del fagosoma requiere de la interacción coordinada del citoesqueleto de actina y tubulina.

Una vez que se ha dado la interacción receptor-ligando, la actividad microbicida de los macrófagos y monocitos depende en general, de su habilidad para fagocitar a los organismos y matarlos, una vez que han sido ingeridos. Uno de los mecanismos involucrados en la eliminación de los patógenos ingeridos es a través de la conversión del oxígeno ambiental al ión superóxido (O_2^-), H_2O_2 , el radical hidroxilo (OH^\cdot) y al oxígeno singulete. Los intermediarios reactivos del nitrógeno también juegan un papel importante en el proceso, el cual es conocido como **estallido respiratorio**^{7,37}. Otra vía involucrada en

la muerte del patógeno es la formación del fagolisosoma. Durante este proceso, el patógeno es internalizado al fagosoma, donde inicia la disminución del pH. El microorganismo es transportado en los endosomas hasta la fusión con los lisosomas, formando el fagolisosoma en el cual, las enzimas hidrolíticas destruyen al hongo.

El macrófago también da la señal para el inicio de la Respuesta Inmune Adaptativa. Tachibana y cols⁵³ establecieron en una infección experimental con *Sporothrix schenckii* que la inmunidad celular juega un papel importante contra el hongo y que la inmunidad adquirida consiste principalmente en macrófagos activados por linfocitos T CD⁴. Los linfocitos T participan en la defensa del hospedero contra el hongo al liberar INF- γ , TNF- α e IL-10. INF- γ y TNF- α son potentes activadores de macrófagos y la IL-12 modula la respuesta hacia Th1 (Inmunidad celular)^{1,54}. Se ha visto que la inmunidad celular es importante en la defensa del hospedero contra varios hongos, incluyendo *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitis* y *Candida albicans*⁵⁷.

A pesar de este proceso de defensa del hospedero, se ha encontrado que algunos microorganismos patógenos han desarrollado una variedad de estrategias para evitar ser destruidos inmediatamente por los macrófagos. *Mycobacterium tuberculosis*⁴⁴ inhibe la maduración fagolisosomal y es capaz de regular el pH, impidiendo su acidificación.

Clostridium perfringens es capaz de persistir intacta dentro de los macrófagos, aún en los macrófagos activados, debido a que impide la maduración del fagolisosoma, la activación de las enzimas hidrolíticas y la disminución del pH⁴³. En el caso de *Helicobacter pylori*, existe un mecanismo intracelular antifagocítico dependiente del gen PAI (Cag pathogenicity island) en su genoma. La inhibición de la fagocitosis involucra componentes del sistema de secreción de la bacteria que impide su internalización⁴⁶.

También se ha descrito que algunos hongos como *Histoplasma capsulatum*, un hongo dimórfico, también evaden la respuesta inmune, modulan la acidificación del fagolisosoma, esto impide el funcionamiento de las hidrolasas, lo que le permite sobrevivir dentro del macrófago y replicarse. Esto favorece el establecimiento de la infección^{22, 39, 42}.

Cryptococcus neoformans, un hongo levaduriforme capsulado se adapta para sobrevivir en los compartimientos ácidos, no regula el pH del fagosoma. Se observó que no solo tolera pH bajos, sino que crece aún más rápido en ese medio que con un pH neutro o alcalino y resiste la acción de las enzimas lisosomales que funcionan a pH por debajo de 5.5.³⁵

Paracoccidioides brasiliensis es un hongo dimórfico que expresa una glicoproteína de membrana, Gp43. Esta proteína inhibe la función lítica del macrófago. Si se observa fagocitosis, sin embargo, no hay producción de NOS y ROS, lo que convierte a estas células en un reservorio del microorganismo.⁴⁵

Aún cuando la esporotricosis es la micosis más difundida en el mundo, los mecanismos de defensa del hospedero en respuesta a *Sporothrix schenckii* no han sido ampliamente estudiados, ni se cuenta con datos que indiquen si este patógeno cuenta con algún mecanismo de evasión que le permita realizar su transición a levadura, y, con ello, el establecimiento de la enfermedad. En estudios histopatológicos²⁵ se observó que los monocitos/macrófagos son importantes en la defensa del hospedero por su capacidad microbicida y su síntesis de citocinas.

La variedad de receptores presentes en el macrófago capaces de fagocitar al hongo, sugiere que dependiendo del receptor que identifique al patógeno es la inducción de la señalización. A la fecha, son pocos los estudios realizados para identificar los receptores involucrados en la fagocitosis de conidios *S. schenckii*.

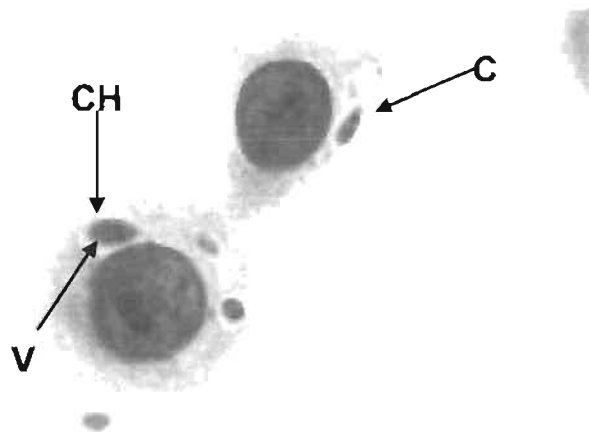


Fig. 10. Fagocitosis de conidios de *S. schenckii* por macrófagos de la línea celular U-937
Tinción de Giemsa, tiempo de interacción, 30 min. Conidios opsonizados con glucana.
(100 X) C: conidio, CH: conidio hinchado y V: vacuola

En el laboratorio se iniciaron los estudios de adhesión y fagocitosis de conidios hialinos no opsonizados⁴³. Se observó que los conidios son fagocitados con poca eficiencia (0.028) lo que sugiere que hay poco antígeno expuesto, razón por la cual se decidió opsonizar con carbohidratos como: laminarina, glucana (β -glucanas), manana (α -1-4-

manosa) y zimosán (β -glucanas, mananas, manoproteínas) que forman parte de la estructura de la pared celular en hongos y, tomando en cuenta que al entrar en contacto el conidio con el hospedero por medio de algún traumatismo, queda cubierto con componentes presentes en el suero como: proteínas del complemento, MBL^{2, 48, 59} (Mannan-Binding-Protein), Glucana³⁹, Pentrexinas¹⁶, entre otros que facilitan la unión, fagocitosis y posterior eliminación del patógeno.

▶▶ PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La esporotricosis es una micosis subcutánea o profunda producida por el hongo dimórfico *S. schenckii*. En México, esta enfermedad es frecuente, principalmente en el occidente del país. Se le ha relacionado como una enfermedad de tipo ocupacional, se presenta en campesinos, niños en edad escolar, cultivadores y vendedores de flores, cazadores, mineros, pescadores, empacadores de vidrio y loza, entre otros.

Aunque los mecanismos de defensa del hospedero contra *S. schenckii* no están del todo claros, se sabe que en la etapa aguda de la infección, los macrófagos tienen un papel importante como primera barrera de defensa, por su función fagocítica y de modulador entre la respuesta inmune innata y la adaptativa.

Conociendo la importancia del mecanismo de fagocitosis en la defensa del hospedero, en este trabajo se sugiere un modelo que permite explicar la relación entre el receptor que reconoce al hongo y el efecto biológico que desencadena para la eliminación eficiente del patógeno.

▶▶ OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el proceso de unión y fagocitosis de conidios de *Sporothrix schenckii* a receptores de carbohidratos en macrófagos humanos de la línea celular U-937.

▶▶ OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterización de la unión de los conidios de *Sporothrix schenckii* a los macrófagos en presencia de diferentes opsoninas.
2. Caracterización de la fagocitosis de conidios de *Sporothrix schenckii* en presencia de diferentes opsoninas.

▶▶ HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si los macrófagos expresan receptores específicos en su superficie, capaces de reconocer a los carbohidratos presentes en los microorganismos patógenos, entonces debe existir un receptor, o receptores, mediante el cual *Sporothrix schenckii* sea reconocido y fagocitado preferentemente, facilitando la eliminación del hongo por diversos mecanismos ligados a la vía de señalización del receptor.

capítulo

3

**Materiales
y
métodos**

Parte Experimental

Material

1. Material de laboratorio utilizado

- Buchner de porcelana.
- Cubreobjetos de 12 mm. de diámetro.
- Cubreobjetos de 22 X 22 μm .
- Filtros de membrana 0.22 μm estériles.
- Kitasato de 500 y 1000 mL
- Micropipeta de 100-1000 μl .
- Micropipeta de 20-200 μl .
- Micropipeta de 0.5-10 μl .
- Pipetas de 5 ml.
- Pipetas de 10 ml.
- Placas de 6 pozos.
- Placas de 24 pozos.
- Tubos eppendorf.
- Tubos falcon de 50 ml.
- Tubos de 15 ml.
- Vasos de precipitado de 100, 250 y 1000 ml.

2. Equipo

- Autoclave.
- Incubadora a 28°C.
- Incubadora a 37°C.
- Centrifuga Becton Dickinson.
- Centrifuga para placas sorvall RT 6000 D. Dupont Instruments.
- Centrifuga sol-bat.
- Campana de flujo laminar (Nuair).

3. Reactivos

- Agua destilada estéril.
- Gliceraldehído al 40% en PBS.
- Laminarina.
- Glucana.
- Manana.
- Zimosán.
- Sulfato de Estreptomicina.
- Penicilina G.
- Etanol absoluto.
- Etanol al 70%.
- Cloruro de benzalconio al 1% en etanol.
- Suero fetal bovino cualificado
- PMA.

4. Medios de cultivo

- Medio RPMI.
- Medio Mínimo.
- Medio PDA.
- BHI agar.
- Agar dextrosa de Sabouraud (ADS)

5. Material Biológico

- Línea celular de macrófagos humanos U-937.
- Cepa 257 de *Sporothrix schenckii*.
- Suero hiperinmune

Métodos

- **Cultivo celular**

Se utilizó la línea celular de monocitos humanos U-937. La cual fue mantenida en suspensión utilizando medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% y una mezcla de antibióticos.

El cultivo celular se mantuvo a 37°C y 5% de CO₂. **(Ver apéndice III)**

- **Diferenciación de Células**

Las células U-937 fueron diferenciadas cultivándolas durante 48 horas con medio completo conteniendo PMA a una concentración de 10nM e incubadas con 5% de CO₂ a 37°C en cubreobjetos colocados en cajas de 24 pozos. **(Ver apéndice III)**

- **Condiciones de crecimiento de *S. schenckii***

Se utilizó la cepa 257, aislada de la naturaleza, procedente de México, la cual fue seleccionada por su capacidad de producir pigmento en el medio PDA. Fue crecido en Medio mínimo y Medio PDA durante siete días a 28°C.

- **Obtención de conidios**

Los conidios de *S. schenckii* se obtuvieron agregando 5 mL de agua estéril al cultivo de siete días, y raspando la superficie del medio. Se filtró al vacío para eliminar el micelio.

El filtrado se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm. El pellet fue resuspendido en el menor volumen de PBS para su cuantificación utilizando la cámara de Neubauer. **(Ver apéndice III)**

- **Opsonización de conidios**

Los conidios cuantificados de *S. schenckii* fueron incubados durante 30 minutos con el carbohidrato específico a 28°C a una concentración de 100 µg/ ml por cada 1×10^7 conidios. **(Ver apéndice III)**

- **Identificación de receptores**

- **Índice de adhesión**

Para establecer el índice de adhesión, las células fueron sincronizadas a diferentes tiempos a 4°C, con conidios hialinos, sin opsonizar y opsonizados a una multiplicidad de infección 1:40 (2×10^5 células: 8×10^6 conidios). Este dato fue obtenido por experimentos previos, usando diferentes multiplicidades de infección. **(Ver apéndice III)**

- **Índice de Fagocitosis**

Los monocitos, una vez infectados con los conidios, fueron incubados a 4°C durante el tiempo en el cual se observó el mayor número de conidios adheridos y, posteriormente, fueron incubados a 37°C, a diferentes tiempos, utilizando conidios hialinos opsonizados o sin opsonizar. **(Ver apéndice III)**

- **Tinción de Giemsa**

Después de transcurrido el tiempo fijado para el experimento, los cubreobjetos se fijan con metanol absoluto, y se les coloca la solución de Giemsa en una concentración 1:15 durante 30 minutos, posteriormente, se enjuaga con agua destilada y se monta con Glicerol al 40%. **(Ver apéndice III)**

- **Determinación del Índice de Adhesión**

Para determinar el índice de adhesión, se cuentan al azar 200 macrófagos, ya sea que tengan conidios unidos o no.

El índice (I) nos indica el número de macrófagos que han unido al menos un conidio. Y se calcula de la siguiente forma:

$I = \frac{\text{Número de macrófagos que han unido al menos un conidio}}{\text{Número de macrófagos totales (200)}}$

- **Determinación del Índice de Fagocitosis**

Para determinar el índice de fagocitosis, se cuentan, al igual que en el de adhesión, al azar 200 macrófagos, ya sea que tengan conidios internalizados o no.

