



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

REQUERIMIENTOS OPSÓNICOS PARA LA  
FAGOCITOSIS DE CONIDIOS DE *S. schenckii* EN LA  
LÍNEA CELULAR U937

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA

**ANTONIO AYALA SIMONÍN**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. HAYDEÉ TORRES GUERRERO

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2007.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



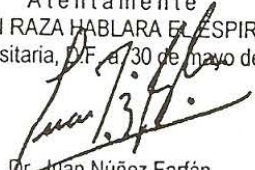
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de marzo del 2007, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno Ayala Simonin Antonio con número de cuenta 505013389 con la tesis titulada: "Requerimientos opsónicos para la fagocitosis de conidio de *S. schenckii* en la línea celular U937" bajo la dirección de la Dra. Haydeé Torres Guerrero.

Presidente: Dr. Alfonso González Noriega  
Vocal: Dra. María del Rocio Reyes Montes  
Secretario: Dra. Haydeé Torres Guerrero  
Suplente: Dr. Alejandro Zentella Dehesa  
Suplente: Dra. Celia Alpuche Aranda

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 30 de mayo del 2007

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

La presente tesis fue elaborada en el laboratorio de genética y biología molecular de hongos del departamento de microbiología y parasitología de la facultad de medicina, UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Haydeé Torres Guerrero y el apoyo del comité tutorial conformado por el Dr. Alfonso González Noriega y la Dra. Celia Alpuche Aranda y gracias a una Beca proporcionada por el CONACYT en el posgrado en ciencias biológicas.

## Agradecimientos

- Dra. Haydeé Torres Guerrero, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, la tutoría y el apoyo brindado a lo largo del posgrado
- Dr. Alfonso González Noriega, por su apoyo incondicional, el tiempo invertido en la enseñanza del arte de la ciencia y su dirección a lo largo del proyecto.
- Dra. Colette Michalak Sodomirska, por su grandiosa asistencia técnica, tiempo y apoyo.
- Dr. Juan José Bolívar, por facilitarnos su equipo y reactivos, compartir su conocimiento y apoyo.
- Dra. Beatriz Gómez, Rosa Elena y Rocío, por apoyarnos con su equipo y ayuda.
- M. en C. Gabina Arenas, por su paciencia, sus comentarios y brindarme su grandiosa amistad.
- Cristina Coronel Cruz y Edith Trejo Gómez por compartir sus conocimientos y técnicas en la elaboración de éste proyecto.

### Dedicatoria

- A mis Papás, gracias por el cariño, sus enseñanzas, alegrías y consejos que me han brindado a lo largo de mi vida, gracias por motivarme en seguir adelante a pesar de la adversidad, los quiero mucho.
- Mi hermana Carito, gracias por tantas pláticas y alegrías, gracias por motivarme y apoyarme en terminar otro periodo mas en mi vida.
- Alejandro, gracias por brindarme tu amistad y tu honestidad, tus consejos e ideas.
- Santiago, por llegar curioso a mi cuarto e inspeccionar cada centímetro, cada objeto y experimentar con todo, tienes el corazón de un investigador intentando comprender los fenómenos que ocurren en el mundo. Gracias por recibirme siempre con una gran sonrisa.
- A mis Abuelos, por ser magnificas personas y enseñar con su ejemplo lo grandioso y amoroso que uno puede llegar a ser, los quiero mucho.
- Claudia, gracias por llegar a mi vida y llenarla de alegrías, gracias por los momentos especiales que has compartido conmigo y el apoyo en la realización de mis sueños.
- Gloria e Ivonne, gracias por sus consejos, las excelentes platicas, por ser grandiosas personas y excelentes amigas.
- Carlitos, gracias por tu amistad y apoyo, por motivarme en seguir adelante y por ser una gran persona y amigo.
- A mis amigos Marco, Rafa, Dianita, Carmen, ha sido un honor el conocerlos y compartir tantas experiencias dentro y fuera de la universidad.
- A mis amigas Yleri y Naty, A pesar de la distancia y del tiempo, siempre he podido contar con su amistad y apoyo.
- A Eli Metchnikoff Q.E.P.D. por poder observar, comprender e interpretar el fenómeno que ha brindado tanto conocimiento a la humanidad.

Las ideas flotan a tu alrededor  
pero con frecuencia no quieres verlas.  
Cuando buscas inspiración, lo que buscas son ideas.  
Cuando rezas pidiendo orientación, pides ideas  
que te muestren el rumbo. Eso sí tienes que prestar  
atención porque a ti te corresponde  
poner las ideas en funcionamiento

-Richard Bach

When drinking wine amongst the roses  
Or guzzling beer while throwing bricks  
Or playing games in bales of hay  
Where lurks the tricky sporothrix,  
Beware, the price you pay for play,  
When you get struck by dread mycoses

-S. Vaisrub

## ÍNDICE GENERAL

1.. <i>Resumen</i> . . . . .	7
1.1. Resumen . . . . .	7
1.2. Abstract . . . . .	8
2.. <i>Antecedentes</i> . . . . .	9
2.1. Esporotricosis . . . . .	9
2.2. Inmunidad innata . . . . .	12
2.3. Fagocitosis . . . . .	14
2.4. Estudios sobre <i>S.schenckii</i> . . . . .	18
3.. <i>Justificación del Proyecto</i> . . . . .	20
4.. <i>Objetivos</i> . . . . .	22
4.1. Objetivo General . . . . .	22
4.2. Objetivo específicos . . . . .	22
5.. <i>Material y Métodos</i> . . . . .	23
5.1. Métodos . . . . .	23
5.1.1. Mantenimiento de la línea Celular . . . . .	23
5.1.2. Diferenciación de monocitos a macrófagos . . . . .	23
5.1.3. Obtención de suero hiperinmune . . . . .	23
5.1.4. Inactivación del complemento . . . . .	24
5.1.5. Eliminación de anticuerpos del Suero Hiperinmune . . . . .	24
5.1.6. Peryodatación Suero . . . . .	24
5.1.7. Preparación de la Asialofetuina . . . . .	25
5.1.8. Tratamiento de los cubreobjetos . . . . .	25
5.1.9. Condiciones de crecimiento de <i>S. schenckii</i> . . . . .	25



---

5.1.10. Obtención de conidios . . . . .	25
5.1.11. Opsonización de conidios de <i>S. schenckii</i> . . . . .	26
5.1.12. Fagocitosis de conidios en macrófagos U-937 . . . . .	26
5.1.13. Inmunofluorescencia . . . . .	27
5.1.14. Viabilidad . . . . .	28
5.1.15. Prueba estadística . . . . .	28
6.. <i>Resultados</i> . . . . .	29
6.1. La fagocitosis de conidios de <i>S.schenckii</i> es dependiente de la concentración del suero . . . . .	29
6.2. Contribución de componentes presentes en el suero a la fagoc- itosis de conidios de S.schenckii . . . . .	31
6.3. Existen glicoproteínas que favorecen el proceso de fagocitosis	32
6.4. La fagocitosis de conidios de S.schenckii opsonizado con suero preimmune es inhibido por Manosa . . . . .	33
6.5. La fagocitosis de conidios opsonizados con suero preimmune inactivado por calor está mediado por el receptor de manosa	35
6.6. Los conidios vivos y muertos opsonizados con ovoalbúmina o suero preimmune residen en vesículas ácidas . . . . .	36
7.. <i>Discusión</i> . . . . .	38
7.1. Modelo propuesto . . . . .	41
8.. <i>Conclusiones</i> . . . . .	43
9.. <i>Perspectivas</i> . . . . .	44

# 1. RESUMEN

## 1.1. Resumen

*Sporothrix schenckii* es el agente causal de la esporotricosis, micosis subcutánea de alta incidencia en México. La primera línea de defensa durante una infección depende principalmente de la fagocitosis y la degradación intracelular del hongo. Poco se conoce sobre la interacción y mecanismo de fagocitosis de conidios de *S.schenckii*. En el presente trabajo, examinamos los requerimientos necesarios para la fagocitosis de conidios de *S.schenckii* en macrófagos derivados de la línea celular U937. Demostramos que las opsoninas son necesarias para la ingesta de los conidios. Se calentó suero inmune y preinmune para inactivar a las proteínas del complemento antes de la opsonización de conidios y bajo estas condiciones, la internalización de conidios disminuyó a 82 % con respecto al control. Al eliminar IgG de suero anti *S.schenckii* inactivado, la fagocitosis disminuyó a 36 %. Sin embargo, la fagocitosis no disminuyó a niveles basales, lo que sugiere que existen otros factores en el suero que actúan como opsoninas y poseen un papel importante en la internalización del patógeno. La inactivación del suero utilizando metaperiodato disminuye la fagocitosis a niveles basales, indicando que existen glicoproteínas involucradas en la opsonización de conidios. La internalización de conidios opsonizados con suero preinmune inactivado o con ovoalbúmina fue inhibida por exceso de manosa y no por galactosa, lo que sugiere que los conidios opsonizados con proteínas glicosídicas son internalizados vía receptor de manosa.

---

## 1.2. Abstract

*Sporothrix schenckii* is the etiologic agent of sporotrichosis, a subcutaneous mycosis of high incidence in México. Initial control of *S. schenckii* is highly dependent on phagocytosis and intracellular killing of the fungus. Little is known about the mechanism of phagocytosis of *Sporothrix schenckii* conidia by phagocytic cells. In this work, we examined the requirements for phagocytosis of conidia by U937 macrophages. We show here that opsonins are necessary for ingestion of conidia. Pre-immune and immune serum were heated to inactivate complement before opsonization of conidia; under these conditions, the internalization of conidia was 82 % of that seen with untreated sera. Elimination of IgG from heat-inactivated immune serum decreased phagocytosis to 36 % of controls. However, phagocytosis did not drop to basal levels, suggesting that other serum factors act as opsonins and thus may play a role in the uptake of this fungus. Inactivation by periodate oxidation of these serum factors led to a decrease of phagocytosis down to basal levels, indicating the involvement of glycoproteins in the opsonisation of conidia. The uptake of conidia opsonized with heat inactivated preimmune serum or with ovalbumin was significantly inhibited by excess mannose, but not by galactose, suggesting that conidia covered with glycosylated proteins might be primarily internalized via mannose receptors.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. *Esporotricosis*

La esporotricosis se define como una micosis subcutánea o profunda cuyo agente etiológico es el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*; ésta micosis posee una amplia distribución a nivel mundial, sin embargo, se reporta principalmente en regiones que poseen un clima templado y húmedo[4, 50, 26].

La esporotricosis fue descrita por Schenk en Estados Unidos en el año de 1898 y fué Erwin Smith quien concluyó que el microorganismo pertenece al género *Sporotrichum*. En 1900 la enfermedad fue reportada por Hektoen y Perkins [15] quienes estudiaron ampliamente al patógeno y clasificaron al hongo en el género *Sporothrix* y describieron a la especie *schenckii*, posteriormente, fue estudiada por De Beurmann y Gougerot en Francia cuando se reportaron frecuentes casos en el país unos años después[4, 50, 26]. Fue hasta 1913 cuando describieron casos en México.

Se han reportado casos de esporotricosis en casi toda la república Mexicana especialmente en la temporada de otoño e invierno, debiéndose a la temporada de lluvia y al aumento del detritus vegetal, aunque se pueden encontrar casos de esporotricosis en cualquier época del año. [4, 32]

En México, el hongo se ha podido recuperar del suelo, plantas, moho[4, 50, 31, 9, 53]. Debido a la presencia hongo en el detritus de las plantas, el padecimiento está asociado con la ocupación de los individuos de modo que los casos ocurren en personas dedicadas a la jardinería, agricultores, vendedores de plantas, leñadores, etcétera.

