



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

“PARTICIPACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD4 Y LAS CÉLULAS
DENDRÍTICAS EN EL DESARROLLO DE UNA RESPUESTA INMUNE
PROTECTORA EN CONTRA DE *SPOROTHRIX SCHENCKII*”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ALBERTO GARCÍA LOZANO

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

COMITÉ TUTOR:
DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA
FACULTAD DE MEDICINA
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2020



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.

INDICE.

➤	INDICE DE IMÁGENES, TABLAS Y FIGURAS.....	4
➤	ABREVIATURAS.....	5
➤	RESUMEN.....	7
➤	ABSTRACT.....	8
➤	INTRODUCCIÓN.....	9
❖	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL HONGO Y ETIOLOGÍA DE LA ESPOROTRICOSIS.....	9
❖	RESPUESTA IMUNE EN CONTRA DEL HONGO.....	12
❖	MEMORIA INMUNOLÓGICA MEDIADA POR LINFOCITOS T.....	16
❖	TOXINA DEL COLERA Y SU UTILIZACIÓN COMO ADYUVANTE EN PIEL.....	21
➤	HIPÓTESIS.....	22
➤	OBJETIVO GENERAL.....	22
➤	OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
➤	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
❖	HONGO.....	23
❖	RATONES.....	24
❖	DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS.....	24
❖	DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE MEMORIA Y DEL PERFIL DE DIFERENCIACIÓN (TH1/TH17) EN LOS LINFOCITOS T CD4 ⁺ PRESENTES EN LOS SDLN.....	25
❖	DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE MEMORIA Y LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN LOS LINFOCITOS T CD4 ⁺ PRESENTES EN LA PIEL DE LAS OREJAS DE LOS RATONES ..	26
❖	RESPUESTA DTH.....	27
❖	ELIMINACIÓN Y TINCIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD4 ⁺ PRESENTES EN LOS SDLN Y LAS OREJAS.....	27
❖	MODELO DE INFECCIÓN	28
❖	MODELO DE PROTECCIÓN.....	28
❖	CITOMETRÍA DE FLUJO.....	28

❖ ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
➤ RESULTADOS.....	30
❖ Producción diferencial de citocinas en respuesta a la inmunización de <i>S. schenckii</i> comparada con la infección natural.....	30
❖ La inoculación de los conidios de <i>S. schenckii</i> en conjunto con la TC induce una gran cantidad de linfocitos T CD4 ⁺ productores de IL-17 en comparación con la infección.....	32
❖ Los conidios inactivados del hongo <i>S. schenckii</i> en conjunto con la TC inducen una respuesta de linfocitos T CD4 ⁺ con fenotipo de memoria central y memoria efectora, en comparación con la infección.....	34
❖ La infección con el hongo <i>S. schenckii</i> induce una fuerte respuesta Th1/ Th17 en la piel.....	36
❖ Los conidios de <i>S. schenckii</i> en combinación con la CT inducen una respuesta DTH de mayor intensidad en comparación con la infección, y esta respuesta es dependiente de los linfocitos T CD4 ⁺ circulantes.....	38
❖ Los conidios inactivados de <i>S. schenckii</i> en combinación con la CT inducen una respuesta protectora mediada por linfocitos T CD4 ⁺ de memoria circulante.....	41
➤ DISCUSIÓN.....	44
➤ CONCLUSIÓN.....	49
➤ BIBLIOGRAFÍA.....	49

INDICE DE IMÁGENES, TABLAS Y FIGURAS.

- Imagen 1. Imagen al microscopio de *S. schenckii*.....10
- Tabla 1.- Fenotipo de los linfocitos T CD4⁺ naive, efector, memoria central (cm), memoria efectora (em) y memoria residente de tejido (rm).....18
- Figura 1. La inoculación intradérmica (i.d.) de los conidios inactivados de *S. schenckii* (iC) en combinación con la Toxina del Cólera (CT) induce una alta producción de IFN- γ , IL-17 e IL-2, en contraste con la infección.....31
- Figura 2. Los conidios inactivados de *S. schenckii* en conjunto con la CT inducen una fuerte respuesta Th17 comparada con la infección en piel.....33
- Figura 3. Los conidios inactivados de *S. schenckii* en conjunto con la CT inducen una respuesta de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo de memoria central (T_{CM}) y memoria efectora (T_{EM}) comparado con la infección.....35
- Figura 4. La infección con *S. schenckii* induce una fuerte respuesta de IFN- γ / IL-17 en piel.....37
- Figura 5. Los conidios inactivados de *S. schenckii* en conjunto con la CT inducen una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) mayor que la generada por la infección, la cual depende de los linfocitos T CD4⁺ de memoria circulante.....40
- Figura 6. Los conidios inactivados de *S. schenckii* en conjunto con la CT inducen una respuesta protectora mediada por linfocitos T CD4⁺ de memoria circulante.....43

ABREVIATURAS.