El índice (I) nos indica el número de macrófagos que han fagocitado al menos un conidio. Y se calcula de la siguiente forma:

$I = \frac{\text{Número de macrófagos que han fagocitado al menos un conidio}}{\text{Número de macrófagos totales (200)}}$

- **Prueba estadística**

Para determinar si la diferencia entre los índices de adhesión y fagocitosis son significativos, dependiendo del carbohidrato utilizado, se realizó la prueba estadística de T de student utilizando un programa de cómputo llamado "R", siendo significativo si la probabilidad es menor a 0.05.

capítulo

4

Resultados

Resultados

Para caracterizar la cinética de unión, se realizó la interacción conidio-macrófago a 4°C (Ver apéndice III). En la tabla 3 se observa que al opsonizar los conidios se tiene una cinética tiempo dependiente, alcanzando un máximo a los 30 min. (Fig. 11) en todos los casos. Antes de realizar estas interacciones se determinó la concentración de carbohidratos que se utilizaría y la viabilidad de los conidios utilizando diferentes concentraciones. La concentración de carbohidratos utilizada fue de 100 µg/ml por cada 1×10^7 conidio.

Aunque hay un aumento en el índice de adhesión en comparación con los conidios no opsonizados, al comparar los valores obtenidos entre si, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$), a excepción de zimosán y laminarina ($p < 0.05$), ya que, a 4°C lo que se tiene es una unión específica con el receptor por el cual el conidio será internalizado. Zimosán, al ser una mezcla de carbohidratos, puede ser reconocido por diferentes receptores, como TL2, Dectin-1 o MR, en cambio, laminarina solo es reconocido por un receptor, por lo que su índice depende de la disponibilidad del mismo.

Tabla 3. Índice de adhesión de conidios hialinos de *Sporothrix schenckii* opsonizados con diferentes carbohidratos

CARBOHIDRATOS UTILIZADOS				
Tiempo (min.)	Laminarina	Manana	Zimosán	Glucana
5	0.1695±0.1733	0.1740±0.0718	0.2460±0.0163	0.2378±0.0144
15	0.2112±0.0154	0.2285±0.0195	0.3018±0.0288	0.2570±0.0425
30	0.2901±0.0103	0.3466±0.0162	0.3806±0.0385	0.3937±0.0462
60	0.2132±0.0190	0.2100±0.0248	0.3010±0.0253	0.2963±0.0165
90	0.0671±0.0260	0.1439±0.0564	0.2753±0.0527	0.2385±0.0385

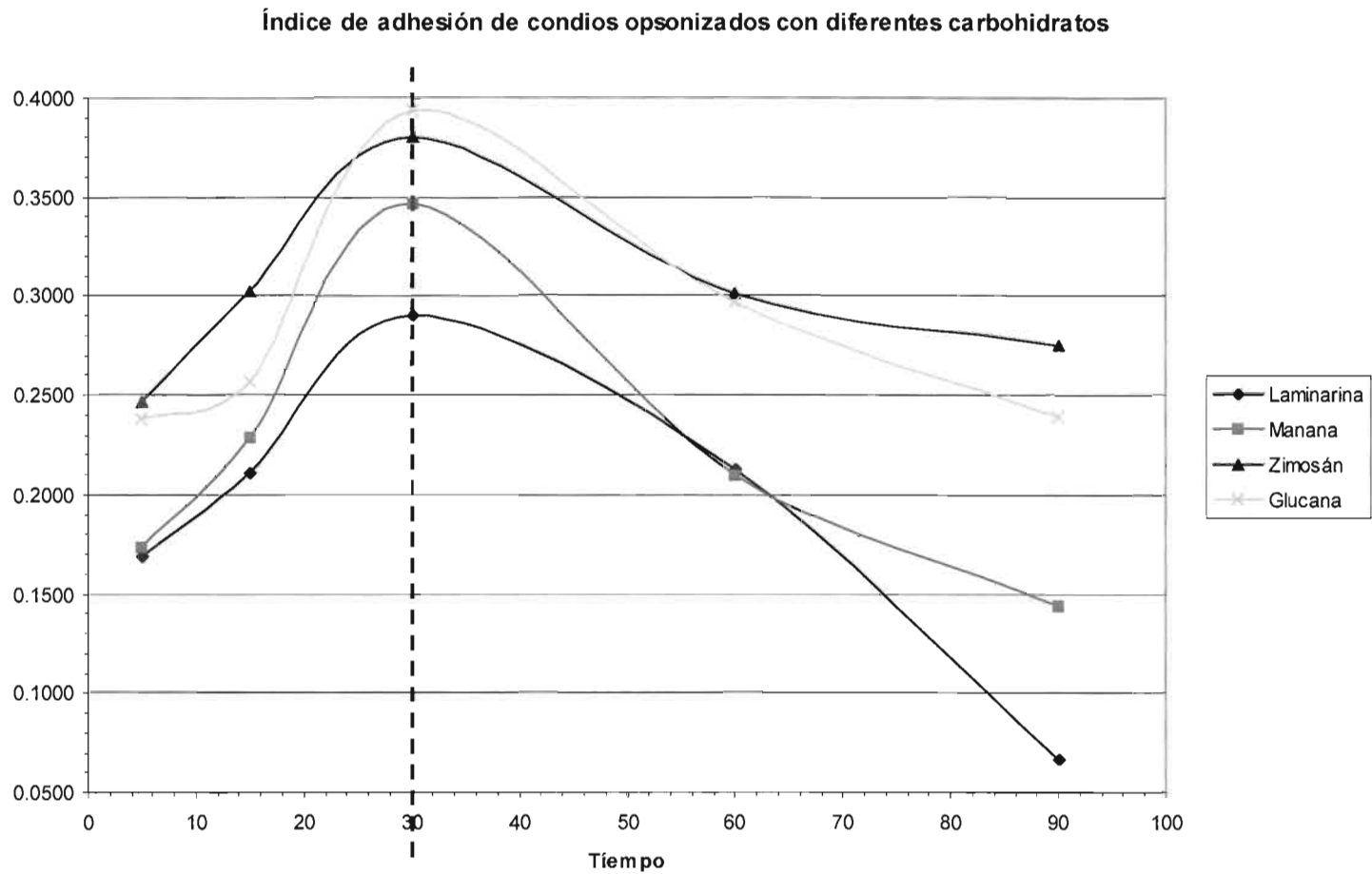


Fig. 11. Índice de adhesión de conidios hialinos de *Sporothrix schenckii* opsonizados con diferentes carbohidratos en macrófagos humanos U-937. La línea punteada indica el tiempo al cual se observa el mayor índice de adhesión de conidios opsonizados con diferentes carbohidratos. La infección se realizó en una MOI de 1:40 (Ver materiales y métodos y apéndice III)

Tabla 4. Índice fagocítico de conidios hialinos de *Sporothrix schenckii* opsonizados con diferentes carbohidratos

CARBOHIDRATOS UTILIZADOS				
Tiempo (min.)	Laminarina	Manana	Zimosán	Glucana
5	0.1680±0.0673	0.2085±0.0127	0.2510±0.0131	0.2354±0.0067
15	0.2377±0.0371	0.2525±0.0131	0.3018±0.0610	0.2704±0.0098
30	0.3013±0.0343	0.3500±0.0164	0.3720±0.0453	0.4073±0.0473
60	0.1923±0.0460	0.2830±0.0311	0.2942±0.0293	0.3022±0.0186
90	0.1103±0.0469	0.1825±0.0124	0.2540±0.0168	0.2098±0.0343

Una vez que se determinó el tiempo en el cual se unen el mayor número de conidios a los macrófagos, se analizó la fagocitosis de los conidios, la cual es un proceso activo que requiere temperatura (37°C).

Después de realizar la interacción conidio-macrófago durante 30 min. a 4°C, se incubó a 37°C en los tiempos indicados en la tabla 4. (Ver apéndice III).

También se muestran los valores del índice fagocítico (Ver materiales y métodos), observándose de nuevo una cinética tiempo dependiente, encontrando un máximo a los 30 min. (Fig. 12) y una disminución a los 60 y 90 minutos.

Si se comparan los resultados de la tabla 3 y la tabla 4, se tiene que los índices de adhesión y fagocitosis son muy parecidos, lo que indica la especificidad del proceso, porque, a 4°C, donde se tiene adhesión, el conidio se une al receptor específico, y a 37°C se tiene que solo lo que se une es internalizado. También se observa una disminución a los 60 y 90 minutos, lo cual puede deberse a la saturación del sistema y, al probable procesamiento de los conidios (Fig. 19).

Índice fagocítico de conidios opsonizados con diferentes carbohidratos

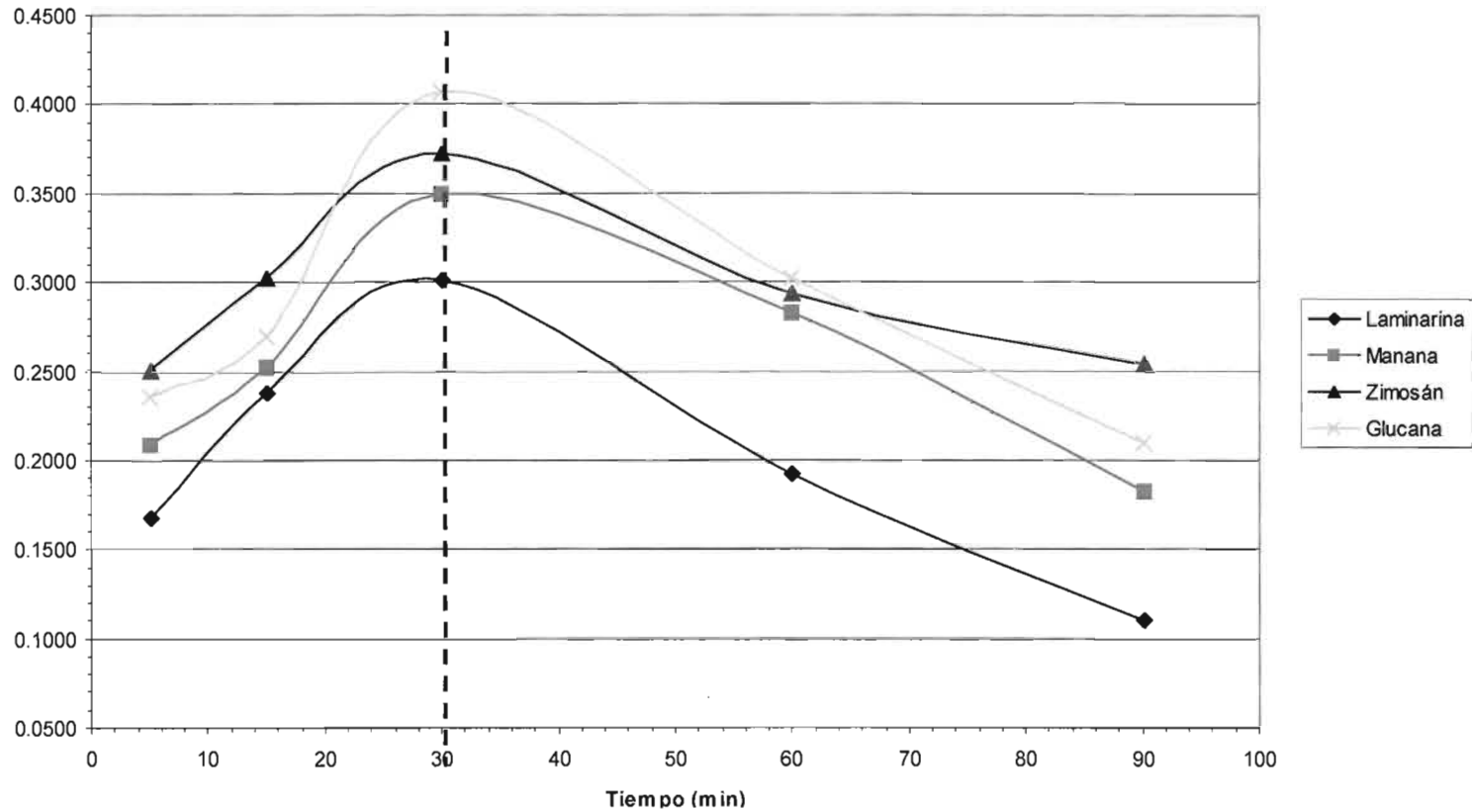


Fig. 12. Índice fagocítico de conidios hialinos de *Sporothrix schenckii* opsonizados con diferentes carbohidratos en macrófagos humanos U-937.