La esporotricosis ha sido relacionado esporádicamente con los animales sin embargo a partir de la década de los 80 los gatos se consideran un factor importante para la transmisión y diseminación de la micosis hacia el

hombre[7, 26, 53, 35].

La principal vía de entrada de éste patógeno al organismo es la cutánea, es necesario que exista algún traumatismo en la piel y se exponga a elementos que contengan al agente infectante. En un menor caso, se puede llevar a cabo una infección por inhalación.

La esporotricosis posee diversas manifestaciones clínicas, las cuales se muestran en la tabla 2.1:

Cutánea	Mucosa	Extracutánea
Cutáneo-Linfática	Ocular	Pulmonar
Fija	Nasal	Osteoarticular
Diseminada	Otros	Meningítico
		Generalizado

Tab. 2.1: Manifestaciones clínicas de la esporotricosis. Adaptado de Lopes-Bezerra[26]

La forma clínica mas frecuente es la cutáneo-linfática (75-80% de los casos), inicia aproximadamente a las 2 semanas de inoculación con una lesión nodular o ulcerada en el sitio de infección, posteriormente aparecen lesiones siguiendo una trayectoria hacia el ganglio linfático, la esporotricosis diseminada generalmente se observa en pacientes inmunosuprimidos[4, 26, 53].

*Sporothrix schenckii* es un hongo dimórfico[18], es decir, el hongo tiene la capacidad de expresar dos programas morfológicos: micelio y levaduras. *In vitro* éste fenómeno depende de factores ambientales como el pH, temperatura, nutrientes, etcétera[53, 44].

La forma micelial (saprobia) se expresa en medios pobres en nutrientes a una temperatura de 25 a 28°C y a un pH de 5.5, se caracteriza por presentar hifas delgadas, septadas, de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de diametro. Su reproducción es asexual y se caracteriza por poseer conidios de forma oval o piriforme con dimensiones de 1.3 a 3 $\mu\text{m}$  por 3-6 $\mu\text{m}$  que se generan sobre un simpodio apical (simpodioconidios) que dan apariencia de *flor de margarita*(Figura 2.1).

La forma levaduriforme (parásita) se expresa en medios con nutrientes a una temperatura de 35 a 37°C y a un pH de 7.2 , al microscopio se observan células ovales o alargadas de 2.5 a 5  $\mu\text{m}$  por 3.5 a 6.5  $\mu\text{m}$ . La división de las

células se lleva a cabo por gemación (Figura 2.1).

Al desarrollarse los conidios forman una germínula, en éste momento se lleva a cabo la expresión de los programas morfológicos que terminarán en hifas o levaduras según las condiciones del medio.[53, 4]

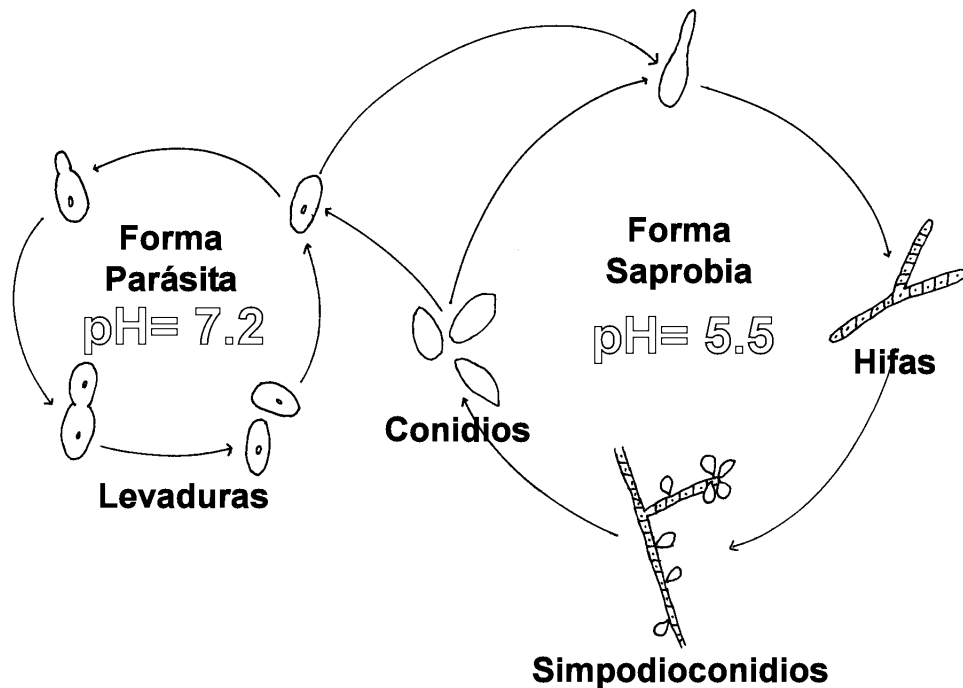


Fig. 2.1: Dimorfismo de *S. schenckii*. Los conidios tienen la capacidad de expresar dos programas morfológicos dependiendo de las condiciones del medio, a un pH 5.5 se obtiene la forma micelial, caracterizado por las hifas y los simpodioconidios en *flor de margarita*. A un pH de 7.2 se obtiene la forma levaduriforme cuya división es por gemación. Si disminuye el pH puede existir un cambio de la forma levaduriforme a la micelial.

Dependiendo de las condiciones del medio y los sustratos, *S.schenckii* tiene la capacidad de producir conidios pigmentados, siendo éste un factor de resistencia ya que inhibe la fagocitosis y secuestra radicales libres.[26, 33]

## 2.2. Inmunidad innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra las infecciones, la mayoría de sus componentes se encuentran presentes antes de que exista algún patógeno, y está constituido por mecanismos de resistencia inespecíficos sin embargo incluye componentes celulares y moleculares que reconocen moléculas que frecuentemente se encuentran en los patógenos (figura 2.2).[14]

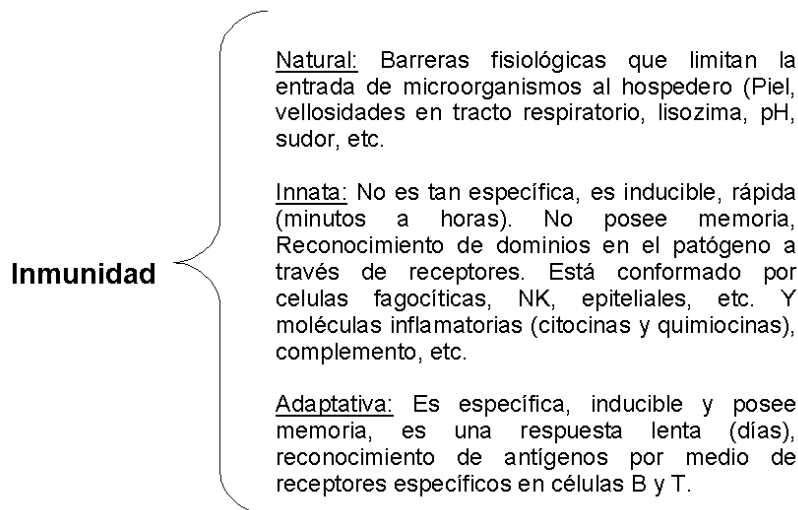


Fig. 2.2: Tipos de inmunidad y sus características

El sistema natural e innato poseen cuatro tipos de barreras defensivas: anatómica, fisiológica, fagocítica e inflamatoria.[14, 41]

Dentro de la barrera anatómica se encuentra la piel, que es parte del sistema tegumentario y está constituida por diferentes tejidos para realizar funciones específicas. Estructuralmente, la piel se divide en dos partes principalmente, la epidermis y la dermis[52].

La epidermis está formada por epitelio escamoso estratificado queratinizado. Aproximadamente un 90% de las células presentes son queratinocitos y un 8% son melanocitos, ambos se encuentran empaquetados estrechamente. La parte externa de la epidermis consta de células muertas saturadas de queratina.

La dermis está constituida de tejido conectivo, contiene vasos sanguíneos, nervios, folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas. Las glándulas

sebáceas asociadas a los folículos generan sebo que consta de ácido láctico y ácidos grasos que mantienen el pH de la piel entre 3 y 5 para inhibir el crecimiento de microorganismos[52, 14].

Cuando se ve afectada la integridad de la piel, se inicia una serie de procesos para reestablecer tanto la estructura como la función. Según la profundidad de la lesión, se pueden dividir en curación de heridas epidérmicas cuando sólo se afecta ésta capa o curación de heridas profundas cuando el daño llega a la dermis o al tejido subcutáneo.

Si una lesión llega a la dermis y el tejido subcutáneo, el proceso de regeneración es mucho mas complejo, ya que produce una respuesta inflamatoria asociado con contaminación bacteriana y factores presentes en el tejido necrótico (figura 2.3). Ésta respuesta desarrolla tres etapas, primero existe una vasoconstricción durando apenas unos minutos, posteriormente existe una vasodilatación que produce una permeabilidad de las proteínas plasmáticas, la tercera etapa es la infiltración de leucocitos al tejido[42, 52].

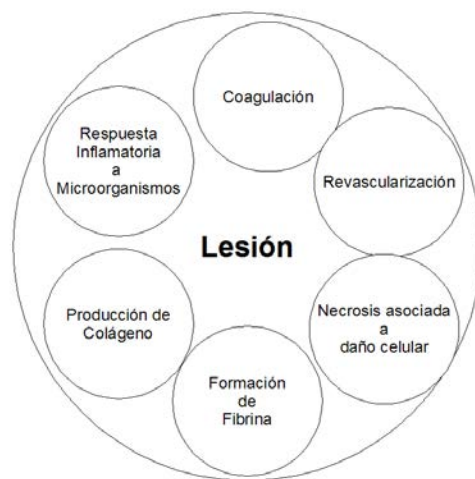


Fig. 2.3: Factores que están involucrados en la lesión con el fin de reparar el tejido y mantener la homeostasis

Cuando existe una herida profunda, se liberan aminas vasoactivas como la histamina, serotonina, bradiquinina y epinefrina. Juntos causan que las células de las vénulas se separen y produzcan una hemorragia local,



éste rompimiento genera una translocación suero, sodio, potasio, enzimas y sustratos[42]; el rompimiento es importante debido a que los microorganismos entran en contacto con componentes de la barrera fisiológica, fagocítica e inflamatoria del sistema inmune innato como sería el complemento, anticuerpos y algunas otras opsoninas que en conjunto con los macrófagos ayudarán a la erradicación del patógeno[42, 41, 14, 52] (Figura 2.4).