BHI: Brain Heart Infusion (Infusión de Cerebro Corazón)

CBA: Cytometric Bead Array (Arreglos Citométricos en Perlas)

CD: Cluster de Diferenciación

CO₂: Bióxido de Carbono

CTB: Cholera Toxin non-toxic β subunit (unidad β no tóxica de la toxina del cólera)

DCs: Dendritic cells (Células Dendríticas)

DDC: Dendritic dermal cell (Células Dendríticas Dermales)

DTH: Delayed type Hipersensitivity (Hipersensibilidad del tipo retardada)

ES: Error estandar

GFP: Green fluorescent protein (Proteína verde fluorescente)

h: horas

HLA: Human Leucocyte Antigen (Antígeno Luecocitario Humano)

i.d.: intradérmica

IFN- γ : Interferón gamma

IgE: Inmunoglobulina E

IL: Interleucina

kDa: kilodalton

LC: Langerhans Cell (Células de Langerhans)

LPS: Lipopolisacárido

mg: miligramo

MHC-II: Complejo Principal de Histocompatibilidad clase II

mL: mililitro

mm: milímetro

μ g: microgramo

μ L: microlitro

PBS: Phosphate Buffer Solution (Solución amortiguadora de fosfatos)

PE: Phycoerythrin (Ficoeritrina)

PRRs: Receptores de Reconocimiento de Patrones

rDC: Resident Dendritic cell (Célula dendrítica residente)

SC: *Sporothrix schenckii*

SD: Desviación estandar

TC: Toxina del Cólera

TGF- β : Tumoral Growing Factor beta (Factor de crecimiento tumoral beta)

Th: T helper (T cooperador)

TLR: Toll Like Receptor (Receptor tipo Toll)

TNF: Tumor Necrosis Factor (Factor de Necrosis Tumoral)

UIMIQ: Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN.

La esporotricosis es una micosis subcutánea crónica causada por las especies del complejo *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*), considerada como una infección oportunista emergente en países con climas tropicales y subtropicales. La respuesta inmune del huésped tiene un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, se desconocen las características de la respuesta inmune celular de memoria que podría proteger contra la infección. Nuestros resultados demuestran que la inmunización de ratones de manera intradérmica (i.d.) en las orejas con conidios inactivados de *S. schenckii* (iC) en conjunto con la toxina del cólera (CT) induce una respuesta inmune celular mediada por linfocitos T CD4⁺ de memoria circulantes, los cuales, producen principalmente interleucina 17 (IL-17). Estas células median una fuerte reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH), además de una protección sistémica y local contra *S. schenckii*. Por el contrario, nuestros resultados muestran que la infección induce una potente respuesta inmunitaria en la piel mediada por linfocitos T CD4⁺, los cuales poseen un fenotipo efector y producen preferentemente interferón gamma (IFN- γ), mediando una reacción de DTH transitoria. Estos resultados demuestran por una parte, el potencial de la CT como un potente adyuvante cutáneo cuando se combina con antígenos fúngicos, así como también, aportan información relevante para una mejor comprensión de las diferencias que existen entre la respuesta inmune de memoria inducida por la inmunización cutánea y la respuesta inducida por la infección; este conocimiento mejora nuestra comprensión de cómo se desarrolla una respuesta inmunitaria protectora contra una infección por *S. schenckii*.

ABSTRACT.

Sporotrichosis is a chronic subcutaneous mycosis caused by the *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*) species complex and it is considered an emerging opportunistic infection in countries with tropical and subtropical climates. The host's immune response has a main role in the development of this disease. However, it is unknown the features of the memory cellular immune response that could protect against the infection. Our results show that intradermal (i.d.) immunization in the ears of mice with inactivated *S. schenckii* conidia (iC) combined with the cholera toxin (CT) induces a cellular immune response mediated by circulating memory CD4⁺ T cells, which mainly produce interleukin 17 (IL-17). These cells mediate a strong delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction. Systemic and local protection against *S. schenckii* was mediated by circulating CD4⁺ T cells. In contrast, the infection induces a potent immune response in the skin mediated by CD4⁺ T cells, which have an effector phenotype that preferentially produce interferon gamma (IFN- γ) and mediate a transitory DTH reaction. Our findings prove the potential value of the CT as a potent skin adjuvant when combined with fungal antigens, and they also have important implications for our better understanding of the differences between the memory immune response induced by the skin immunization and those induced by the infection; this knowledge enhances our understanding of how a protective immune response against a *S. schenckii* infection is developed.

INTRODUCCIÓN.

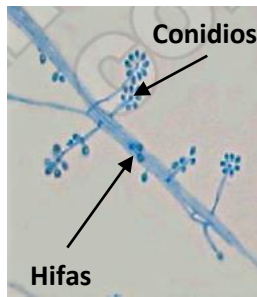
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL HONGO Y ETIOLOGÍA DE LA ESPOROTRICOSIS.