La línea punteada indica el tiempo al cual se observa el mayor índice de adhesión de conidios opsonizados con diferentes carbohidratos. La infección se realizó en una MOI de 1:40 (Ver materiales y métodos y apéndice III)

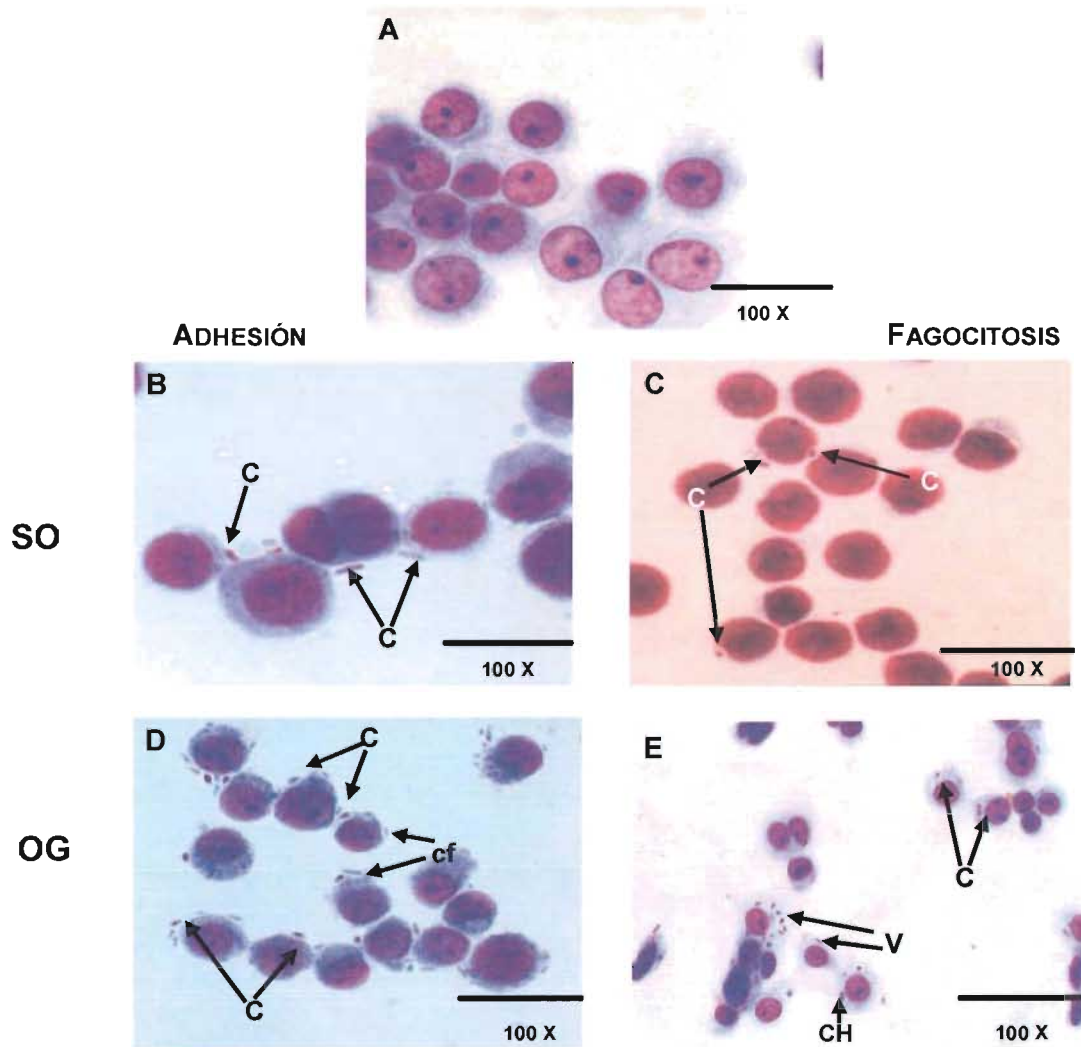


Fig. 13 Adhesión y fagocitosis de conidios de *S.schenckii* sin opsonizar y opsonizados con Glucana. A) Control de macrófagos U-937 teñidos con Giemsa. B) Adhesión de conidios de *S.schenckii* sin opsonizar (SO) a los 30 min. C) Fagocitosis de conidios de *S. schenckii* sin opsonizar (SO) a los 30 min. D) Adhesión de conidios de *S. schenckii* opsonizados con Glucana (100 μ g/ml.por cada 1×10^7 conidios; Ver apéndice III)(OG) a los 30 min. E) Fagocitosis de conidios de *S.schenckii* opsonizados con Glucana, a los 30 minutos (OG) (Ver apéndice III). C: conidio, CH: conidio hinchado, V: vacuola, cf: copa fagocítica.

La adhesión y fagocitosis de los conidios sin opsonizar es poco eficiente, como se observa en la fig. 13 A y B, por esa razón se decidió opsonizar utilizando carbohidratos que son componentes estructurales de la pared celular del hongo.

En la fig. 13 C y D se muestran la adhesión y la fagocitosis de los conidios opsonizados con glucana, a los 30 minutos de interacción, que es cuando se presentan los índices de adhesión y fagocitosis más altos. Se puede apreciar que hay una mayor cantidad de conidios adheridos y fagocitados, estos últimos delimitados en una vacuola endocítica.

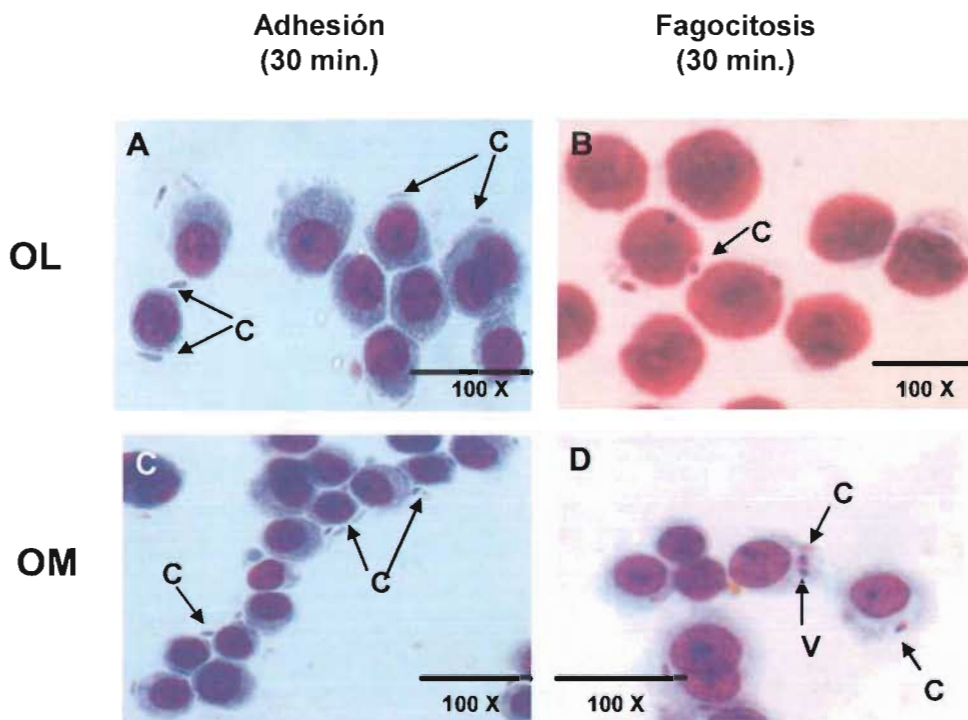


Fig. 14 Adhesión y fagocitosis de conidios de *S.schenckii* opsonizados con laminarina y manana.

A) Adhesión de conidios opsonizados con Laminarina (100 µg/ml por cada 1×10^7 conidios; Ver apéndice III) (OL). B) Fagocitosis de conidios de *S.schenckii* opsonizados con Laminarina. (OL) C) Adhesión de conidios de *S. schenckii* opsonizados con Manana (100 µg/ml por cada 1×10^7 conidios; Ver apéndice III) (OM).D) Fagocitosis de conidios de *S. schenckii* opsonizados con Manana (OM). C: conidios, V: vacuola.

En la fig. 14 A y B se observa la adhesión y fagocitosis de conidios opsonizados con laminarina. Si bien los índices de unión e internalización de los conidios opsonizados con laminarina aumentan en relación a los no opsonizados, al opsonizar con manana, fig. 14 C y D, los índices aumentan (Ver tabla 3 y 4 y Fig. 11 y 12), también hay presencia de conidios en vacuolas endocíticas.

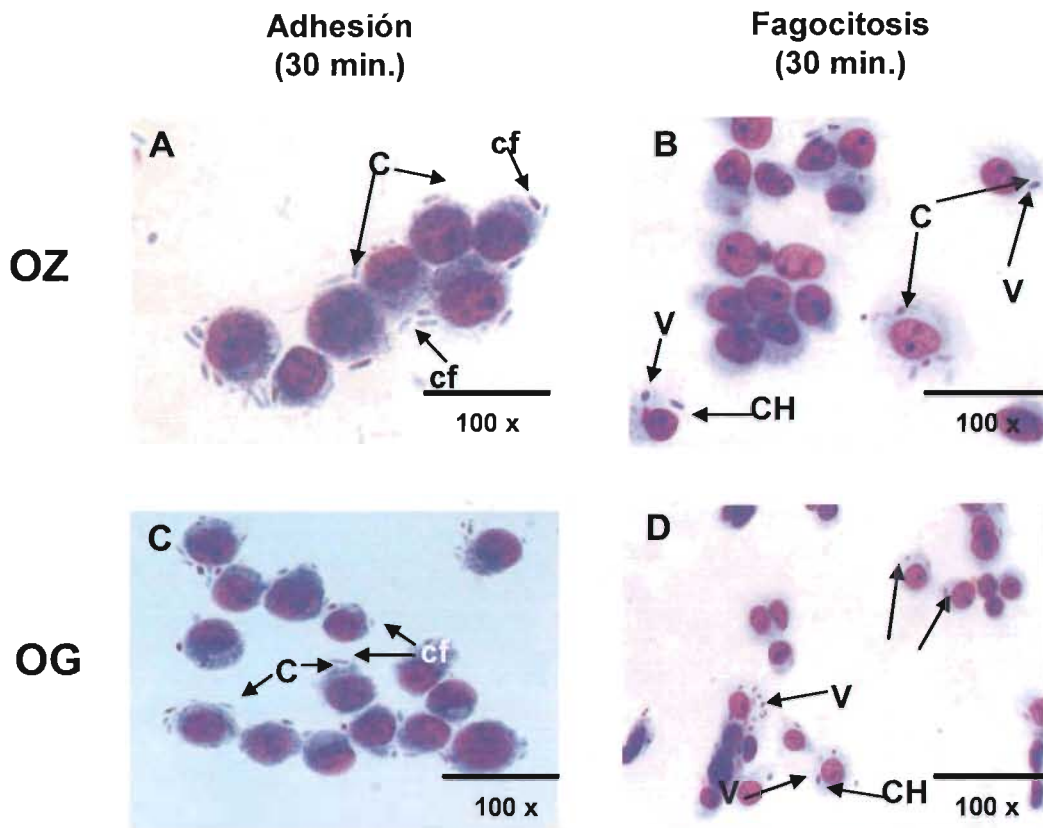


Fig. 15 Adhesión y fagocitosis de conidios de *S.schenckii* opsonizados con zimosán y glucana.

A) Adhesión de conidios opsonizados con Zimosán (100 $\mu\text{g/ml}$ por cada 1×10^7 conidios; Ver apéndice III) (OZ). B) Fagocitosis de conidios de *S.schenckii* opsonizados con Zimosán (OZ). C) Adhesión de conidios de *S. schenckii* opsonizados con Glucana (100 $\mu\text{g/ml}$ por cada 1×10^7 conidios; Ver apéndice III). (OG)D) Fagocitosis de conidios de *S. schenckii* opsonizados con Glucana (OG). C: conidio, CH: conidio hinchado, V: vacuola, cf: copa fagocítica

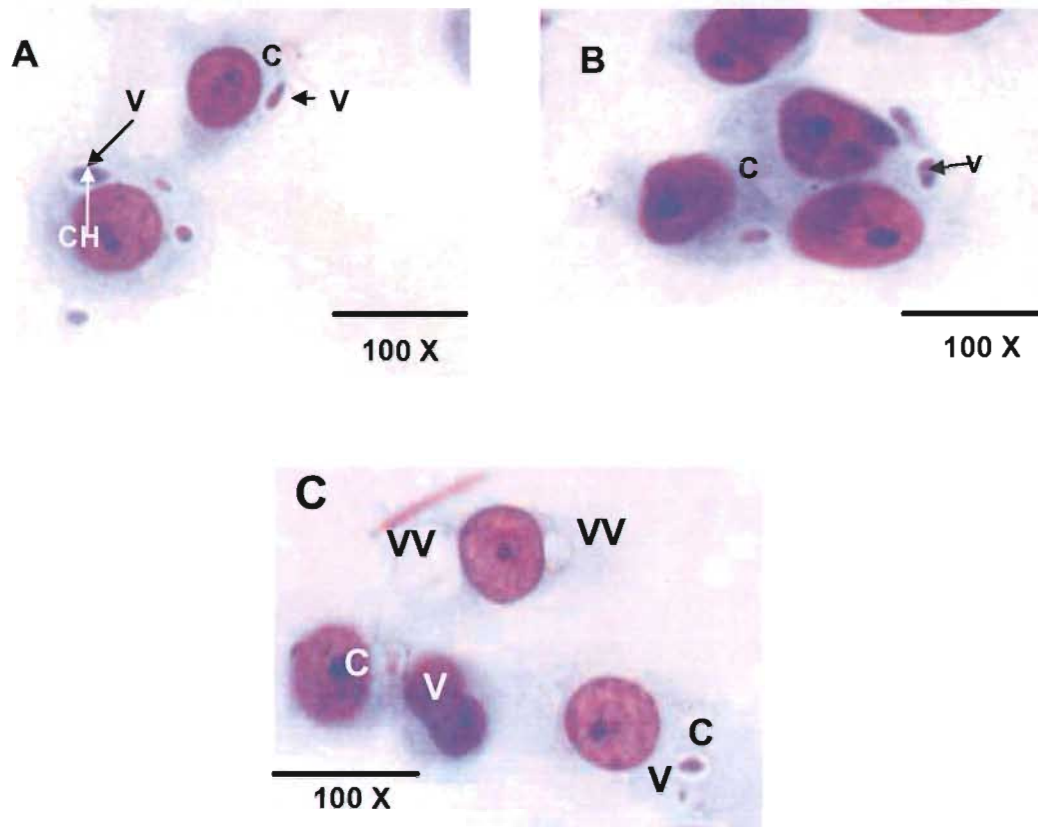


Fig. 16. Fagocitosis de conidios opsonizados con Glucana y Zimosán.

A) y B) Al opsonizar con Glucana, a los 30 minutos, se observan la formación de vacuolas, las cuales contienen al hongo, al igual que con C) Zimosán, aunque en menor número. V: vacuola, C: conidio, CH: conidio hinchado, VV: Vacuola vacía.