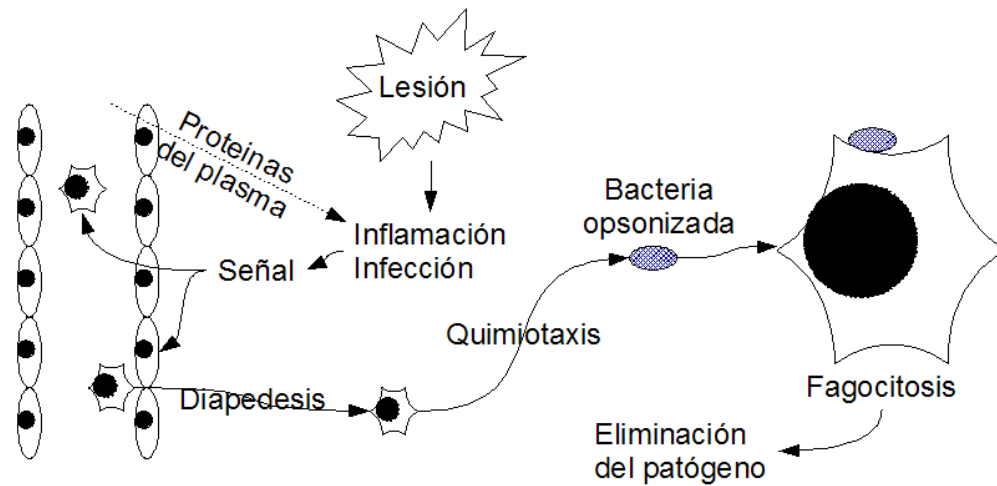


Fig. 2.4: Representación de los fenómenos asociados a la lesión y eliminación del patógeno adaptado de [41, 14]

### 2.3. Fagocitosis

La fagocitosis fue descrita a finales del siglo XIX por Eli Metchnikoff mientras estudiaba larvas de estrellas de mar, en sus observaciones reportó células que migraban e internalizaban partículas explicando el mecanismo de la teoría de inmunidad celular, la cual implica que los vertebrados poseen células especializadas en la eliminación de patógenos como mecanismo de defensa[8, 14, 55].

La fagocitosis forma parte de la endocitosis y se caracteriza por la internalización de partículas mayores de  $0.5\mu\text{m}$  de diámetro, dependiente de receptores y actina e independiente de clatrina. A éste proceso se le ha conferido un carácter multifuncional (Figura 2.5).[34, 25, 1]

Inicialmente la fagocitosis se consideró como un proceso no inmune, por el que organismos unicelulares obtienen nutrientes. Partículas tomadas del medio son internalizadas y degradadas por un conjunto de hidrolasas cuyo pH óptimo es ácido en los elementos unitarios que forman a las macromoléculas generando de esta manera compuestos útiles para la célula. Éste proceso se asemeja a una digestión; sin embargo, evolutivamente ha ampliado sus funciones[8, 29].

En organismos pluricelulares la fagocitosis extiende sus funciones hacia la homeostásis eliminando células apoptóticas y teniendo una gran actividad en la remodelación de tejidos[8]. Sin embargo, el papel principal que realiza en los mamíferos es la eliminación de patógenos y presentación de productos de la degradación a otras células del sistema inmune estableciendo un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa[19, 14, 22].

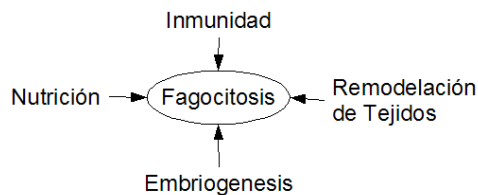


Fig. 2.5: Facetas de la fagocitosis. Esquema adaptado de [8]

Las células fagocíticas poseen la capacidad de distinguir entre las células propias de una variedad de patógenos (inmunidad innata). Esto es debido a que las células fagocíticas evolutivamente han seleccionado un número restringido de receptores que reconocen motivos de carbohidratos, lípidos, y proteínas conservados en los patógenos y que no se encuentran en organismos superiores.[19, 20, 40]

La fagocitosis consiste principalmente en dos etapas, la adhesión y la fagocitosis[3]. En la primera etapa existe un reconocimiento entre los receptores de membrana y patrones de moléculas asociadas a patógenos generando una unión por afinidad, posteriormente se lleva a cabo la segunda etapa que es la internalización del patógeno.

El fenómeno en general comprende 4 pasos[12]:

1. **Contacto:** Existe un reconocimiento y adhesión entre los receptores en la superficie de la célula y la partícula a ser fagocitada.
2. **Copa Fagocítica:** Una señal es generada induciendo la polimerización de actina en el sitio de contacto
3. **Extensión de la membrana:** Extensiones de membrana enriquecidos con actina rodean a la partícula de acuerdo con el modelo de *zipper*.
4. **Internalización:** La membrana se fusiona formando una vesícula endocítica que es atraída al interior de la célula
5. **Maduración:** Al fusionarse a ésta vesícula componentes endosomales y lisosomales se forma una nueva estructura llamada fagolisosoma, un compartimento ácido e hidrolítico que degrada a las partículas o al patógeno endocitado.

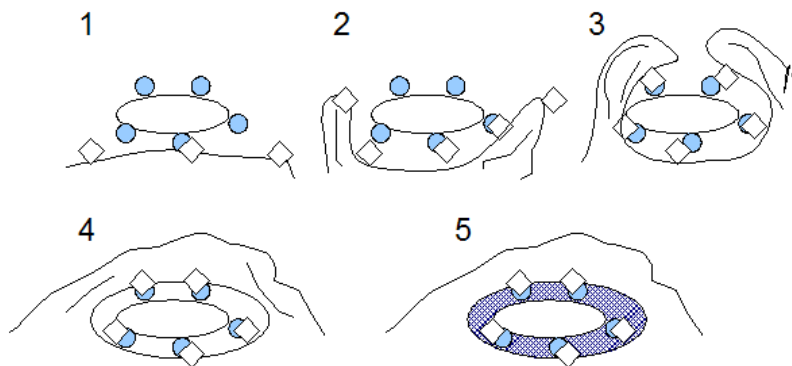


Fig. 2.6: Representación esquemática de la fagocitosis

La interacción entre la el macrófago y el patógeno es un fenómeno de gran complejidad, se encuentra involucrado la interacción de diversos receptores y una diversa señalización intracelular (Figura 2.7). [12, 55]

Dependiendo del receptor o receptores que interaccionen con el patógeno es la vía de señalización que decidirá la respuesta por parte del macrófago, desde el tiempo de internalización, secreción de citocinas, activación de macrófago, estallido respiratorio, etcétera.

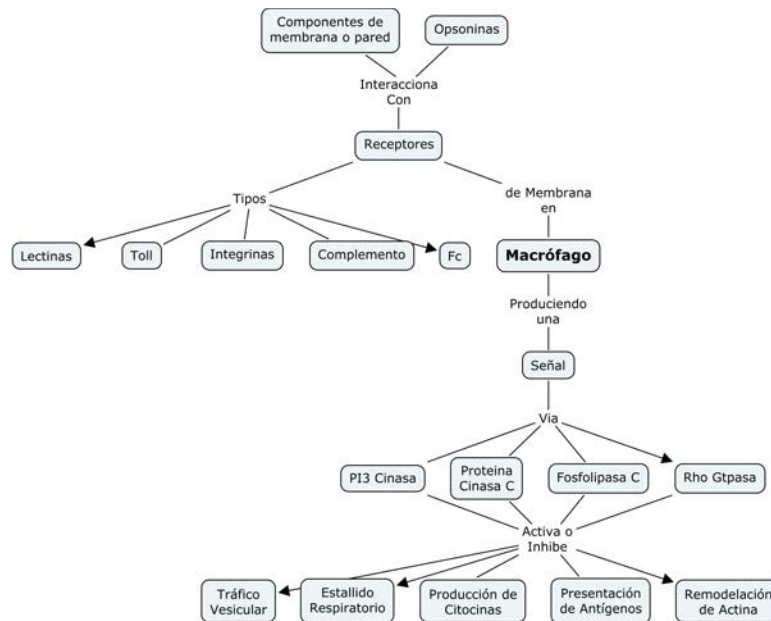


Fig. 2.7: Interacción del patógeno con receptores de membrana. Adaptado de [55]

Algunos de los receptores utilizados en el proceso fagocítico son: Receptores de Manosa (MR), Receptores de inmunoglobulina (FC), Receptores de complemento (CR) y Receptores *carroñeros* (Scavenger).

El receptor scavenger, tiene la particularidad que puede adherirse a su ligando dependiendo de su estructura y carga.[40] Dos miembros de ésta familia poseen la capacidad de internalizar patógenos, el Scavenger receptor A (SR-A) y MARCO (Macrophage receptor with collagenous structure) expresadas constitutivamente en los macrófagos. Los receptores scavenger a pesar que están involucrados en el proceso fagocítico su principal función es la adhesión y los receptores con mayor especificidad generan la señal de internalización del patógeno.[55]

Las proteínas del sistema del complemento presentes en el suero se encargan de la lisis de patógenos, sin embargo, también son capaces de opsonizar microorganismos y ser reconocidos e internalizados vía receptores específicos para el complemento.[14]

El receptor para el complemento CR3 se expresa en macrófagos y es capaz de reconocer el factor de complemento iC3b, sin embargo, requiere señales adicionales para internalizar patógenos. Se ha observado que el recep-

tor del complemento y el receptor de inmunoglobulina pueden tener efectos cooperativos.[55]

El receptor de manosa posee un papel importante en el sistema inmune innato y adaptativo por su capacidad de reconocer e internalizar un espectro único de monosacáridos.[10, 48, 51]

La afinidad del receptor de manosa por los oligosacáridos esta determinado en el azucar terminal; Sthal demostró que la afinidad es mayor por L-fucosa >D-manosa >D-N-acetil-glucosamina>D-Xilosa. [12] El receptor de manosa es calcio dependiente, reconoce a oligomanosas ramificadas o a residuos de dimanosa.[10, 23]

Los anticuerpos poseen una grán especificidad para adherirse al patógeno, su papel mas importante radica en el opsonizar patógenos para potencializar la fagocitosis por parte de los macrófagos y de los neutrófilos.[14]

Las partículas que se encuentran opsonizadas por IgG son reconocidas por diferentes receptores en la superficie de la célula ( $Fc\gamma R$ ). Dichos receptores reconocen el dominio Fc que se encuentra en las IgG. Los macrófagos expresan diferentes combinaciones de  $Fc\gamma R$  por lo que el reconocimiento de partículas opsonizadas por IgG ocurre simultáneamente a través de multiples receptores. Al activar receptores con alta afinidad ( $Fc\gamma RI$ ) y de baja afinidad ( $Fc\gamma RIIA$  y ( $Fc\gamma R$ )IIIA) se inicia la señalización para la internalización de la partícula mediante polimerización de actina.[55]

Una vez que los receptores membranales reconocen a los dominios presentes en la partícula, la membrana del macrófago encapsula a la partícula por un mecanismo tipo *zipper*. La vesícula fagocítica se fusiona con endosomas y lisosomas transformándola en un fagolisosoma degradando al patógeno.[12]

#### 2.4. Estudios sobre *S.schenckii*

En pruebas histopatológicas de tejido subcutáneo de pacientes infectados por *S. schenckii* se han encontrado mayoritariamente levaduras[32], aunque se han observado hifas cortas y se consideran como residuo de la transición dimórfica ya que ambas formas morfológicas provienen de una germínula.[4,

53]

Se ha observado que las levaduras de *S. schenckii* son fagocitados por macrófagos[17] y cuando se hacen interaccionar con leucocitos polimorfonucleares se observó que éste linaje celular en presencia de suero es capaz de eliminar al 80% de las levaduras en una hora debido a la fagocitosis y a la actividad del sistema de la mieloperoxidasa.[6]