Los índices de adhesión y fagocitosis obtenidos al opsonizar con zimosán (Fig. 15 A y B) y glucana (Fig. 15 C, D) son los más altos (tabla 3 y 4, fig. 9 y 10). Glucana es el mayor componente estructural de la pared celular de los hongos, por lo que es reconocido y procesado con mayor eficiencia. Zimosán está compuesto por β -glucanas, mananas y manoproteínas, por lo que es reconocido por diversos receptores, lo que hace que su procesamiento sea rápido y eficiente, además de que este compuesto ha sido usado durante varios años como un estimulante del sistema inmune.

Al opsonizar con estos carbohidratos, además de observar una internalización más eficiente, se puede observar claramente, la formación de vacuolas endocíticas bien delimitadas (Fig. 16 A, B y C) donde se encuentran los conidios, algunos de ellos hinchados, lo que puede ser una indicación que están a punto o están siendo procesados.

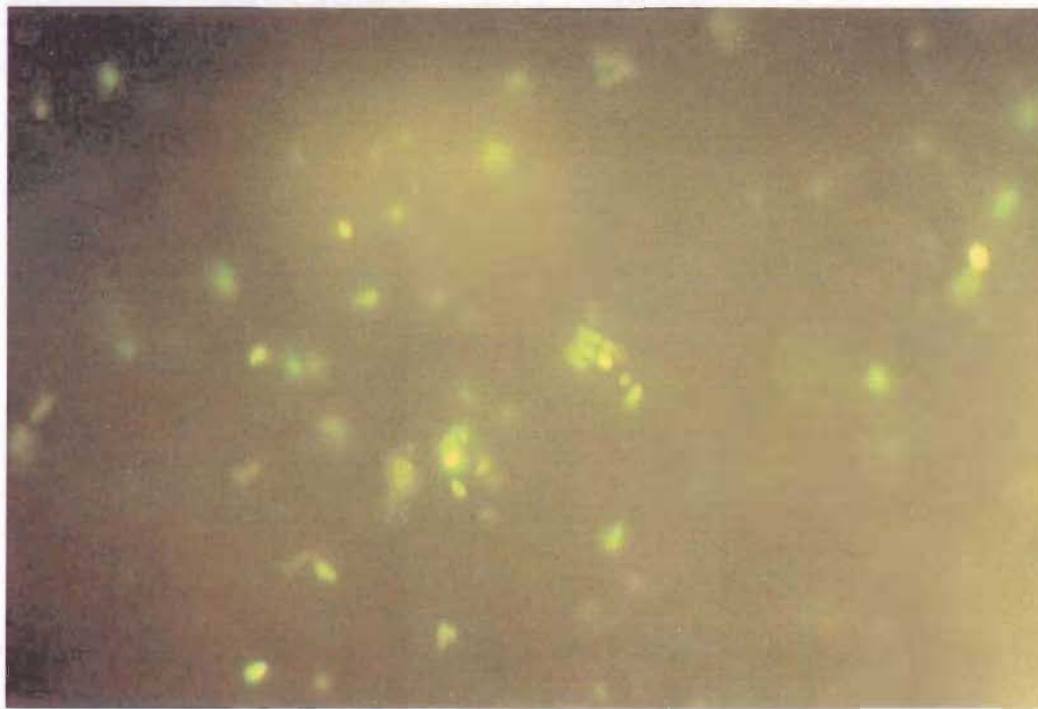


Fig. 17. Conidios hialinos de *Sporothrix schenckii* marcados con FITC

Para diferenciar los conidios unidos de los internalizados, se marcaron los conidios con FITC (Fluorescein isothiocyanate).^{22, 26}

FITC es un fluorocromo color verde (Fig. 17) sensible a pH. Después de la interacción de los conidios opsonizados y marcados con los macrófagos a 37°C durante la cinética, se incubaron las preparaciones con azul tripano para eliminar la fluorescencia de los conidios que no habían sido internalizados³⁵, diferenciando así a los conidios fagocitados de los que están fuera.

Como se muestra en la figura 18 B, al opsonizar con suero inmune, se distinguen los conidios que han sido internalizados, ya que no han sido afectados por el azul tripano, en cambio, lo que se observó al opsonizar con glucana, en la figura 18 C y D es un cambio de color en el FITC, de verde a rojo a tiempos relativamente cortos (5-15 min.), lo que sugiere que en la vacuola endocítica en la que se encuentra ha ocurrido un cambio de pH, lo cual indica que la vía de señalización del receptor incluye la formación de radicales libres y la disminución del pH, por ello se optó por utilizar la tinción de Giemsa para realizar los experimentos.

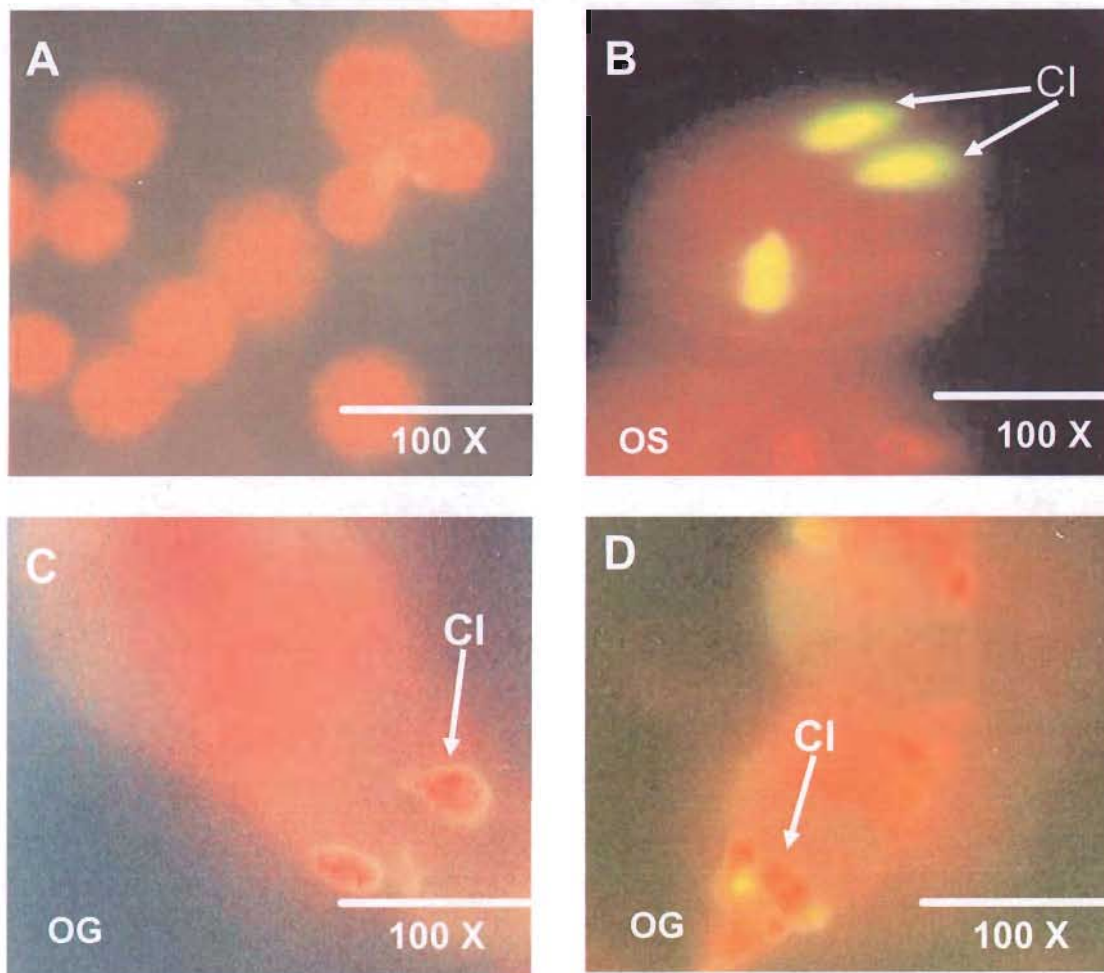


Fig 18. Fagocitosis de conidios opsonizados y marcados con FITC.

A) Control, las células U-937 presentan autofluorescencia. B) Fagocitosis de conidios opsonizados con suero inmune marcados con FITC. C y D) Fagocitosis de conidios opsonizados con glucana y marcados con FITC. OS: opsonizado con suero. OG: opsonizado con glucana. CI: Conidio internalizado

Con el fin de analizar la fagocitosis de los conidios de *Sporothrix schenckii* se llevó a cabo la microscopía electrónica de los macrófagos infectados con el hongo.

En la figura 19 se observa un macrófago de la línea celular U-937 infectado por el hongo. Puede apreciarse que los conidios se encuentran dentro de vacuolas endocíticas y que la mayoría se encuentran hinchados, tal vez previo al procesamiento por los macrófagos, como lo sugiere la presencia de la vacuola y de la estructura de pared celular del hongo vacías.

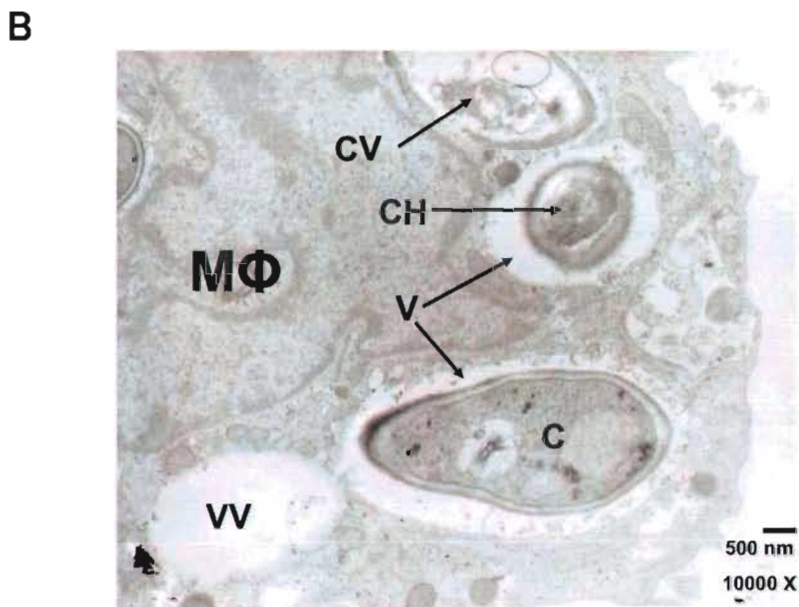
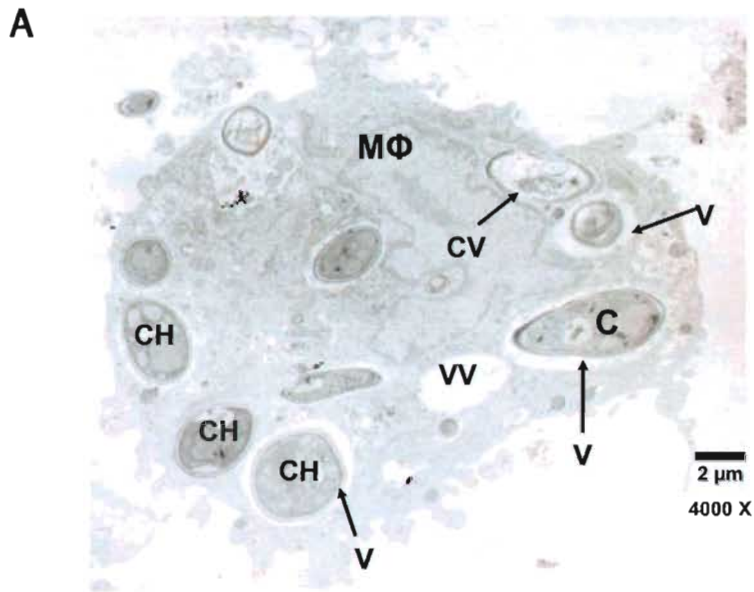


Fig. 19. Microscopía electrónica de macrófagos U-937 infectados con conidios de *S. schenckii*.

Los macrófagos fueron infectados con conidios viables de *Sporothrix schenckii* (MOI 1:5) 48 horas antes de ser procesados para microscopía electrónica.

a) Los conidios fueron internalizados por los macrófagos y muestran diversas morfologías.

b) Se observa que el conidio fagocitado se encuentra dentro de una vacuola endocítica y que ha sido procesado, ya que se aprecia que solo la estructura de la pared celular se encuentra presente.

CH: conidio hinchado, CV: conidio vacío, C: conidio, V: vacuola, VV: vacuola vacía, MΦ: macrófago.

capítulo

5

Discusión

Discusión

En los intentos por explicar los mecanismos de defensa del hospedero contra *Sporothrix schenckii* diversos grupos de investigación han evaluado las interacciones de este hongo utilizando la fase levaduriforme, que corresponde a la fase infectiva que se desarrolla dentro del hospedero.

En estudios histológicos²⁵ de lesiones crónicas se ha encontrado al hongo en su fase de levadura gemante, lo que sugiere que la fase infectiva de micelio y/o conidios sobrevive en el hospedero y tiene las condiciones ambientales necesarias para llevar a cabo la transición dimórfica hacia levadura. En estas lesiones se han identificado diferentes tipos celulares del sistema inmune formando cuerpos asteroides, con células gemantes en el centro y un halo de radiación de materia eosinófila, generalmente está compuesto de tres zonas, donde abundan polimorfonucleares, neutrófilos, linfocitos, células gigantes parecidas a Langerhans, fibroblastos, y, principalmente, macrófagos, dando como resultado una lesión granulomatosa, ya que el hongo queda limitado por estas células. Esto sugiere que el paciente cursa con una buena respuesta inmune, y por lo tanto tiene una gran tendencia a la curación espontánea⁸.

Los macrófagos son una pieza clave en la respuesta inmune innata, no solo por ser los principales responsables de fagocitar y eliminar a los patógenos, sino porque también coordinan la respuesta inmune, sintetizando mediadores de la inflamación y citocinas, las cuales están encaminadas a modular la respuesta inmune adaptativa.^{1, 32, 48}

La actividad microbicida de los macrófagos depende en general, de su habilidad para fagocitar a los patógenos y destruirlos una vez que han sido ingeridos. Es claro que el reconocimiento por parte del sistema inmune innato es una parte importante de este proceso, y es mediado estructural y funcionalmente por diversos receptores que pueden desencadenar una variedad de mecanismos de defensa como: activación de com-

plemento, fagocitosis y/o expresión de citocinas proinflamatorias, estallido respiratorio, entre otros¹.

La línea celular U-937 (Utilizada en este trabajo) al diferenciarse en macrófagos expresa receptores involucrados en la unión e internalización de microorganismos como bacterias y hongos⁵³. Algunos de estos receptores son aquellos que unen residuos de carbohidratos presentes en las estructuras de pared de los patógenos.

En este trabajo se analizó la cinética de unión y fagocitosis de *Sporothrix schenckii* en macrófagos U-937 utilizando conidios sin opsonizar y opsonizados.

La unión y fagocitosis de conidios no opsonizados fue poco eficiente (0.028)¹³ (Ver figuras 13 B y C), lo que sugirió que *Sporothrix schenckii* en su fase infectiva expone antígenos que son poco reconocidos por la línea celular de macrófagos humanos U-937.

Esto sugirió que el hongo requiere de moléculas que faciliten su unión y fagocitosis, por ello se decidió opsonizar con diferentes carbohidratos como laminarina, glucana (β -glucanas), manana (α -1-4-manosa) y zimosán (mezcla compleja de carbohidratos de la pared celular de *S. cerevisiae*), que son parte primordial de la estructura de la pared celular en hongos.

Para comprobar la especificidad del proceso de unión y fagocitosis, en el laboratorio se realizaron estudios de inhibición de fagocitosis, bloqueando los receptores específicos. Al bloquear los receptores con glucana y manana, el índice fagocítico disminuyó de 0.4073 con glucana a 0.0383 y con manana de 0.3500 a 0.053³, lo que indica que al opsonizar los conidios con glucana y manana son reconocidos por un receptor específico.

Una vez que se confirmó que la unión y fagocitosis mediada por receptores es específica, se analizó la adhesión a 4°C y la fagocitosis a 37°C.

A 4°C se observa que el índice de adhesión máximo se alcanza a los 30 minutos y disminuye a los 60 y 90 minutos, lo que sugiere que a tiempos largos se lleva a un equilibrio entre conidios unidos- no unidos, por la ley de acción de masas, o también a que al opsonizar los conidios se utilizó un exceso de opsonina, la cual a tiempos largos puede solubilizarse, bloqueando los receptores, impidiendo la unión adecuada del conidio al receptor. Por otra parte, el proceso activo de internalización a 37°C (Fagocitosis) llegó a saturación a 30 minutos. A tiempos más largos (60 y 90 minutos) el índice fagocítico disminuye. Estos resultados sugieren el procesamiento de los conidios. (Fig. 13 y 19 A y B).

Al analizar los resultados obtenidos, es claro que al opsonizar se tiene una mayor eficiencia en la unión y fagocitosis de los conidios, observando además diferentes eventos asociados al carbohidrato utilizado como opsonina y al receptor involucrado en el reconocimiento de este.

Los componentes de la inmunidad innata reconocen estructuras que son características de los patógenos⁷. Los organismos patógenos, incluyendo bacterias, hongos, virus y parásitos, poseen un arreglo específico de carbohidratos en su superficie.

Estos carbohidratos estructurales son reconocidos por un amplio espectro de receptores expresados en los macrófagos, capaces de reconocer estas moléculas. Algunos de estos receptores son capaces de mediar la fagocitosis y/o generar señales intracelulares para la activación de los procesos de procesamiento y destrucción del patógeno.

Uno de estos receptores capaces de reconocer carbohidratos presentes en los microorganismos es el receptor de β -glucanas, Dectin-1^{9,11} que es expresado en mayor número en los macrófagos¹¹.

Este receptor es capaz de reconocer los enlaces β -1-3 y/o β -1-6 en la glucana, además de mediar los efectos biológicos, como es la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS Y NOS), desencadenando la muerte del patógeno^{10,20}.

Al opsonizar los conidios con glucana (β -D-1-3. glucosa, insoluble) fueron reconocidos por este receptor. Para comprobar si hay producción de NOS y ROS, una vez que los conidios fueron opsonizados, se marcaron con FITC (Fig. 17). FITC es un fluorocromo sensible a pH, el cual a pH básico (9.4) presenta color verde. Al realizar las interacciones conidio-macrófago a 37°C, se observó un cambio de color de verde a rojo (Fig. 18 C y D). Estos resultados nos permitieron, de forma cualitativa, saber que hay un cambio de pH debido a la formación de radicales libres, además de que el proceso es sumamente rápido, ya que a partir de los 5 minutos se observa este cambio de color, lo que indica que la producción de radicales libres se da de manera inmediata.

Se ha reportado que Dectin-1 y TLR2 colaboran en el reconocimiento y destrucción de patógenos, ya que TLR2 potencia la actividad de Dectin-1 al activar NF κ B y producir TNF- α e IL-12, lo cual también es sugerido por los resultados obtenidos al opsonizar con glucana, carbohidrato con el cual se obtiene el mayor índice de adhesión y fagocitosis (0.4073) (Ver tabla 4), lo que nos indica que la fagocitosis y el procesamiento del hongo es más efectivo. (Ver figuras 11, 12, 15 C y D).

Laminarina es una β - glucana soluble (β -D-1-3-glucana con ramificaciones β -1-6 cada 10 subunidades de glucosa) capaz de inhibir a Dectin-1^{10,20}. Este receptor es capaz de reconocer al conidio opsonizado, sin embargo, no lo fagocita. Esto hubiera dado como resultado una nula fagocitosis al realizar las interacciones a 37°C, sin embargo, se observaron conidios internalizados, aunque en menor proporción que al opsonizar con glucana (0.3013) (Ver tabla 4 y figuras 14 A y B). Esto indica que laminarina es reconocida preferentemente por otro receptor.⁴¹.

Otro de los receptores asociados al reconocimiento de motivos de carbohidratos son los receptores semejantes a Toll (Toll-like, TLR), la cual es una familia constituida por 11 miembros que reconocen una gran cantidad de componentes microbianos, pero en especial TLR2, TLR4 y TLR6 son capaces de reconocer estas moléculas, en particular β -glucanas y zimosán.

Al activarse los receptores por el reconocimiento del antígeno, se desencadena una serie de señalizaciones intracelulares que culminan con la liberación de NF κ B, un factor de transcripción, y la producción de citocinas pro-inflamatorias, como TNF- α , que activa a los macrófagos, favoreciendo el estallido respiratorio, el aumento en la producción de MHCII y el aumento en la presentación de antígeno, entre otros.

Los resultados obtenidos al opsonizar con laminarina están dados principalmente por la identificación de los receptores semejantes a Toll, además, el procesamiento de los conidios es más lento, debido a la serie de eventos posteriores a la activación del receptor y al reciclamiento de estos a la superficie del macrófago.

El receptor de manosa (MR), que pertenece a la familia de receptores de manosa, es expresado en macrófagos y células dendríticas. Tiene una gran afinidad por los residuos de manosa, fucosa, N-acetilglucosamina y xilosa, que están presentes en varios patógenos.

Este receptor está asociado a la modulación de la respuesta inmune adaptativa, ya que entre las citocinas que produce al reconocer al antígeno, se encuentran IL-12 e IL-6, las cuales guían la respuesta inmune a una respuesta de tipo celular (Th1). La producción de IL-1 y TNF- α , aumenta la adhesión celular, lo que ayuda a que un mayor número de macrófagos llegue al sitio de la inoculación, inicia las reacciones de fase aguda y la producción de factores de crecimiento y diferenciación para varias células como los linfocitos. En el caso de los macrófagos, aumenta la activación de la fagocitosis y de los diversos mecanismos citocidas.

Al opsonizar los conidios con manana fueron reconocidos específicamente por el MR^{19, 47}. Estos conidios son procesados de forma ligeramente más eficiente (0.3500) que los reconocidos por el receptor Toll-like (0.3013), posiblemente porque, aunque no es necesaria la activación de una cascada de señalización, si se requiere de un proceso de señalización, aunque más directo, para la producción de citocinas. (Ver tabla 4 y figuras 11, 12 y 14).

Cuando los conidios son opsonizados con zimosán (β -glucanas, mananas, manoproteínas) son reconocidos por todos los receptores antes descritos, activando simultáneamente todas las vías de señalización, haciendo que la fagocitosis y el procesamiento del hongo sea un proceso más efectivo (ver tablas 3 y 4 y figuras 11, 12, 15 A y B) como puede verse en la fig. 16 C, donde se observa la presencia de vacuolas vacías en los macrófagos, lo que sugiere que el conidio ha sido procesado eficientemente.

Este carbohidrato actuó como control positivo, ya que, al ser reconocido por todos los receptores, nos permitió conocer la capacidad fagocítica del sistema.

Al realizar el análisis estadístico entre los índices de adhesión y fagocitosis obtenidos al utilizar los diferentes carbohidratos como opsoninas, se encontró que no hay diferencias significativas entre ellos ($P > 0.05$)

Estadísticamente, lo que estos resultados indican es que da lo mismo opsonizar con laminarina que con glucana; sin embargo, biológicamente no es así, porque dependiendo del receptor por el cual sea reconocido e internalizado el conidio, es la vía de señalización que involucrada en el proceso, que puede ser más o menos eficiente.

Lo que es muy claro es que los conidios *per se* no son identificados por los macrófagos, sino que requieren ser opsonizados para ser reconocidos y fagocitados; esto sugiere que el conidio y/o la hifa debe ser recubierto al entrar en contacto con el hospedero con partículas presentes en el suero como: proteínas del complemento, MBL (Mannose Binding Protein)^{31, 44}, glucana³⁷, pentreoxinas¹⁵, albúmina, defensinas, proteína C reactiva, entre otros^{1, 2, 32, 33}.

Si los conidios y/o las hifas no son opsonizados, no serán adecuadamente reconocidos, lo que tal vez da la oportunidad al hongo de realizar su transición dimórfica y replicarse, estableciendo así la infección.

capítulo

6

Conclusiones

Conclusiones

- Los conidios de *Sporothrix schenckii* no son identificados si no han sido opsonizados. Al opsonizar con carbohidratos son unidos e internalizados de manera más eficiente que los conidios no opsonizados.
- El mayor índice de unión (4°C) en el caso de todos los carbohidratos se detectó que es a los 30 minutos, siendo los conidios opsonizados con glucana los que presentaron el índice más alto.
- El mayor índice de fagocitosis (37°C) también se presentó a los 30 minutos, y se observa que solo lo que previamente se une a 4°C es lo que se internaliza. Nuevamente, los conidios opsonizados con glucana presentaron el índice de fagocitosis más alto.
- La diferencia entre los índices obtenidos está dada, principalmente, por el receptor específico involucrado en el reconocimiento y fagocitosis de los conidios, ya que tienen diferentes vías de señalización, lo que hace que el proceso tenga duraciones diferentes.
- Dectin-1 es el principal receptor que reconoce β -glucanas, y el más eficiente, aún cuando TLR2 también reconoce esta estructura.
- El cambio de color de FITC registrado en la fagocitosis de *S. schenckii* opsonizados con glucana indica un cambio cualitativo de pH, lo cual comprueba que Dectin-1 guía a un proceso de estallido respiratorio, lo que provoca la disminución de pH y el viraje de FITC.

capítulo

7

Bibliografía

Bibliografía

1. Abbas, A. K. Lichtman A. H Pober J. S. "Propiedades Generales De Las Respuestas Inmunitarias." Inmunología Celular y Molecular. Ed. Mc-GrawHill- Interamericana. 4a. ed. Arvaca, Madrid: 2002. 3-16.

— "Inmunidad Innata." Inmunología Celular y Molecular. Ed. Mc-GrawHill- Interamericana. 4a. ed. Arvaca, Madrid: 2002. 280-302.
2. Aderem, A. and Underhill D. M. "Mechanism of phagocytosis in macrophages." Annu.Rev.Immunol. 17 (1999): 593-623.
3. Ayala Simonin, Antonio. "Variación De La Acidez Intracelular Durante La Internalización De Conidios De *S. Schenckii* En La Línea Celular U-937." Diss. 2005.
4. Ban Burik, J and P. T. and Magee. "Aspects of fungal pathogenesis in humans." Annu.Rev.Immunol. 55 (2001): 743-72.
5. Bar-Shavit, Z. Ofek I. Goldman R. Mirelman D. and Sharon N. "Macrophages residues on phagocytes receptors for the attachment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*." Biochemical and Biophysical Research Communications. 78.1 (1977): 455-60.
6. Battle, J. Ha T. Li C. Della Beffa V. Rice P. Kalbfleisch J. Browder W. and Williams D. "Ligand binding to the (1-3)- β -glucan receptor stimulates NF κ B activation, but no apoptosis in U-937 cells." Biochemical and Biophysical Research Communications. 249.2 (1998): 499-504.