Oda y colaboradores estudiaron que las levaduras de *S.schenckii* no son fagocitados eficientemente hasta que son opsonizados con concanavalina-A (ConA) y es dependiente de la concentración de opsonina y el número de receptores en la superficie del macrófago.[37] La baja fagocitosis es debido a la presencia de ácido siálico en levaduras de *S.schenckii*. Alviano y colaboradores caracterizan la presencia de ácido siálico como un factor de patogenicidad ya que contiene un grupo carboxílico fuerte que carga negativamente a la superficie del patógeno y le otorga la característica de dispersarse y repelerse inhibiendo su adhesión con los macrófagos.[2]

En el laboratorio se estudió la fagocitosis con la fase infectiva del hongo (Conidios) y se encontró que los conidios hialinos requieren de ser opsonizados con suero inmune, IgG o carbohidratos para poder ser internalizados.[5, 54]

### 3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

*Sporothrix schenckii* es el agente etiológico de la esporotricosis, una micosis subcutánea con alta incidencia en la república Mexicana. La principal vía de entrada del hongo es a través de la inoculación de material contaminado con conidios o fragmentos de micelio.[4]

Los macrófagos debido a su capacidad fagocítica desempeñan un papel importante en la erradicación del patógeno durante la etapa temprana de la infección; al internalizar al microorganismo, producen agentes antimicrobianos como las especies reactivas del nitrógeno (óxido nítrico y ácido nítrico) y oxígeno (ion superóxido, radical hidroxilo, ion hipoclorito y peróxido de hidrógeno), adicionalmente, producen enzimas hidrolíticas que se activan con el pH ácido del lisosoma.[14]

Estudios in vivo han mostrado que la virulencia composición de la pared celular (que varía con la edad del cultivo) es importante para la invasividad del hongo. Los conidios de 7 días, poseen un alto contenido en ramnosa y bajo en manosa, en tanto que en los conidios de 12 días se invierte esta relación. Los conidios de 12 días son fagocitados con una mayor eficiencia que los conidios de 7 días, adicionalmente, las levaduras aparentemente poseen mecanismos que protegen al patógeno de los efectos tóxicos de radicales del oxígeno y nitrógeno generado por los macrófagos.

La mayoría de estudios de *S.schenckii* se han llevado a cabo con la fase parásita del hongo inoculado en ratones donde estudios histopatológicos han mostrado la presencia de levaduras dentro de macrófagos.[17] Oda estudió la fagocitosis de levaduras y observó que existe una escasa fagocitosis y se logran internalizar cuando opsoniza con concanavalina-A.[37]

Éstos estudios están relacionados con la fase tardía de la infección; sin embargo, la esporotricosis se inicia por la inoculación de conidios o pequeños fragmentos miceliales en la epidermis, en éste proceso inicial se desconocen las interacciones que se llevan a cabo entre el conidio y el hospedero, así como el efecto de las diversas opsoninas que se encuentran presentes en el suero.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. *Objetivo General*

- Caracterizar la fagocitosis de conidios de *S.schenckii* por la línea celular U937.

### 4.2. *Objetivo específicos*

- Determinar la contribución de las opsoninas presentes en el suero preinmune e inmune en el proceso fagocítico.
- Determinar cualitativamente el pH de la vesícula donde residen los conidios opsonizados con suero preinmune.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Métodos

#### 5.1.1. Mantenimiento de la línea Celular

La línea celular U-937 se mantuvo en fase logarítmica con medio RPMI-1640 en ausencia de HEPES suplementado con suero fetal bovino al 10 % inactivado por calor en un ambiente de  $CO_2$  al 5 % con una temperatura de 37 °C. El inóculo inicial fue de  $1,3 \times 10^5$  células/mL y se subcultiva cada 72 hrs a una densidad de  $1,0 \times 10^6$ .

#### 5.1.2. Diferenciación de monocitos a macrófagos

La línea celular U937 es premonocítica por lo que se requiere su diferenciación a macrófagos para que tengan la capacidad de fagocitar. Las células se depositaron en cajas de cultivo de 24 pozos con cubreobjetos de 12 mm a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/pozo con 1.5 mL de medio de cultivo compuesto por 10 nM de PMA, 90 % de RPMI, 10 % de SFB. Se incubó 48 hrs a 37°C con un ambiente de 5 % de  $CO_2$ .

#### 5.1.3. Obtención de suero hiperinmune

El suero contra conidios de *Sporothrix schenckii* se obtuvo en un trabajo previo del grupo [5] utilizando conejos Nueva Zelanda de 3 meses de edad. Los conejos fueron inmunizados semanalmente en la vena marginal de la oreja con 1 mg/ml de la suspensión de conidios. Durante el esquema de inmunización se monitoreó el título de Abs por ELISA. Una vez que se alcanzó la máxima concentración de anticuerpos se realizó la sangría por punción cardiaca. Se centrifugó la sangre a 3000 rpm durante 30 minutos, se

descarto el paquete celular y se recuperó el suero anti-*Sporothrix schenckii*.

#### 5.1.4. Inactivación del complemento

Para inactivar el complemento en el suero de los experimentos así como el suero fetal bovino utilizado para mantener la línea celular, se calentó a 57 °C durante 30 minutos.[27]

#### 5.1.5. Eliminación de anticuerpos del Suero Hiperinmune

En algunos experimentos se utilizó suero hiperinmune y en otros el mismo suero al que se le eliminaron los anticuerpos (IgG). Para eliminar la IgG se utilizó una columna de afinidad de proteína A por la propiedad que tiene ésta para unir anticuerpos por sus fracciones Fc. Para ello, una pipeta pasteur se le colocó un tapón de fibra de vidrio y se lavó con buffer de carga (1M Fosfato de potasio, pH 9). Se resuspendieron 2 mL de proteína A-agarosa (Sigma) mediante agitación moderada y se cargó en la pipeta pasteur teniendo cuidado en no secar la resina. Se adicionó 1 mL de suero y se lavó con 5 mL de buffer de carga, se colectaron las fracciones de suero sin IgG monitoreadas por absorbencia a 280 nm. Se neutralizó el suero con 1.5M de tris base. Para liberar los anticuerpos de la columna se usó el buffer de corrida (0.1M ácido cítrico pH 3) se monitoreó por absorbencia y se neutralizó con tris base. La proteína total del suero se cuantificó por ensayo de Lowry. Se almacenó la columna a 4 °C en buffer de corrida para su posterior uso.[43]

#### 5.1.6. Peryodatación Suero

Para oxidar el suero, se realizó la técnica de Spiro[46], se tomaron 200  $\mu$ L de suero sin complemento y se oxidó a 4 °C durante 6h en la obscuridad en 200  $\mu$ L de buffer de acetatos 0.1M (pH=4.5) y 30 mg of  $NaIO_4$ . La reacción se detuvo agregando 200  $\mu$ L de etilenglicol a temperatura ambiente. La muestra fue dializada contra PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM  $Na_2HPO_4$ , 1.5 mM  $KH_2PO_4$ , pH 7.3) por 12 horas. El control utilizado fue suero no expuesto a peryodato.[46, 45]

### 5.1.7. Preparación de la Asialofetaina

El ácido siálico puede eliminarse por hidrólisis ácida debido a su posición terminal y naturaleza lábil de los enlaces glicosídicos. Se tomaron 10 mg de fetuina al que se le agregó 1 mL de  $H_2SO_4$  0.5N y se calentó durante 1 hora a 80 °C. La muestra se neutralizó con tris base 1.5M y se dializó contra PBS por 12 horas.[46]

### 5.1.8. Tratamiento de los cubreobjetos

Los cubreobjetos redondos de 12mm de diámetro fueron sonicados por 10 minutos con la finalidad de eliminar partículas adheridas a la superficie, se lavó con una disolución de extran al 1% durante 30 minutos en agitación y posteriormente fue lavado 3 veces con agua destilada con agitación por 30 minutos, al final del tratamiento los cubreobjetos fueron esterilizados en autoclave.

### 5.1.9. Condiciones de crecimiento de *S. schenckii*

Se utilizó la cepa EH257, aislada de un caso clínico de esporotricosis fija, procedente de Colombia. Fue crecido en medio mínimo (base nitrogenada sin aminoácidos 6.7 g, dextrosa 20 g, agar 20 g y agua destilada c.b.p. 1000 mL) y medio PDA (agar papa dextrosa 39 g y agua destilada c.b.p. 1000 mL) durante siete días a 28°C. Ésta cepa tiene la capacidad de producir conidios pigmentados en medio PDA y conidios hialinos en medio mínimo.

### 5.1.10. Obtención de conidios

Los conidios hialinos de *S. schenckii* se obtuvieron agregando de 3 a 5 mL de PBS 1X al cultivo de siete días[13], y se agitó con vortex de 10-15 segundos. Se filtró al vacío para eliminar el micelio. El filtrado se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm. El precipitado fue resuspendido en 1 mL de PBS 1X y se cuantificó utilizando la cámara de Neubauer.

#### 5.1.11. Oponización de conidios de *S. schenckii*

Los conidios fueron incubados con suero de conejo hiperimmune anti-*S.schenckii*, suero preimmune, suero hiperimmune inactivado por calor (30 min a 57 °C), suero preimmune inactivado por calor, suero depletado de IgG en PBS 1X durante 30 minutos a 37 °C. La suspensión de conidios se agitó a intervalos de 10 min. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X centrifugando cada vez a 5000 rpm durante 5 minutos.

#### 5.1.12. Fagocitosis de conidios en macrófagos U-937

Con la finalidad de estudiar el efecto de opsoninas en la fagocitosis, los macrófagos se infectaron con los conidios opsonizados o sin opsonizar a una multiplicidad de infección de 40 conidios/macrófago, se centrifugó la placa a 1000 rpm durante 1 minuto y se incubó a 4 °C durante 30 minutos para permitir la adhesión de los conidios a los receptores de la superficie del macrófago. Las placas se lavaron suavemente para desechar los conidios no unidos y seguidamente se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con la finalidad de que se llevara a cabo la internalización de los conidios. Las células se fijaron con metanol absoluto frío y se tiñeron en una disolución de Giemsa a una concentración 1:15 en PBS durante 30 minutos, posteriormente, los cubreobjetos se lavaron con agua destilada y se montaron en los portaobjetos con glicerol al 40 %. El índice fagocítico se obtuvo contando 100 macrófagos de distintos campos al azar. El índice fagocítico representa el número de macrófagos que han fagocitado al menos un conidio entre el número total de macrófagos observados.

Para estudiar el efecto inhibitorio de carbohidratos se realizaron ensayos de competencia con concentraciones crecientes de manosa o galactosa. Los macrófagos fueron infectados con conidios opsonizados con ovoalbúmina o suero preimmune a una multiplicidad de infección de 40 conidios/macrófago con el carbohidrato (manosa o galactosa), se incubó a 4 °C durante 30 minutos para llevar a cabo la adhesión posteriormente se incubó la placa durante 30 minutos a 37 °C con la finalidad de que se llevara a cabo la internalización. Se fijó con metanol absoluto frío y los cubreobjetos se tiñeron con

Giemsa, se montaron los cubreobjetos y se obtuvo el índice fagocítico.