7. Beutler, B. "Innate immunity: and overview." Molecular Immunology 40 (2004): 845-59.
8. Bonifaz, Alexandro. "Esporotocosis." Micología Médica Básica. Ed. Mendez Editores. 2a. reimpression ed. México, D.F.: 1994. 167-86.
9. Brown, G. D. and Gordon S. "Immune recognition: a new receptor for beta-glucans." Nature 413 (2001): 36-37.
10. Brown, G. D. Herre J. Williams D. L. Willment J. A. Marshall A. J. and Gordon S. "Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans." J.Exp.Med. 197.9 (2003): 1119-24.
11. Brown, G. D. Taylor P. R. Reid D. M. Willment J. A. Williams D. L. Martinez-Pomares L. Wong S. and Gordon S. "Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages." J.Exp.Med. 196 (2002): 407-12.
12. Cole, G. Sun S. H. "Arthroconidium-Spherule-Endospore Transformation in *Coccidioides Immitis* ." Fungal Dimorphism whith emphasis of fungi pathogenic for humans and animals. Ed. P. J. and Harris J. L. Szaniszlo. New York: Plenum Press, 1985. 281-336.
13. Coronel Cruz, Cristina. "Estudio De La Fagocitosis De Conidios De *Sporothrix Schenckii* En La Línea Celular De Macrófagos U-937." Diss. UNAM, 2005.
14. Cunningham, K. M Bulmer G. S. and Rhoades E. R. "Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii*." The Journal of Infectious Diseases 140.5 (1979): 815-17.
15. DeBeurman de L, and Gougerot H. Les Sporotrichoses. Ed. Félix Alcan. Francia: Paris., 1912.
16. Diniz, S. N. Nomizo R. Cisalpino P. S. Teixeira M. M. and G. D. Mantovani A. Gordon S. Reis L. F. L. and Dias A. A. M. Brown. "PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages." Journal of Leukocyte Biology. 75 (2004): 649-56.
17. Drutz, D. J. Huppert M. "Coccidioidomycosis: Factors affecting the host-parasite interaction." J.Infect.Dis. 147 (1988): 372-90.

18. E.Serra-Baldrich. "Esporotricosis Cutánea." Temas monográficos comentados. Actualidad Dermatológica. 2000. 238-44.
- 19 East, L. and Isacke C. M. "The mannose receptor family." Biochimica and Biophysical Acta 1572 (2002): 364-86.
20. Gantner, B. N. Simmons R. M. Canavera S. J. Akira S. and Underhill D. "Colaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and Toll-like receptor 2." J.Exp.Med. 197.9 (2003): 1107-17.
21. Gonick, L y Smith W. "Comparación De Dos Poblaciones." La estadística en Cómic. Ed. Zendera Zariquiey. 1a. ed. Barcelona, España: 1993. 157-80.
22. Groppe Eisenberg, L. Golman E. W. Schelesinger P. "*Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes." J.Exp.Med. 177 (1993): 1605-11.
23. Herre, J. Gordon S. and Brown G. D. "Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages." Molecular Immunology 40 (2004): 869-76.
24. Herre, J. Willment J. A. Gordon S. and Brown G. D. "The role of Dectin-1 in Antifungal Immunity." Critical Reviews in Immunology 24.3 (2004): 193-203.
25. Hiruma, H. Kawada A. Noda T. Yamazaki M. and Ishibashi A. "Tissue response in sporotrichosis: light and electron microscopy studies." Mycoses 35 (1992): 35-41.
26. Ibrahim-Granet, O. Boleti P. H. and E. Grenet D. Stern M. and Latgé J. P. Boisvieux-Ulrich. "Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages." Infection and Immunity 71.2 (2003): 891-903.
27. Iracilda Zapone, C. Bridon da Graça D. S. Campos M. Placeres P. "*Sporothrix schenckii* Lipids inhibits macrophage phagocytosis: Involvement of Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- α ." Scandinavian Journal of Immunology. 57 (2003): 214-20.
28. Iracilda Zappone, C. Bridon da Graça D. S. Campos M. Placeres P. "Host Organism defense by a peptide-polisaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*." Mycopathology 144 (1999): 9-14.

29. Iracilda, Z. C. Costazini M. Bridon da Graça S. Angluster J. Sales C. and Lopes C. "Disturbances in the production of interleukin-1 tumor and necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis." Mycopathology 127 (1994): 189-94.
30. Jacobson, E. S. "Pathogenic roles for fungals melanins." Clinical Microbiology Reviews 13.4 (2005): 708-17.
31. Jacobson, E. S. Hove E. and Emery H. S. "Antioxidant function of melanin in black fungi." Infection and Immunity 63.12 (1995): 4944-45.
32. Janeway Charles, Travers Paul Walport Mark and Shlomchick Mark. Immunobiology. The Immune System in Healt and Disease. Ed. Garland Publishing. 5a. ed. Nueva York: 2001, 1-35.
33. Janeway, Charles A. and Ruslan Medzhitov. "Innate Immune Recognition." Annu. Rev. Immunol. 20 (2002): 197-216.
34. Kimberlin, C. L. Hariri A. R. Hempel H. O. Goodmand N. L. "Interations between *Histoplasma capsulatum* and macrophages from normal and treated mice: Comparison of mycelial and yeast phaese in alveolar and peritoneal macrophages." Infection and Immunity 34 (1981): 6-10.
35. Levitz, S. M. Nong S. Seetoo K. F. Harrison T. S. Speizer R. A. and Simons E. R. "*Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosoma of human macrophages." Infection and Immunity 67.2 (1999): 885-90.
36. Lewis, Claire E. and McGee James D. The Natural Immune System. The Macrophage. Ed. Oxford University Press. Nueva York: 1992, 3-114.
37. MacMicking, J. Quiao-wen X. and Nathan C. "Nitric oxide and macrophage function." Annu.Rev.Immunol. 15 (1997): 323-50.
38. Mendocça, L. Gorin P. A. J. Lloyd K. O. Travassos L. R. "Polymorphism of *Sporothrix schenckii* surface polysaccharides as function of morphological differentiation." Biochemistry 15 (1978): 2423-31.
39. Mendoff, G. Kobayash G. S. Painter A. Travis S. "Morphogenesis and pathogenicity of *Histoplasma capsulatum*." Infection and Immunity 55 (1987): 1355-58.

40. Miyazaki, T. Tanaka K. Ishikawa N. Hara K. "Plasma (1-3)-b-D-Glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis." Journal of Clinical Microbiology 33.12 (1995): 3115-18.
41. Mueller, A. Raptis J. Rice P. J. Kalbfleisch J. H. Stout R. J. Ensley E. H. Browder W. and Williams D. L. "The influence of glucan polymer structure and solution conformation of binding to (1-3)-β-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line." Glycobiology 10.4 (2000): 339-46.
42. Newman, S. L. "Macrophage en host defense against *Histoplasma capsulatum*." Trends in Microbiology 7.2 (1999): 67-71.
43. O'Brien, D. K. Melville S. B. "The anaerobic pathogen *Clostridium perfringens* can escapate the phagosome of macrophages under aerobic conditions." Cell.Microbiol. 2.6 (2000): 505-19.
44. Pieters, J. "Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages." Microbes and Infection 3 (2001): 249-55.
45. Popi, A. F. López J. D. and Mariano M. "Gp 43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus." Cellular Immunology 218 (2002): 87-94.
46. Rama Rao, N. Meyer T. "*Helicobacter pylori* resist phagocytosis by macrophages: Quantitative assessment by confocal microscopy and fluorecence-activated cell sorting." Infection and Immunity 69.4 (2000): 2604-11.
47. Ramkumar, R. P. Hammache D. and Stahl P. D. "Mannose Receptor and Innate Immunity." Innate Immunity. Ed. R.Alan B.Ezekowitz and Jules A.Hoffman. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2003. 191-204.
48. Roitt, I. M. Delves P. J. "Inmunidad Innata." Inmunología. Fundamentos. 10a. ed. 2003. 1-21.
49. Romero-Martínez, R. Wheeler M. Guerrero-Plata A. Rico G. and Torres-Guerrero H. "Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*." Infection and Immunity 68.6 (2000): 3696-703.
50. Ross, I and Gentleman R. "R: A language for data analysis and graphics." Journal of computational and graphical statistics. 5 (1996): 299-314.

51. Sheperd, M. G. "Pathogenicity of morphological and auxotrophic mutants of *Candida albicans* in experimental infections." Infection and Immunity 50 (1985): 541-44.
52. Strasser, J. Newman S. Ciarolo G. Morris R. Hewell M. and Dean G. "Regulation of the macrophage vacuolar ATPase an phagosome-lisosome fusion by *Histoplasma capsulatum*." Journal of Immunology (1999): 6148-54.
53. Sundström, C. and Nilsson, K. "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)" Int. J. Cancer 17 (1976) 565-577.
54. Tachibana, T. Matsuyama T. and Mutsuyama M. "Involvement of CD+4 T Cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice." Medical Mycology 37 (1999): 422-28.
55. Takeda, K. Kaisho T. and Akira S. "Toll-like receptors." Annu.Rev.Immunol. 21 (2003): 335-76.
56. Taylor, P. R. Brown G. R. Reid D. M. Willment J. A. Martinez-Pomares L. Gordon S. and Wong S. "The beta-glucan receptor, Dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages." J.Immunol. 269 (2002): 3876-82.
57. Travassos, L. R. "*Sporothrix Schenckii*." Fungal Dimorphism. With emphasis on fungi pathogenic for humans. Ed. P. J. and Harris J. L. Szaniszlo. Nueva York: Plenum Press., 1985. 121-51.
58. Travassos, L. R. Mendonça-Previato L. "Synthesis of Monorhamnosyl-L-Rhamno-D-Mannans by conidia of *Sporothrix schenckii*." Infection and Immunity 19.1 (1978): 1-4.
59. Underhill, D. M. and Ozinsky A. "Phagocytosis of microbes: Complexity in action." Annu.Rev.Immunol. 20 (2002): 825-52.
60. Zar, J. H. Biostatistical Analysis. Ed. Prentice Hall. 3a ed. USA: 1999.
61. Zhang, D. Zhang G. Hayden M. S. et als. "A Toll-Like receptor thah prevents infection by urophatogenic bacteria." Science 303 (2004): 1522-26.

capítulo

8

Apéndices

Apéndice I

Medios de cultivo

- **Medio mínimo**

Base nitrogenada sin aminoácidos	6.7g
Dextrosa	20g
Agar	20g
Agua destilada	1000 ml

- **PDA**

Papa Dextrosa agar	39g
Agua destilada	1000 ml

- **Agar dextrosa de Sabouraud**

Peptona	10g
Glucosa	20g
Agar	20g
Agua destilada	1000 ml

- **Medio RPMI-1640 (Cultivo Celular) pH 7.2**

(Gibco Cat. 23400-021)

Resuspender el medio de la siguiente forma:

1. Colocar en un vaso de precipitados 90% del volumen final de agua requerido.
2. Comenzar a agitar de forma suave y agregar el polvo. Agitar hasta disolver, sin calentar.
3. Añadir a la solución anterior, 2g de Bicarbonato de Sodio. Agitar hasta disolver.
4. Ajustar el pH del medio, dejando 0.2-0.3 unidades de pH más abajo del deseado, utilizando HCl o NaOH 1.0 N
5. Llevar al aforo el medio.
6. Esterilizar inmediatamente por filtración utilizando una membrana con un poro de 0.22 μm .
7. Tomar una alícuota de 15 ml de medio y dejar a 37°C durante 24 horas para comprobar la esterilidad.
8. Agregar mezcla de antibióticos Penicilina/Estreptomicina 1 ml por cada litro de medio.
9. Almacenar el medio RPMI a 4°C

Apéndice II

Soluciones empleadas

- **PBS 1X**

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.444g
KH ₂ PO ₄	0.24g
Agua destilada	1000 ml

Ajustar a pH 7.2 utilizando HCl 1N

En el caso de usarse para fluorescencia, el PBS fue filtrado (millipore 0.45 m)

- **Soluciones de carbohidratos utilizados en la opsonización**

CARBOHIDRATO	SOLUCIÓN STOCK	CONCENTRACIÓN FINAL/ 1x10 ⁷ CONIDIOS	TIEMPO DE INCUBACIÓN (MIN)
Glucana (Sigma G-5011)	12.5 mg/ml	100 µg/ ml	30
Laminarina (Sigma L-9634)	77 mg/ml	100 µg/ ml	30
Manana (Sigma M-7504)	83 mg/ml	100 µg/ ml	30
Zimosan A (Sigma Z-4250)	50 mg/ml	100 µg/ ml	30

- **Azul tripano al 0.5%**

(Azul tripano, de Sigma No. de Cat. T-0776)

Azul tripano	0.5g
SSI (0,85%)	100 ml

Filtrar antes de usarse.

- **Solución Salina Isotónica (0.85%)**

NaCl	0.85g
Agua destilada	100 ml

- **Solución de antibióticos.**

- a) Penicilina
(Penicilina G, de Sigma. No. de Cat. PEN-NA)

Penicilina	2.4 g
PBS 1X (Filtrado)	40 ml

- b) Estreptomicina
(Sulfato de Estreptomicina, de Sigma. No. de Cat. S-6501)

Estreptomicina	2.0 g
PBS 1X (Filtrado)	20 ml

Esterilizar ambos por filtración.

- **Soluciones para la Tinción de Giemsa.**

1) Amortiguador para preparar la solución.

Na ₂ HPO ₄	4 g
KH ₂ PO ₄	5 g

Realizar la mezcla de ambos reactivos y de esa mezcla, pesar 1g y llevar a 1000 mL en agua destilada

2) Solución de Giemsa 1:15 (para preparar 5 mL)
(Stock de Giemsa, Gibco. No. de Cat. 10092-013)

Amortiguador de fosfatos	4.667 mL
Stock de Giemsa	333 μL

Para teñir 24 cubreobjetos de 12 mm, solo es necesario, aproximadamente, 5 mL de colorante.

- **Soluciones de montaje**

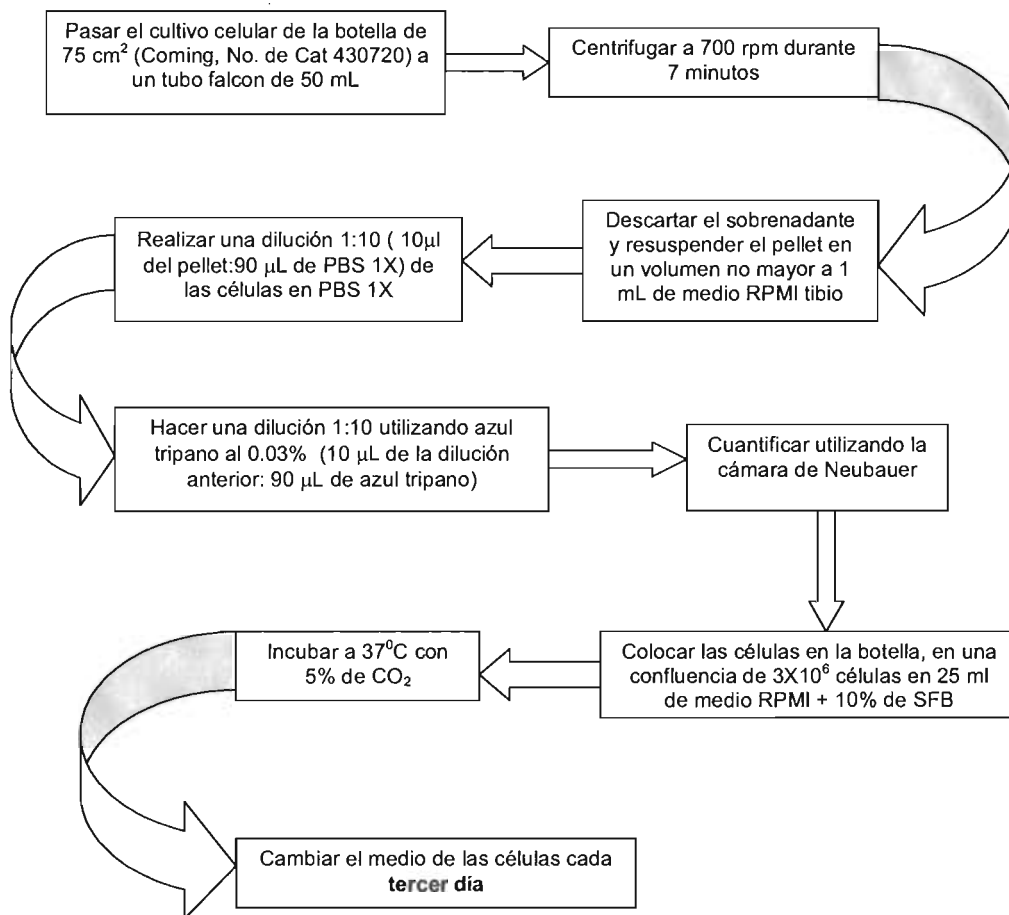
a) Para Giemsa

Glicerol	40 ml
PBS 1X	100 mL

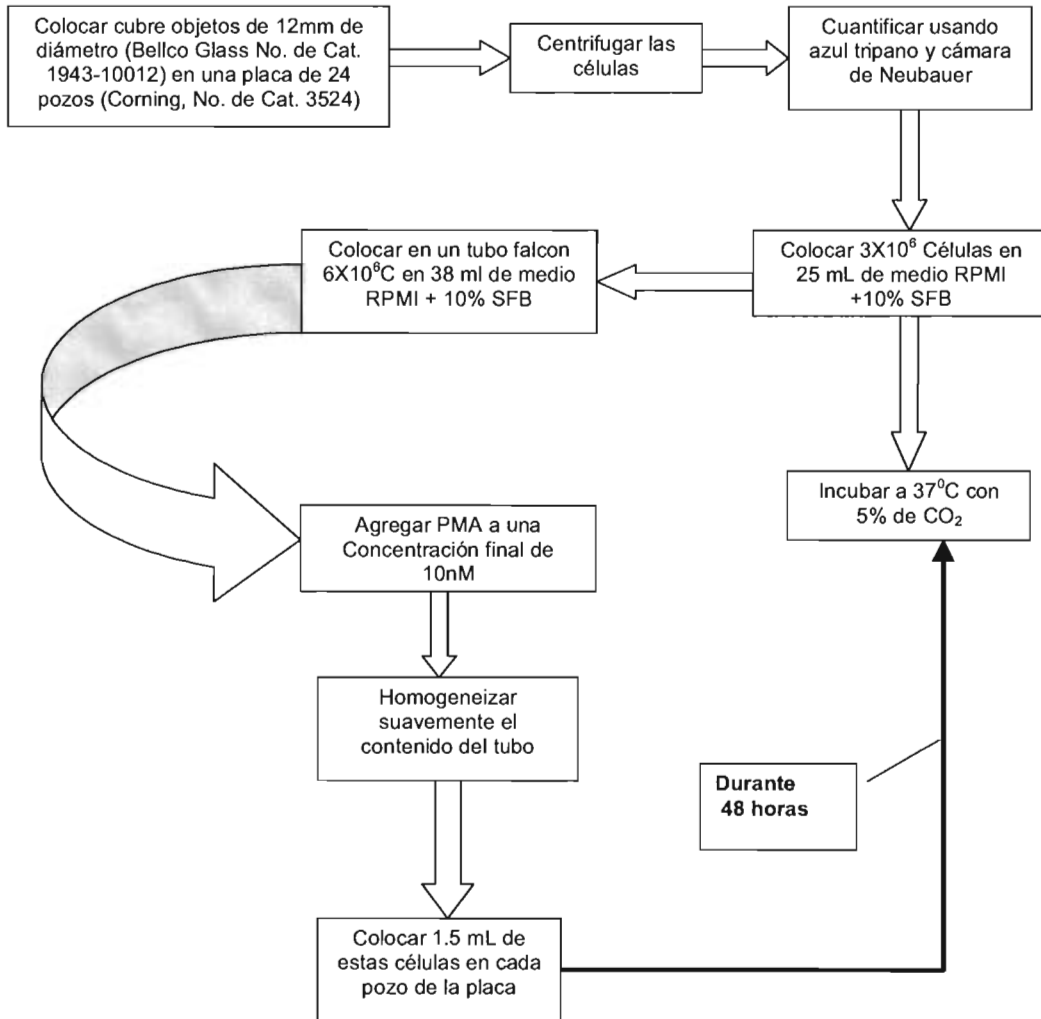
Apéndice III

Metodología empleada

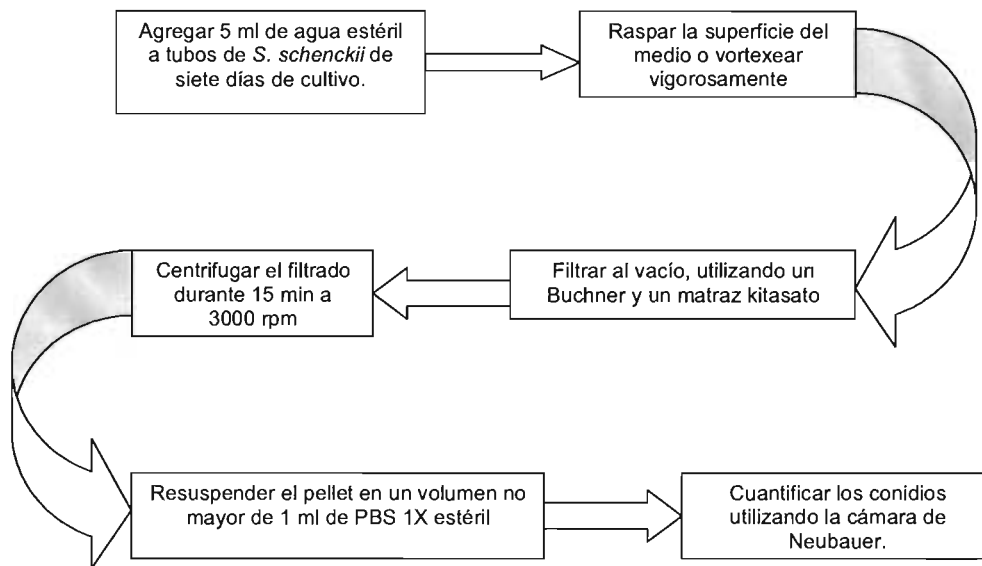
A) Mantenimiento de la línea celular.



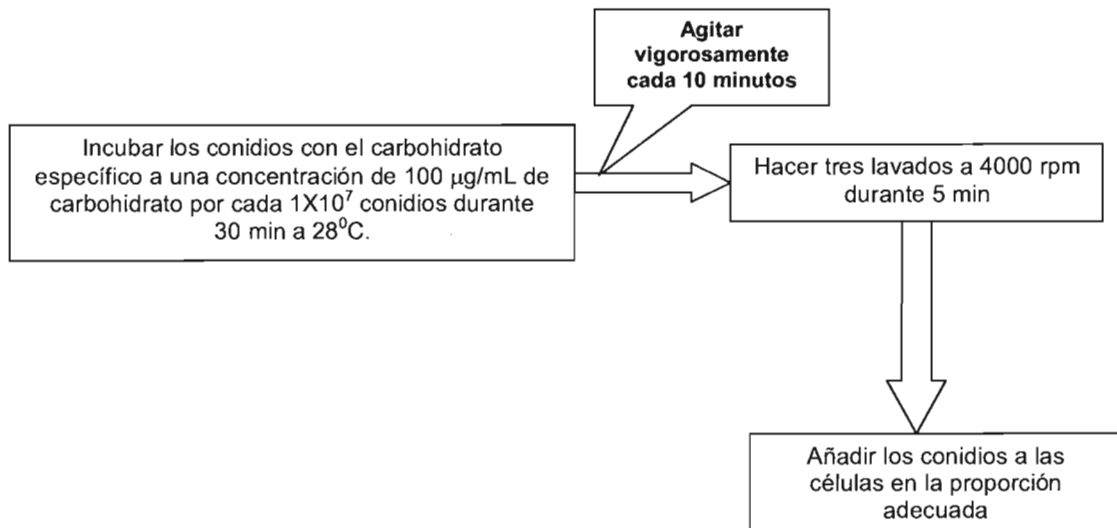
B) Diferenciación de Células



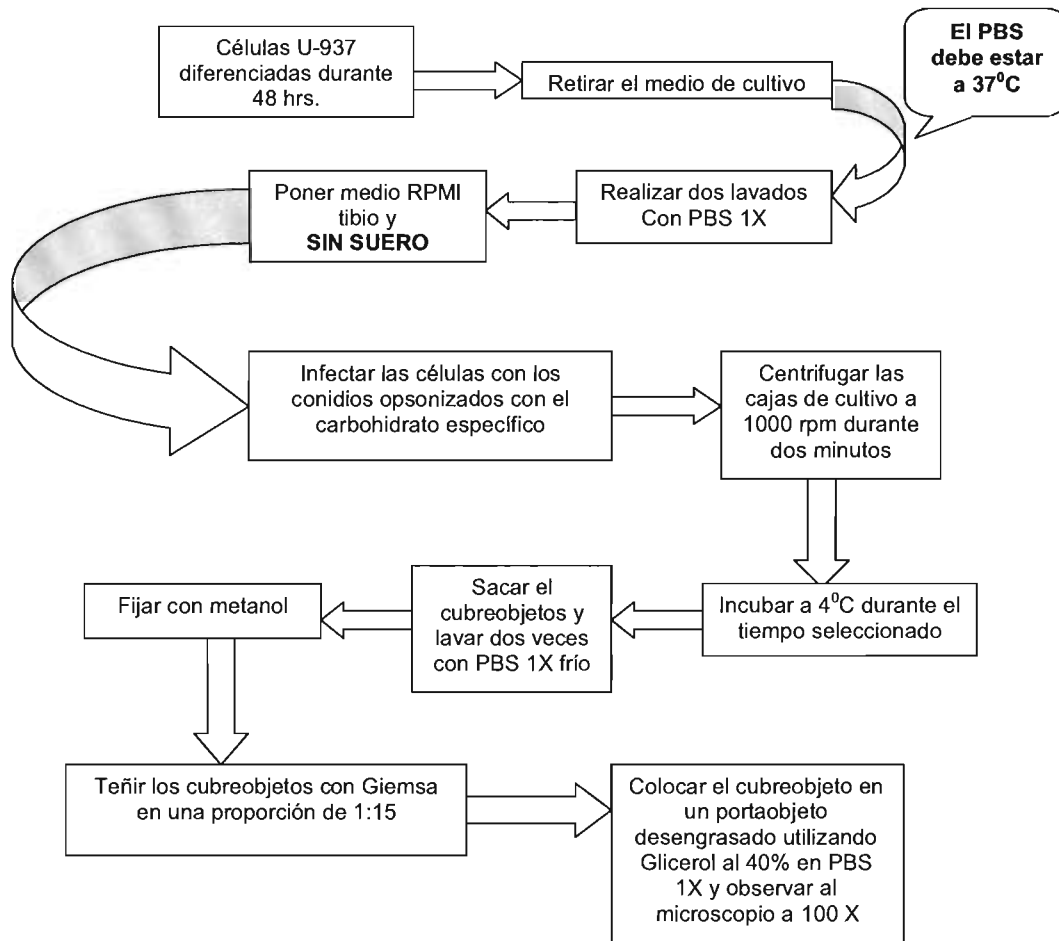
C) Obtención de conidios.