### 5.1.13. *Inmunofluorescencia*

Se obtuvieron los conidios por filtración estéril, se lavaron con PBS y se resuspendieron en amortiguador de carbonatos pH 9. Posteriormente se incubaron en presencia de FIT-C (Sigma F4274) a una concentración de  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  por cada  $2 \times 10^7$  conidios durante durante media hora a temperatura ambiente en la obscuridad al cabo de éste tiempo los conidios se lavaron 5 veces con amortiguador de carbonatos. Los conidios fueron resuspendidos en PBS 1X y se opsonizó con la partícula deseada, posteriormente los macrófagos se infectaron con una multiplicidad de 40 conidios/macrófago, se centrifugó la placa a 1000 rpm durante 1 minuto y se incubó a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos para permitir la adhesión de los conidios a los receptores de la superficie del macrófago. Se lavó suavemente la monocapa para desechar los conidios no unidos y se incubó la placa durante 30 minutos a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  en RPMI con  $30\text{ }\mu\text{M}$  de DAMP con la finalidad que se llevara a cabo la internalización de los conidios e incorporar el DAMP al interior de la célula. Se fijó con una disolución de paraformaldehído al 2% conteniendo 10mM de Peryodato de sodio, 0.75M de Lisina, 37.5 mM de fosfato de sodio a un pH 6.2 [38, 30] durante media hora a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , se resuspendió en PBS y los cubreobjetos se almacenaron a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Los anticuerpos se centrifugaron a 12000 RPM durante 10 minutos, las células fueron permeabilizadas con tritón al 0.1% durante 5 minutos a  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ , se realizó un lavado en PBS y se agregó aproximadamente  $30\text{ }\mu\text{L}$  de anticuerpo de cabra contra DAMP (1:250,  $80\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpo). Se realizaron 3 lavados rápidos con PBS-Ovoalbúmina al 0.1%, se lavó 3 veces con 5 minutos entre lavado y lavado con la misma solución de PBS. Se agregó aproximadamente  $30\text{ }\mu\text{L}$  de anticuerpo contra Cabra acoplado a Alexa y se incubó durante 1 hora a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , se hicieron 3 lavados rápidos y 3 lavados con 5 minutos entre ellos. Las laminillas fueron montadas en portaobjetos (Solución de montaje: Moviol 0.5mL, Dabco 15.5 mg, DAPI  $5\mu\text{L}$ ).

*5.1.14. Viabilidad*

La viabilidad se monitoreo por la técnica de exclusión de azul de tripano al 0.05 % Antes de fijar las células conservando los datos cuya viabilidad fue mayor al 98 %.

*5.1.15. Prueba estadística*

Para determinar si la diferencia es significativa se realizó la prueba estadística T de student a dos colas empleando la paquetería estadística R[39], considerando significativo cuando la probabilidad es menor a 0.05.[21, 56]

## 6. RESULTADOS

### 6.1. La fagocitosis de conidios de *S.schenckii* es dependiente de la concentración del suero

En trabajos previos del laboratorio se observó que los conidios no son fagocitados eficientemente por los macrófagos [54, 5] por lo que se inició el estudio de las opsoninas que están involucradas en el proceso de internalización. Se opsonizaron conidios con suero hiperinmune anti-*S.schenckii*, y suero preinmune a concentraciones crecientes como fuente de complemento e IgG(Figura 6.2).

Con la finalidad de observar la internalización de los conidios se utilizó la tinción de Giemsa y la fagocitosis fue estudiada con microscopía de luz (Figura 6.1A). Los conidios de *S.schenckii* fueron opsonizados con suero e incubados con macrófagos y para poder discriminar entre conidios adheridos y conidios fagocitados se contaron sólo los conidios que se observaban dentro de vesículas (Figura 6.1).

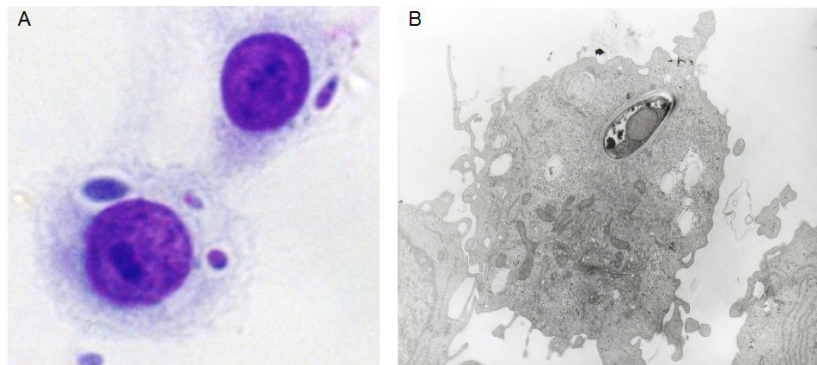


Fig. 6.1: A) Conidios en vesículas dentro de macrófagos U937 (Giemsa). B) Microfotografía electrónica mostrando una célula U937 con un conidio de *S.schenckii* internalizado. Fotografía: Coronel-Cruz[5]



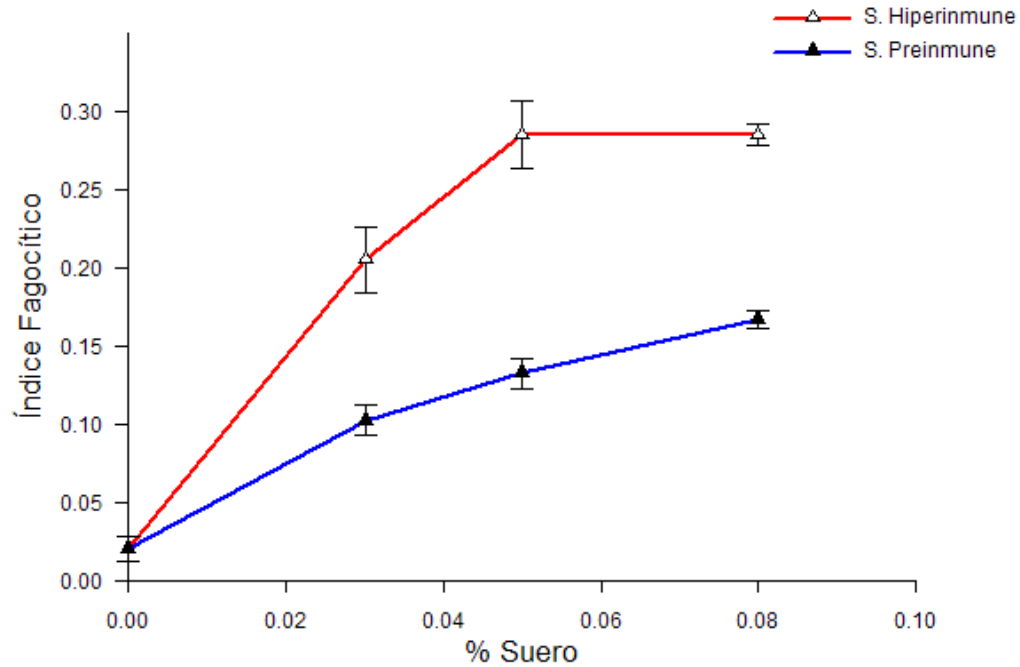


Fig. 6.2: Índice fagocítico de conidios de *Sporothrix schenckii* opsonizado con concentraciones crecientes de suero hiperinmune anti-*Sporothrix schenckii* y suero preinmune con una multiplicidad de infección de 40 conidios por macrófago, 30 minutos de adhesión a 4°C y 30 minutos de fagocitosis a 37°C. Los datos representan la Media  $\pm$ Desviación típica

Es notable observar que a concentraciones bajas de opsonina existe fagocitosis y al opsonizar tanto con el suero hiperinmune como con el suero preinmune se observa un incremento significativo en la internalización con respecto a los conidios no opsonizados ( $P < 0.05$ ).

Nuestros datos indican que la fagocitosis es dependiente de la concentración del suero, adicionalmente existe una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) al utilizar el suero preinmune (incremento de 0.02 a 0.13) con respecto al suero hiperinmune (incremento de 0.02 a 0.28) probablemente debido a la presencia de anticuerpos anti-*S.schenckii*.

## 6.2. Contribución de componentes presentes en el suero a la fagocitosis de conidios de *S.schenckii*

El suero está formado por una gran cantidad de compuestos, entre sus componentes se encuentran anticuerpos, elementos del complemento, glicoproteínas y carbohidratos que pueden participar como opsoninas en la fagocitosis de patógenos. Para estudiar la contribución de dichos elementos se opsonizaron conidios con a) suero hiperinmune, b) suero hiperinmune depletado de IgG, c) suero hiperinmune inactivado con calor, d) suero hiperinmune inactivado por calor y depletado de IgG, e) suero preinmune y f) suero preinmune inactivado con calor (Figura 6.3).

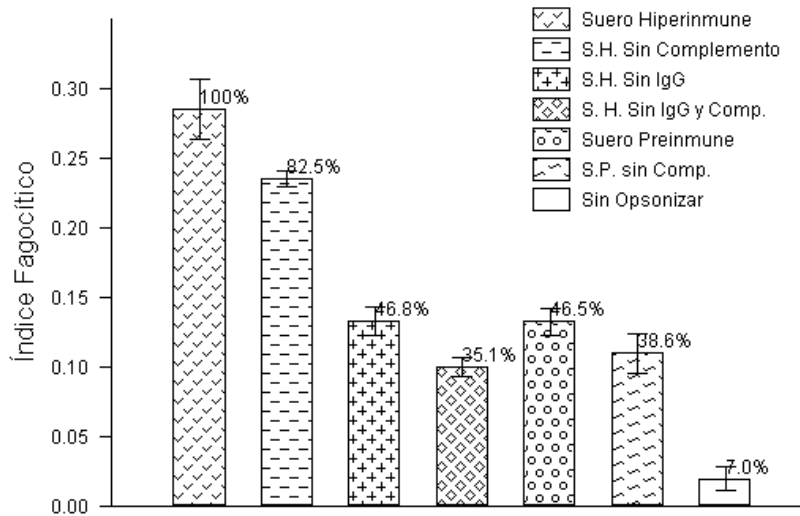


Fig. 6.3: Efecto de diversos elementos inmunes en la fagocitosis. Los conidios fueron opsonizados con  $40\mu\text{g/mL}$  de proteína sérica a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 min. Los datos representan la Media  $\pm$ Desviación típica

La diferencia entre el índice fagocítico de conidios opsonizados con diversos tipos de sueros con respecto al hiperinmune indica el aporte de las opsoninas a la internalización de los conidios. Nuestros resultados muestran que la fagocitosis está mediada en su mayor parte por anticuerpos (53.23%) en una menor proporción, por el sistema de complemento (17.55%) sin embargo se observó un porcentaje (29.22%) está mediada por otros elementos.

---

Al depletar al suero hiperinmune de IgG e inactivar los componentes termolábiles del complemento, no se encontraron diferencias significativas con el suero preinmune inactivado por calor indicando que los elementos desconocidos que intervienen en la fagocitosis se encuentra en los dos sueros.

### 6.3. *Existen glicoproteínas que favorecen el proceso de fagocitosis*

En el suero se encuentran presentes elementos que pueden opsonizar a los patógenos y ayudar en el proceso fagocítico distintos al sistema del complemento o a la familia de las inmunoglobulinas, dichos elementos son glicoproteínas que al exponer su dominio de carbohidratos a receptores específicos (receptor de manosa, receptor de galactosa, etc) promueven la adhesión y la internalización de partículas a los macrófagos.[12]

Con la finalidad de determinar si la opsonina responsable de la fagocitosis es de naturaleza glicoprotéica los sueros se trataron con peryodato[46] a fin de oxidar los residuos glicosídicos terminales de las glicoproteínas con lo que se altera la conformación de los dominios de carbohidratos que se encuentran presentes en las glicoproteínas alterando su función opsonizante (Figura 6.4).

Se observó que los conidios que se opsonizaron con el suero peryodatado perdieron la capacidad de ser reconocido por el macrófago por lo que disminuyó el índice fagocítico al nivel basal, corroborando que un dominio de carbohidrato presente en las glicoproteínas son responsables de la interacción con el macrófago en el proceso fagocítico.

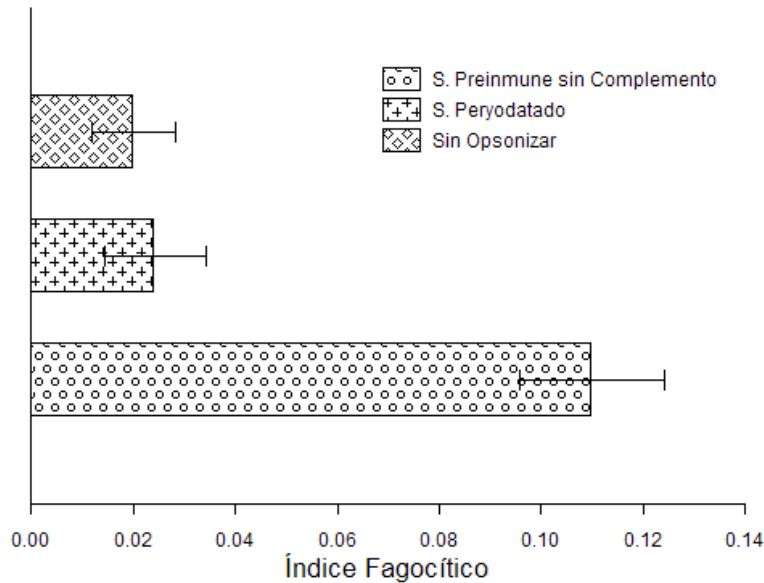


Fig. 6.4: Índice fagocítico de conidios opsonizado con suero preimmune sin complemento, suero preimmune peryodatado y conidios sin opsonizar. Los conidios fueron opsonizados con  $40\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína sérica durante 30 min. a  $37^\circ\text{C}$ . Los datos representan la Media  $\pm$  Desviación típica

#### 6.4. La fagocitosis de conidios de *S.schenckii* opsonizado con suero preimmune es inhibido por Manosa

Los macrófagos poseen en su superficie receptores que reconocen a los dominios de carbohidratos presentes en los organismos patógenos, uno de los receptores mas estudiados es el de manosa el cual posee afinidad por L-fucosa > D-manosa > D-N-acetil-glucosamina > D-Xilosa.[12]

Con la finalidad de determinar si el receptor que está reconociendo a la glicoproteína que opsoniza al conidio es el receptor de manosa, se realizaron ensayos de competencia con el conidio opsonizado con a) el suero preimmune inactivado y b) conidios opsonizados con ovoalbúmina contra manosa y galactosa obteniendo la figura 6.5

El monosacárido D-manosa inhibe la fagocitosis de conidios casi en su totalidad a concentraciones altas; sin embargo, el monosacárido D-Galactosa inhibe parcialmente la fagocitosis de los conidios indicando una menor participación en la internalización del patógeno.

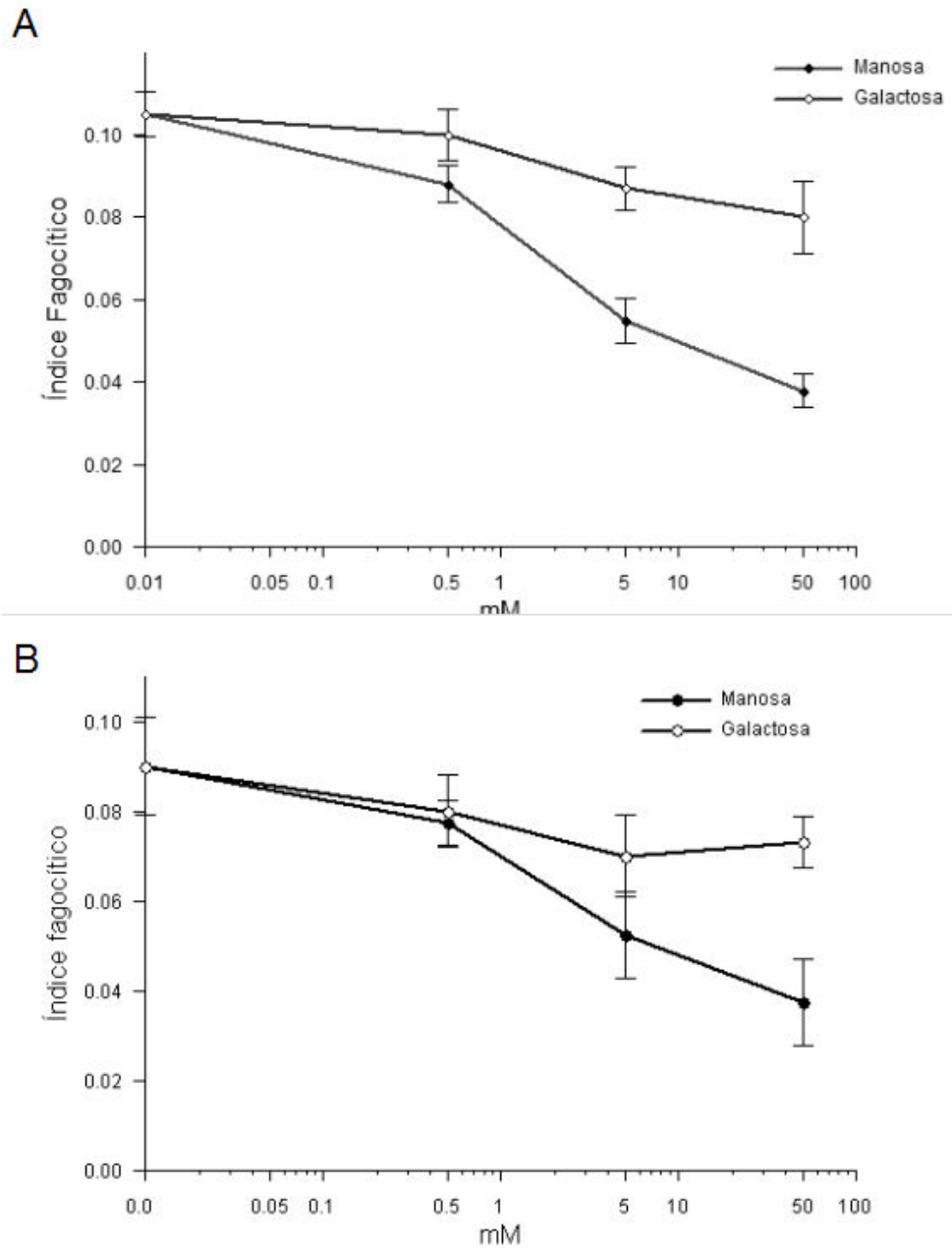


Fig. 6.5: Gráficas de fagocitosis de *S.schenckii* por células U937 en experimentos de competencia con carbohidratos monosacáridos. A) Opsonizado con suero preinmune sin complemento, B) Opsonizado con ovoalbúmina con concentraciones crecientes de manosa o galactosa. Los datos representan la Media  $\pm$  Desviación típica

Los resultados muestran que la afinidad por el inhibidor fue mayor para la manosa y en un grado mucho menor por la galactosa indicando que la fagocitosis está mediada por el receptor de manosa del macrófago.

### 6.5. La fagocitosis de conidios opsonizados con suero preimmune inactivado por calor está mediado por el receptor de manosa

Con la finalidad de confirmar la interacción entre la opsonina presente en el suero y el receptor de manosa, se realizaron experimentos opsonizando los conidios con ovoalbúmina la cual presenta un dominio de manosa que es reconocido por el receptor de manosa[47] y como control se utilizó la asialofetuina que presenta dominio de galactosa y no es reconocida por el receptor de manosa.[36] (figura 6.6)

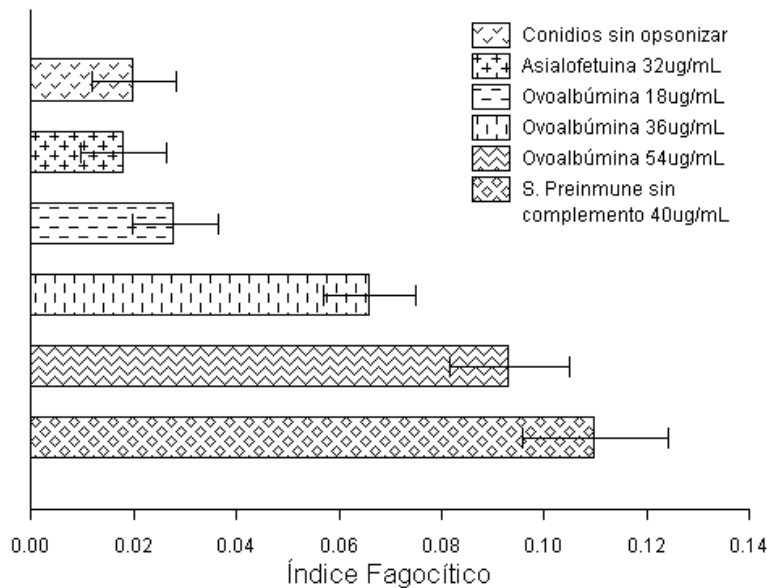


Fig. 6.6: Fagocitosis de conidios opsonizados con ovoalbúmina, asialofetuina, suero preimmune inactivado por calor y sin opsonizar. Los conidios fueron incubados a 37°C por 30 minutos. Los datos representan la Media  $\pm$  Desviación típica

Los resultados muestran que no existen diferencias significativas en la

fagocitosis cuando se compara suero preinmune sin complemento y ovoalbúmina lo que sugiere que el dominio que se reconoce es el de manosa.

Al opsonizar con Asialofetina se observa una baja fagocitosis equivalente al obtenido si no se opsoniza el conidio, probablemente debido a que el macrófago posee un bajo reconocimiento hacia la galactosa.[12]

### 6.6. *Los conidios vivos y muertos opsonizados con ovoalbúmina o suero preinmune residen en vesículas ácidas*

Una vez que el macrófago reconoce al patógeno se lleva a cabo el proceso de internalización hasta que el patógeno reside en un endosoma que madurará hasta llegar a ser un lisosoma; dicho compartimento posee un pH ácido que activa a un conjunto de enzimas capaces de degradar al patógeno. El mecanismo de evasión de algunos organismos consiste en modular tanto el pH como el tipo de vesícula en el que residen, impidiendo la maduración del endosoma.

Estudios realizados previamente por nuestro grupo han mostrado que *S.schenckii* sobrevive a la fagocitosis por lo que se realizaron experimentos para determinar cualitativamente el pH intravacuolar.

Se utilizó DAMP (amina básica débil) que se difunde al interior de la célula y se concentra dentro de organelos ácidos.[16] La molécula de DAMP no posee fluorescencia por si misma, así que es necesario localizarla con un anticuerpo antiDAMP acoplado a Alexa595 de color rojo. Con la finalidad de localizar los conidios, éstos se marcaron con FIT-C que es un compuesto fluorescente de color verde que se une a proteínas en la parte amino terminal. Para localizar el núcleo de las células se agregó DAPI otro fluorocromo de color azul que se intercala en el material genético.