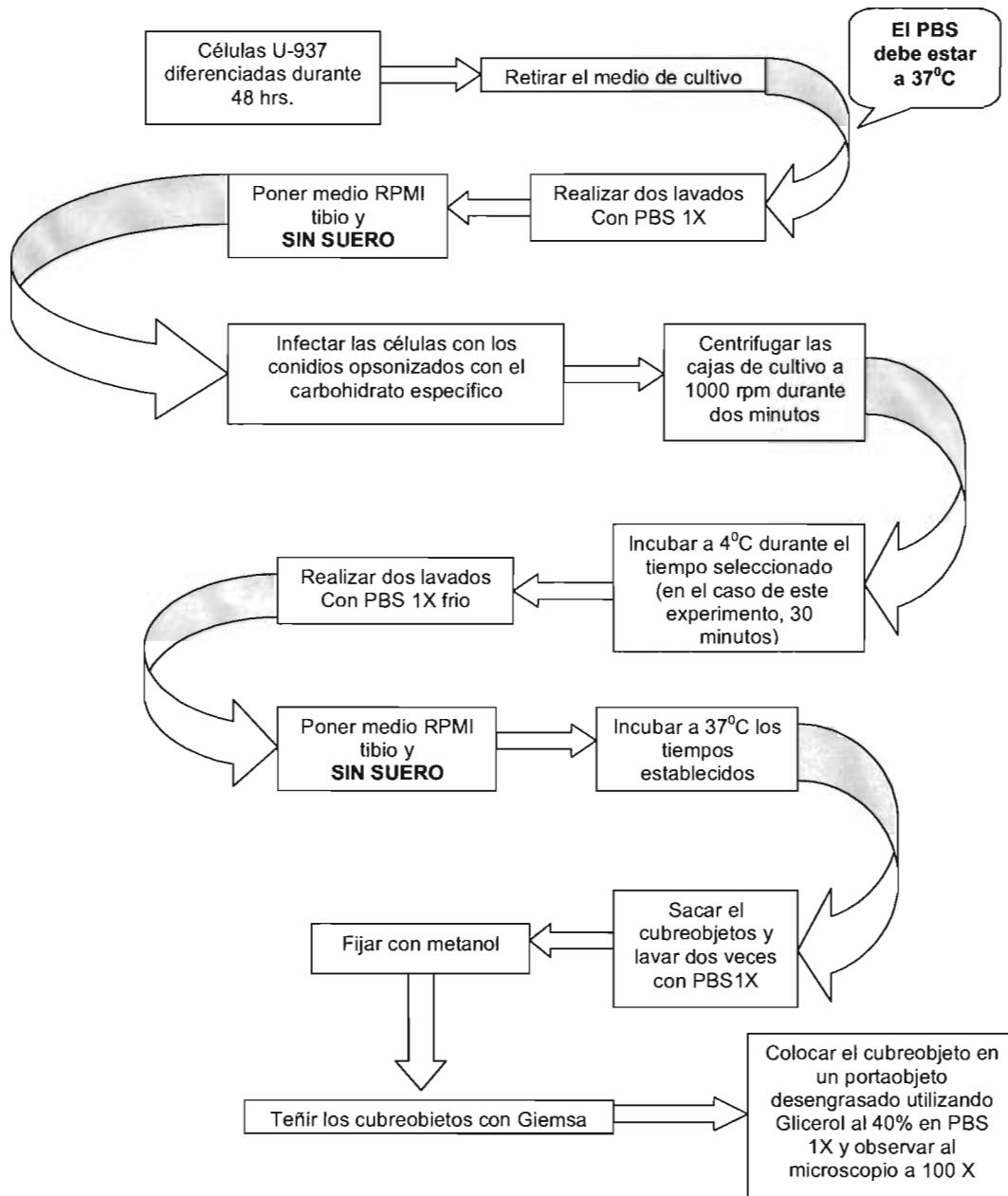
D) Opsonización de conidios con carbohidratos



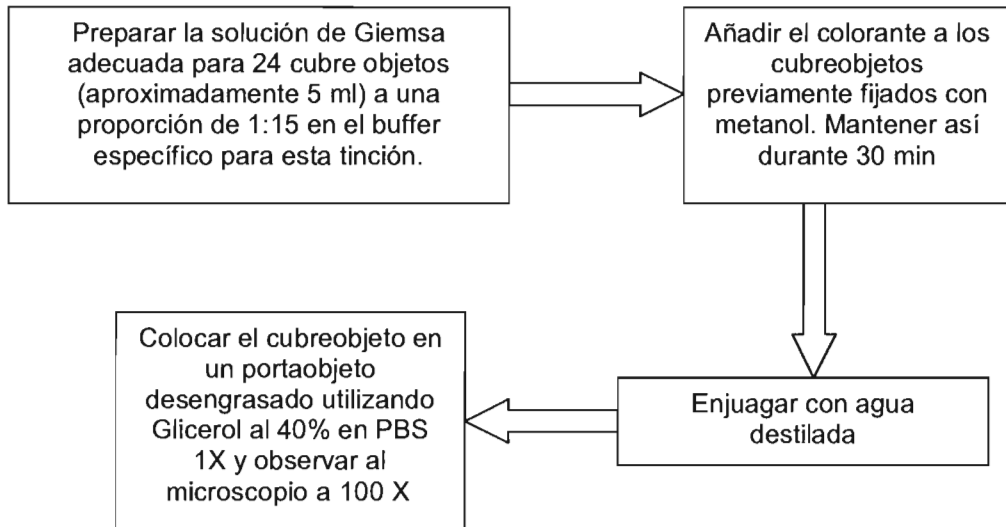
E) Índice de adhesión (sincronización)



F) Índice de fagocitosis



G) Tinción de Giemsa



Apéndice IV

Prueba Estadística con R

R : Copyright 2004, The R Foundation for Statistical Computing. Version 1.9.0 (2004-04-12), ISBN 3-900051-00-3

Type 'demo ()' for some demos, 'help ()' for on-line help, or 'Help. start ()' for a HTML browser interface to help.
Type 'q()' to quit R.

```
> scan()->glu4
1: .2378
2: .2570
3: .4100
4: .3050
5: .2650
6:
```

```
Read 5 items
> scan()->lam4
1: .1695
2: .2112
3: .2901
4: .2132
5: .0671
6:
```

```
Read 5 items
> t.test(glu4,lam4)
```

Welch Two Sample t-test

Data: glu4 and lam4
 $t = 2.1966$, $df = 7.783$, $p\text{-value} = 0.06023$
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:

```
-0.005752366 - 0.215232366
```

```
Sample estimates:
```

```
Mean of x mean of y
```

```
0.29496 0.19022
```

```
> scan()->glu37
```

```
1: .2354
```

```
2: .2704
```

```
3: .4073
```

```
4: .3021
```

```
5: .2098
```

```
6:
```

```
Read 5 items
```

```
> scan()->lam37
```

```
1: 0.1680
```

```
2: .2377
```

```
3: .3013
```

```
4: .1923
```

```
5: .1103
```

```
6:
```

```
Read 5 items
```

```
> t.test(glu37,lam37)
```

Welch Two Sample t-test

```
Data: glu37 and lam37
```

```
t = 1.7638, df = 7.969, p-value = 0.1159
```

```
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
```

```
95 percent confidence interval:
```

```
-0.02561191 - 0.19177191
```

```
Sample estimates:
```

```
Mean of x mean of y
```

```
0.28500 0.20192
```

```
> scan()->man4
```

```
1: .1740
```

```
2: .2285
```

```
3: .3466
```

```
4: .21
```

```
5: .1439
6:
Read 5 items
> t.test(glu4,man4)
```

Welch Two Sample t-test

```
Data: glu4 and man4
t = 1.6028, df = 7.886, p-value = 0.1482
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.03289088 - 0.18161088
Sample estimates:
Mean of x mean of y
0.29496 0.22060
```

```
> scan()->man37
1: .2086
2: .2525
3: .35
4: .2830
5: .1825
6:
Read 5 items
> t.test(glu37, man37)
```

Welch Two Sample t-test

```
Data: glu37 and man37
t = 0.6571, df = 7.811, p-value = 0.53
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.0749177 - 0.1342777
sample estimates:
mean of x mean of y
0.28500 0.25532
```

```
> scan()->zvm4
1: .2460
2: .3018
3: .3806
4: .3010
5: .2753
6:
Read 5 items
> t.test(glu4,zvm4)
```

Welch Two Sample t-test

```
Data: glu4 and zvm4
t = -0.1571, df = 7.307, p-value = 0.8794
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.09520382 - 0.08324382
Sample estimates:
Mean of x mean of y
 0.29496  0.30094
```

```
> scan()->zvm37
1: .2510
2: .3018
3: .3720
4: .2942
5: .2540
6:
Read 5 items
> t.test(glu37,zvm37)
```

Welch Two Sample t-tests

```
Data: glu37 and zvm37
t = -0.2357, df = 6.792, p-value = 0.8206
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.1064986 - 0.0872986
Sample estimates:
```


Mean of x mean of y
0.2850 0.2946

> t.test(man4,lam4)

Welch Two Sample t-tests

Data: man4 and lam4

t = 0.6038, df = 7.982, p-value = 0.5628

Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.08569913 - 0.14645913

Sample estimates:

Mean of x mean of y

0.22060 0.19022

> t.test(man37,lam37)

Welch Two Sample t-tests

Data: man37 and lam37

t = 1.2248, df = 7.93, p-value = 0.2558

Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.04729455 - 0.15409455

Sample estimates:

Mean of x mean of y

0.25532 0.20192

> t.test(zym4,lam4)

Welch Two Sample t-test

Data: zym4 and lam4

t = 2.5898, df = 6.645, p-value = 0.03763

Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0

95 percent confidence interval:

0.0085214 - 0.2129186

Sample estimates:

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Mean of x mean of y
0.30094 0.19022

> t.test(zym37,lam37)

Welch Two Sample t-test

Data: zym37 and lam37

t = 2.3777, df = 7.043, p-value = 0.04883

Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0

95 percent confidence interval:

0.0006247475 - 0.1847352525

Sample estimates:

Mean of x mean of y

0.29460 0.20192

> t.test(zym4,man4)

Welch Two Sample t-test

Data: zym4 and man4

t = 1.9449, df = 6.836, p-value = 0.09386

Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.01781582 - 0.17849582

Sample estimates:

Mean of x mean of y

0.30094 0.22060

> t.test (zym37, man37)

Welch Two Sample t-test

Data: zym37 and man37

t = 1.0727, df = 7.401, p-value = 0.3171

Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.04636428 - 0.12492428

Sample estimates:

Mean of x mean of y

0.29460 0.25532

> t.test(glu4,lam4)

Welch Two Sample t-test

Data: glu4 and lam4
t = 2.1966, df = 7.783, p-value = 0.06023
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.005752366 - 0.215232366
Sample estimates:
Mean of x mean of y
0.29496 0.19022

> t.test(glu37,lam37)

Welch Two Sample t-test

Data: glu37 and lam37
t = 1.7638, df = 7.969, p-value = 0.1159
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.02561191 - 0.19177191
Sample estimates:
Mean of x mean of y
0.28500 0.20192

> t.test(glu4,man4)

Welch Two Sample t-test

Data: glu4 and man4
t = 1.6028, df = 7.886, p-value = 0.1482
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.03289088 - 0.18161088
Sample estimates:
Mean of x mean of y
0.29496 0.22060

> t.test(glu37,man37)

Welch Two Sample t-test

Data: glu37 and man37
t = 0.6571, df = 7.811, p-value = 0.53
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.0749177 - 0.1342777
Sample estimates:
Mean of x mean of y
0.28500 0.25532

> t.test(glu4,zym4)

Welch Two Sample t-test

Data: glu4 and zym4
t = -0.1571, df = 7.307, p-value = 0.8794
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.09520382 - 0.08324382
Sample estimates:
Mean of x mean of y
0.29496 0.30094

> t.test(glu37,zym37)

Welch Two Sample t-test

Data: glu37 and zym37
t = -0.2357, df = 6.792, p-value = 0.8206
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.1064986 - 0.0872986
Sample estimates:
Mean of x mean of y
0.2850 0.2946

> t.test(man4, lam4)

Welch Two Sample t-test

Data: man4 and lam4
t = 0.6038, df = 7.982, p-value = 0.5628
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.08569913 - 0.14645913
Sample estimates:
Mean of x mean of y
0.22060 0.19022

> t.test(man37,lam37)

Welch Two Sample t-test

Data: man37 and lam37
t = 1.2248, df = 7.93, p-value = 0.2558
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.04729455 - 0.15409455
Sample estimates:
Mean of x mean of y
0.25532 0.20192

> t.test(zym4,lam4)

Welch Two Sample t-test

Data: zym4 and lam4
t = 2.5898, df = 6.645, p-value = 0.03763
Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
0.0085214 - 0.2129186
Sample estimates:
Mean of x mean of y
0.30094 0.19022

> t.test(zym37,lam37)

Welch Two Sample t-test

Data: zym37 and lam37

t = 2.3777, df = 7.043, p-value = 0.04883

Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0

95 percent confidence interval:

0.0006247475 - 0.1847352525

Sample estimates:

Mean of x mean of y

0.29460 0.20192

> t.test(zym4,man4)

Welch Two Sample t-test

Data: zym4 and man4

t = 1.9449, df = 6.836, p-value = 0.09386

Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.01781582 - 0.17849582

Sample estimates:

Mean of x mean of y

0.30094 0.22060

> t.test(zym37, man37)

Welch Two Sample t-test

Data: zym37 and man37

t = 1.0727, df = 7.401, p-value = 0.3171

Alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.04636428 - 0.12492428

Sample estimates:

Mean of x mean of y

0.29460 0.25532