Los conidios de *S.schenckii* internalizados por el macrófago fueron identificados por la fluorescencia verde producida por el FIT-C. Cuando el lisosoma se acidifica, la concentración de DAMP aumenta intensificando así la fluorescencia roja. Cuando se mezcla el color verde del Fit-C con el color rojo del Alexa595 se observa una colocalización Amarillo-Naranja indicando que el conidio reside en vesículas ácidas como se muestra en la figura 6.7

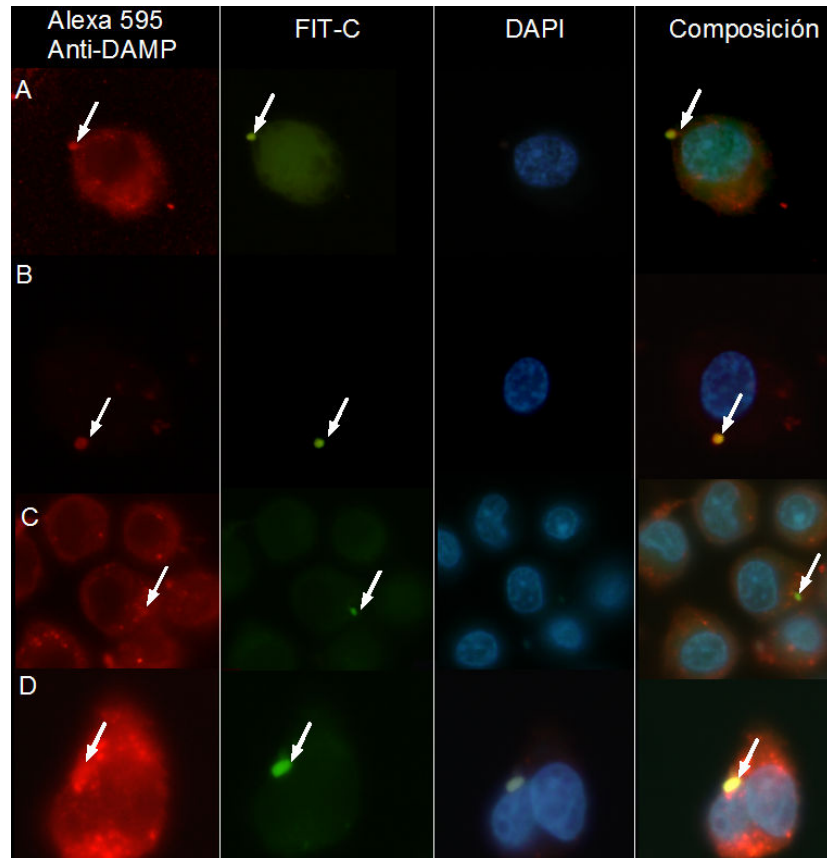


Fig. 6.7: Colocalización de conidios en vesículas ácidas A) conidios vivos opsonizados ovoalbumina, B) conidios muertos opsonizados ovoalbumina C) conidios vivos opsonizados suero preinmune D) conidios muertos opsonizados suero preinmune

Nuestras observaciones indican que los conidios de *S.schenckii* opsonizados con ovoalbúmina o suero preinmune sin complemento (entrada al macrófago vía receptor de manosa) residen en vesículas ácidas a los 30 minutos.



## 7. DISCUSIÓN

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del hospedero y gracias a ella muchos microorganismos invasores potencialmente patógenos, son eliminados rápidamente o bien al dispararse la inmunidad innata se activan mecanismos específicos de la inmunidad adaptativa que los eliminará completamente. Uno de los mecanismos de la inmunidad innata es la fagocitosis que requiere del reconocimiento de componentes del microorganismo por receptores específicos membranales de las células fagocíticas. No se conocen muchos detalles de la fagocitosis del hongo *Sporothrix schenckii* por lo que es ésta tesis se abordó el tema a fin de contribuir al conocimiento en este campo.

En éste trabajo se estudiaron los requerimientos opsónicos para la fagocitosis de conidios de *S.schenckii* en macrófagos de la línea celular U937. Los resultados *in vitro* demostraron que los conidios son fagocitados con baja eficiencia por lo que la opsonización con elementos presentes en el suero (factores termolábiles como el complemento, factores termoestables como las inmunoglobulinas y glicoproteínas) son requerimiento para el reconocimiento inmune del patógeno hacia los macrófagos.

Nuestros resultados sugieren que la fagocitosis de *S.schenckii* es mediada por tres distintos receptores: Receptor de complemento, receptor de Fc y receptor de manosa. Las opsoninas mayoritarias en el suero son los elementos del complemento (C3b) e inmunoglobulinas, dichas opsoninas favorecen la unión del patógeno a receptores específicos facilitando la internalización. Las proteínas del sistema del complemento no contribuyen significativamente al proceso fagocítico de *S.schenckii* debido a que al inactivar el suero con calor, sólo se observa una ligera disminución en la fagocitosis. La fagocitosis disminuye significativamente cuando el suero es depletado de IgG mostrando la

importancia de la presencia de anticuerpos para el reconocimiento del hongo. Al inactivar el suero con calor y depletarlo de IgG, no se logra a observar niveles basales indicando la presencia de otros elementos que influyen en el proceso fagocítico. En nuestro sistema experimental se encontró que las glicoproteínas del suero son importantes para la internalización del hongo ya que al eliminar los residuos de carbohidrato con metaperyodato se reduce la fagocitosis a niveles basales. Éste resultado implica que las glicoproteínas séricas están involucradas en el reconocimiento de los conidios a través del receptor en el macrófago.

Nuestros experimentos de inhibición de la fagocitosis por monosacáridos demostraron una gran capacidad inhibitoria por la manosa, por lo que se propone que la fagocitosis es facilitada por opsonización y el reconocimiento ocurre en estas condiciones a través del receptor de manosa.

El receptor de manosa es una lectina dependiente de calcio que actúa como un receptor endocítico expresado en la superficie de diversas líneas celulares: endotelio hepático, macrófagos alveolares, y macrófagos derivados de monocitos. Se encuentra relacionado con la eliminación de glicoconjugados con dominios terminales de manosa, L-Fucosa, glucosa o N-acetilglucosamina.[24] Éste receptor también es un receptor fagocítico involucrado con el sistema inmune innato y adaptativo. El receptor de manosa se une a dominios de carbohidratos presentes en diversos patógenos como bacterias, parásitos, hongos y virus; por lo que se considera un receptor de reconocimiento a patógenos (PRR).[48]

Una vez que se ha estudiado el mecanismo de entrada hacia el macrófago, se procedió a determinar el tipo de compartimento en el que reside el patógeno. Nuestros datos muestran que al internalizar a los conidios hialinos de *S.schenckii* mediante el receptor de manosa (opsonizando con ovoalbúmina o suero preinmune inactivado por calor) el hongo reside en un fagosoma ácido. Estos datos sugieren que a diferencia de otros patógenos como *H.capsulatum*, *S.schenckii* no regula el pH del fagosoma.[11]

La capacidad del macrófago para acidificar el fagosoma en el que reside *S. schenckii* sugiere que la ATPasa vacuolar responsable de la acidificación no es excluida del fagosoma.

Nuestros datos muestran que la opsonización con moléculas del suero es esencial para la fagocitosis de *S.schenckii* y la característica que el complemento no aumenta la internalización sugiere que el conidio evade el ser eliminado por fagocitosis debido a la presencia de moléculas en la superficie de la célula que protege al hongo de la fagocitosis.

Existen diversos ejemplos de evasión. La adhesión de microorganismos no opsonizados al macrófago puede ser inhibido por carbohidratos presentes en la membrana del patógeno. La cápsula de *Cryptococcus neoformans* es antifagocítica.[49] La cápsula de algunos microorganismos inhiben la activación del complemento su deposición en las células patógenas.[28] La virulencia de *S.schenckii* ha sido correlacionada con la fracción de manosa con respecto a ramnomanosa en la pared de los conidios obtenidos a diferentes tiempos de crecimiento.[13] Se ha encontrado ácido siálico en la superficie de algunos patógenos como *F.pedrosoi*, *C.neoformans* y *S.schenckii*, éstos residuos poseen un papel importante en protección de los patógenos contra la fagocitosis por macrófagos.[2] Al tratar a *S.schenckii* con Neuramidinasa se incrementa significativamente la fagocitosis por parte de macrófagos peritoneales demostrando que la presencia de ácido siálico en la superficie de la pared protege al hongo de la internalización y eliminación.[37]

En resumen, éste trabajo contribuye al entendimiento de la interacción del conidio de *S.schenckii* con el macrófago. Se demostró que una glicoproteína sérica con afinidad hacia el receptor de macrófago incrementa la fagocitosis en mayor grado que el sistema del complemento. Nuestros datos sugieren que la actividad antifagocítica de los conidios puede ser el resultado de una inhibición por ácido siálico presente en la pared del hongo; sin embargo, ésta inhibición se elimina por la opsonización con glicoproteínas o anticuerpos específicos.

La mayoría de estudios de *S.schenckii* se han llevado a cabo con la fase parásita del hongo inoculado en ratones donde estudios histopatológicos han mostrado la presencia de levaduras dentro de macrófagos.[17] Éstos estudios están relacionados con la fase tardía de la infección; sin embargo, la esporotricosis se inicia por la inoculación de conidios o pequeños fragmentos miceliales en la epidermis, en éste proceso inicial se desconocen las interacciones que

se llevan a cabo entre el conidio y el hospedero.

Nuestros resultados proponen que la variedad de opsoninas reportadas aquí proveen al conidio una estrategia que facilita la invasión del hospedero. La opsonización previene el reconocimiento por parte del sistema inmune del hospedero para evitar una entrada específica al macrófago y provee un mecanismo para sobrevivir y proliferar intracelularmente.

Al internalizar los conidios dentro del macrófago, el fagosoma madura a fagolisosoma acidificando la vesícula donde reside el patógeno, sin embargo, se desconoce la sobrevivencia del patógeno y si es capaz de realizar su transición dimórfica dentro del macrófago.

### 7.1. Modelo propuesto

De acuerdo con los resultados se propone el siguiente modelo:

En un traumatismo con material contaminado de *S.schenckii* en donde se ve afectada la integridad de la piel existe una respuesta por parte del sistema inmune innato. Los macrófagos son los encargados de regular la respuesta inmune además de eliminar al patógeno (conidios). Los conidios no son reconocidos por los receptores presentes en el macrófago, probablemente por la presencia de ácido siálico, al residir en el medio extracelular se puede llevar a cabo su transición dimórfica a levadura por las condiciones del medio.

Los conidios al estar en contacto con los componentes del suero son opsonizados tanto por glicoproteínas, sistema del complemento e inmunoglobulinas donde pierden su carácter antifagocítico y pueden ser internalizado por tres vías: receptor Fc, receptor de complemento y receptor de manosa. El fagosoma a los 30 minutos se observa acidificado con la finalidad de activar enzimas hidrolíticas, realizar estallido respiratorio y así erradicar al patógeno (Figura 7.1).

El modelo posee algunas limitantes ya que se desconoce la sobrevivencia de *S.schenckii* dentro del macrófago por lo que no se puede determinar si el patógeno utiliza al fagocito como un mecanismo de evasión. No es posible conocer donde se lleva a cabo la transición dimórfica (dentro del macrófago o en el medio extracelular).

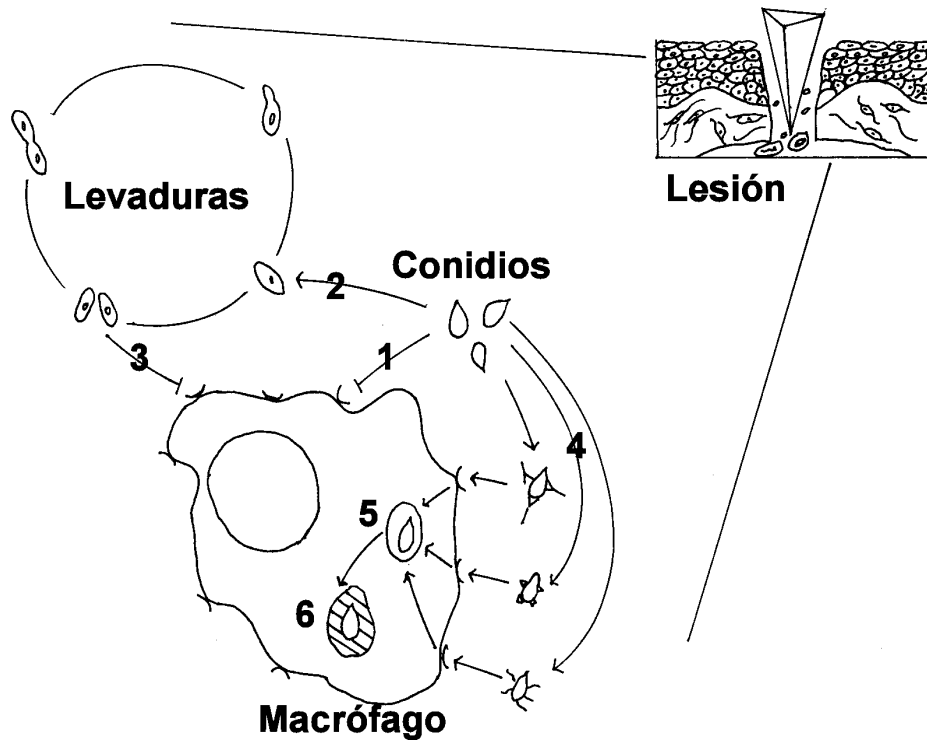


Fig. 7.1: Modelo propuesto: En un traumatismo con material contaminado de *S.schenckii* en donde se ve afectada la integridad de la piel existe una respuesta por parte del sistema inmune innato. Los macrófagos son los encargados de regular la respuesta inmune además de eliminar al patógeno (conidios). 1) los conidios no son reconocidos por los receptores presentes en el macrófago, probablemente por la presencia de ácido siálico que inhibe la fagocitosis. 2) Los conidios podrían estar en el espacio intercelular donde se puede llevar a cabo su transición dimórfica a levadura por las condiciones del medio. 3) Las levaduras de *S.schenckii* no son reconocidos por el macrófago y podrán permanecer en el espacio intercelular o afectar otro linaje celular. 4) Los conidios al estar en contacto con los componentes del suero son opsonizados tanto por glicoproteínas, sistema del complemento e inmunoglobulinas. 5) El conidio al ser opsonizado puede entrar al macrófago por tres vías, receptor Fc, receptor de complemento y receptor de manosa. 6) El fagosoma a los 30 minutos se observa acidificado con la finalidad de erradicar al patógeno. Se desconoce la sobrevivencia de *S.schenckii* dentro del macrófago y si éste puede llevar a cabo su transición dimórfica dentro del macrófago

## 8. CONCLUSIONES

- La fagocitosis del hongo *S.schenckii* por macrófagos U937 es dependiente de la concentración de Opsonina.
- La fagocitosis en su mayor parte está mediada por anticuerpos (53.23 %).
- El aporte del complemento en la fagocitosis es del 17.55 %.
- Existen opsoninas de naturaleza glicoprotéica que contribuyen al proceso fagocítico en un 29.22 %.
- Dichas opsoninas poseen terminales que son reconocidas por el receptor de manosa
- Los conidios de *S.schenckii* residen en vesículas ácidas dentro de los macrófagos

## 9. PERSPECTIVAS

- Caracterizar las glicoproteínas asociadas al proceso fagocítico.
- Determinar con anticuerpos la interacción con el receptor de manosa.
- Determinar las variantes de opsoninas en suero de pacientes y personas sanas.
- Describir el tránsito intracelular dependiendo de la vía de entrada.
- Estudiar la sobrevivencia de *S.schenckii* dentro del macrófago.
- Estudiar la transición dimórfica de *S.schenckii* dentro del macrófago.
- Caracterizar la interacción de conidios de *S.schenckii* en otras líneas celulares.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Aderem and et al. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.*, 17:593–623, 1999.
- [2] C. S. Alviano. Sialic acids in fungi: A minireview. *Glycoconjugate Journal*, 16:545–554, 1999.
- [3] J. M. Besterman and et al. Macrophage phagocytosis: analysis of particle binding and internalization. *American Physiological Society*, 242:339–346, 1982.
- [4] A. Bonifaz. *Micología médica básica*. Méndez editores, México, 2nd edition, 2000.
- [5] C. Coronel-Cruz. *Estudio de la fagocitosis de conidios de Sporothrix schenckii en la línea celular U-937*. Tesis UNAM, México, 2005.
- [6] K. M. Cunningham and et al. Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii*. *Journal of infectious diseases*, 140(5):815–817, 1979.
- [7] B. De-Lima and et al. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in rio de janeiro, brazil. *Int J Dermatol*, 42(9):677–681, 2003.
- [8] M. Desjardins and et al. Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 207:158–165, 2005.
- [9] D. Dixon and et al. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest u.s. epidemic of sporotrichosis. *Journal Clinical Microbiology*, 29(6):1106–1113, 1991.



- 
- [10] L. East and et al. The mannose receptor family. *Biochemical et biophysica Acta*, 1572:364–386, 2002.
- [11] L. Eissenberg and et al. *Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. *J. Exp. Med.*, 177:1605–1611, 1993.
- [12] A. Ezckowitz and et al. *Innate Immunity*. Humana press, 2003.
- [13] K. S. S. Fernandez and et al. Virulence of *sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology*, 101:563–569, 2000.
- [14] R. Goldsby and et al. *Immunology*. Freeman, USA, 5th edition, 2003.
- [15] L. Hektoen and et al. Refractory subcutaneous abscesses caused by *sporothrix schenckii*. a new pathogenic fungus. *The journal of experimental medicine*, 5(1):77–89, 1900.
- [16] Y. Hirota and et al. Analysis of post-lysosomal compartments. *Biochemical and Biophysical research communications*, 314:306–312, 2004.
- [17] M. Hiruma and et al. Tissue response in sporotrichosis: light and electron microscopy studies. *Mycoses*, 35:35–41, 1992.
- [18] D. Howard and et al. Dimorphism of *Sporotrichum schenckii*. *Current Opinion in Microbiology*, 81:464–469, 1961.
- [19] C. Janeway and et al. *Immunobiology*. Garland Publishing, 5th edition, 2001.
- [20] C. Janeway and et al. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20:197–216, 2002.
- [21] J. Kinney. *Statistics for science and engineering*. Addison Wesley, 2001.
- [22] M. Labro. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions:immunomodulation or immuno-fairy tales? *Clinical microbiology reviews*, 13(4):615–650, 2000.

- 
- [23] S. Linehan and et al. *The Biology and pathology of innate immunity mechanisms*. Academic/Plenum Publishers, 2000.
- [24] S. A. Linehan and et al. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 189(12):1961–1972, 1999.
- [25] H. Lodish and et al. *Molecular cell biology*. Freeman, USA, 4th edition, 1999.
- [26] L. Lopes-Bezerra and et al. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An. Acad. Bras. Cienc*, 78(2):293–308, 2006.
- [27] L. Marodl and et al. Mechanisms of host defense against *Candida* species i. phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *Journal of Immunology*, 146:2783–2789, 1991.
- [28] Marques and et al. Deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type iii group b streptococci. *Infection and Immunity*, 60:3986–3993, 1992.
- [29] R. May and et al. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of cell science*, 114(6):1061–1077, 2001.
- [30] I. McLean and et al. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative, a new fixative for immunoelectron microscopy. *Journal of histochemistry and cytochemistry*, 22(12):1077–1083, 1974.
- [31] Mesa-Arango and et al. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *J Clin Microbiol*, 40(8):3004–11, 2002.
- [32] L. J. Méndez-Tovar and et al. Esporotricosis cutánea fija incógnita. *Rev Iberoam Micol*, 21:150–152, 2004.

- 
- [33] R. Morris-Jones and et al. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infection and Immunity*, 71(7):4026–4033, 2003.
- [34] S. Mukherjee and et al. Endocytosis. *Physiological Reviews*, 77(3):759–803, 1997.
- [35] E.Ñeyra and et al. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3):1348–1352, March 2005.
- [36] B.Ñilsson and et al. Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin. *Journal of biological chemistry*, 254(11):45–S–4553, 1979.
- [37] L. M. Oda and et al. Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Infection and immunity*, 39(2):497–504, 1983.
- [38] Oxford biomedical research, Oxford Miami, USA. *Acidic Granule Kit, Product D 09*.
- [39] R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria, 2006. ISBN 3-900051-07-0.
- [40] P. Rice and et al. Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1 → 3)- $\beta$ -d-glucans. *Journal of Leukocyte Biology*, 72:140–146, 2002.
- [41] E. Rojas. *Inmunología de memoria*. Editorial médica panamericana, México, 2nd edition, 2001.
- [42] J. Schilling. Wound healing. *Physiological Reviews*, 48(2):374–423, 1968.
- [43] Sigma-Aldrich. *Antibody purification using protein A, protein G, or Protein L Agarose*, 2005.
- [44] C. Sánchez-Martínez and et al. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*-similar inputs, different outputs. *Current Opinion in Microbiology*, 4:214–221, 2001.

- 
- [45] R. Spiro. Periodate oxidation of the glycoprotein fetuin. *Journal of biological chemistry*, 239(2):567–573, 1964.
- [46] R. G. Spiro. Characterization of carbohydrate units of glycoprotein. *New Engl. J. Med*, 566(269):26–52, 1963.
- [47] P. Stahl and et al. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75(3):1399–1403, 1978.
- [48] P. Stahl and et al. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current opinion in immunology*, 10:50–55, 1998.
- [49] J. Steenberg and et al. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *PNAS*, 98(26):15245–15250, 2001.
- [50] J. Tay and et al. *Microbiología y parasitología médica*. Méndez editores, México, 2nd edition, 1998.
- [51] P. Taylor and et al. Macrophage receptors and immune recognition. *Annual review of immunology*, 23:901–944, 2005.
- [52] Tortora and et al. *Principios de anatomía y fisiología*. Oxford university press, México, 9th edition, 2001.
- [53] L. Travassos and et al. *Sporothrix schenckii* and related species of *ceratocystis*. *The journal of experimental medicine*, 5(1):77–89, 1900.
- [54] A. Trejo-Gómez. *Identificación de los Receptores involucrados en la internalización de los conidios de Sporothrix schenckii en macrófagos humanos de la línea celular U937*. Tesis UNAM, México, 2005.
- [55] D. Underhil and et al. Phagocytosis of microbes: Complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.*, 20:825–852, 2002.
- [56] J. Zar. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, 1999.