El hongo *Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*) es un hongo dimórfico y el agente causal de una micosis sub-cutánea conocida como esporotricosis. Su dimorfismo se debe a que posee dos diferentes fases o formas, la fase micelial, compuesta por conidios e hifas, y la fase de levadura.

La fase micelial del hongo ha sido aislada en el medio ambiente de diversos objetos como paja, granos de trigo, corteza de árbol, madera, espinas de arbustos, rosales y tierra, así como de insectos muertos, larvas, polvo, excrementos de animales, algas y animales marinos, los cuales constituyen el nicho ecológico del patógeno ^{1, 2, 3}. Sin embargo, también se puede obtener la forma de micelio *in vitro* si se cultiva al hongo en medios como el agar Sabouraud-Dextrosa a una temperatura de entre 25°C y 30°C produciendo conidios los cuales pueden ser oscuros o hialinos ^{4, 5, 6} (**Imagen 1A**).

Por otra parte, la forma de levadura solo se ha podido aislar de lesiones de pacientes o animales con esporotricosis y para su cultivo *in vitro* se requiere la utilización de medios ricos en nutrientes como el Infusión de Cerebro-Corazón o el agar sangre-cisteína-glucosa a una temperatura de 37°C, obteniendo levaduras que pueden llegar a medir de entre 4 a 6 micrómetros de diámetro ⁴ (**Imagen 1B**).

A)



B)



Imagen 1. A) Imagen al microscopio de *S. schenckii* en su forma micelial, el cual se sometió a una tinción previa con azul de algodón. B) Imagen al microscopio de *S. schenckii* en su forma de levadura, sometido previamente a la tinción de Ácido Peryódico de Schiff (PAS).⁵

Este microorganismo forma parte de un complejo compuesto por varias especies de *Sporothrix* dentro de las cuales podemos encontrar a *Sporothrix schenckii sensu stricto*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana*, *Sporothrix luriei* y *Sporothrix albicans*^{2, 7, 8}, dentro de las cuales se observó en un modelo murino, que las de mayor virulencia son las especies de *Sporothrix schenckii sensu stricto* y *Sporothrix brasiliensis*⁹, además recientemente han sido descritas otras tres especies denominadas como *Sporothrix stylites*, *Sporothrix humícola* y *Sporothrix lignívora*¹⁰. Sin embargo, hoy en día solo las especies de *Sporothrix schenckii sensu stricto*, *Sporothrix brasiliensis* y *Sporothrix globosa* han generado un interés médico debido a los casos reportados relacionados a estas especies¹¹.

El hongo *S. schenckii* como se mencionó al inicio, es un microorganismo capaz de generar una micosis denominada como esporotricosis. La esporotricosis es una micosis subcutánea crónica causada por las diferentes especies del complejo de *Sporothrix schenckii* (***S. schenckii***)^{2, 6, 7, 8}. La infección comienza usualmente con un traumatismo en la piel causado por material contaminado con conidios del hongo, los cuales representan su forma infectiva^{1, 3, 4, 5, 12}, aunque también se han reportado casos de transmisión zoonótica a través de arañazos y mordidas de animales infectados, dentro de los cuales los más comúnmente reportados son armadillos y

gatos, sin embargo, también existen reportes en los que se han visto involucrados caballos, perros, serpientes, ratas y pájaros ¹².

Aunque la mayoría de los casos reportados son a nivel de piel, también se ha observado que la inhalación de los conidios puede desarrollar una infección pulmonar pero que difícilmente se disemina a otros órganos en individuos inmunocompetentes ^{13, 14}.

Las personas de cualquier edad o sexo pueden infectarse con este microorganismo, aunque la enfermedad es más común en hombres adultos principalmente por su exposición al hongo en las actividades laborales, por lo que algunos estudios la han considerado como una enfermedad ocupacional. La esporotricosis ha sido reportada en diversos trabajadores que van desde granjeros, productores de hortalizas, jardineros, floristas y trabajadores forestales, hasta manufactureros de papel, mineros y veterinarios ^{2, 3, 15, 16}.

Debido a esto la esporotricosis ha sido caracterizada como una micosis distribuida mundialmente pero con una mayor incidencia en los países que se encuentran entre las regiones tropicales y sub-tropicales que poseen climas templados y húmedos con temperaturas promedio de entre 20°C y 25°C, de entre los cuales el área de Latino América cuenta con una gran cantidad de casos reportados ^{1, 2, 5}.

Algunos reportes sugieren que el tamaño del inóculo inicial, la virulencia del hongo, la profundidad de la inoculación y la respuesta inmune del hospedero son factores fundamentales que participan en el desarrollo de la esporotricosis ^{17, 18, 19, 20}. Sin embargo, se ha observado que solo la respuesta inmune del hospedero tiene una relación directa con el desarrollo de diferentes manifestaciones clínicas de la infección, ya que los individuos inmunocompetentes usualmente desarrollan lesiones cutáneas producto de la infección, sin embargo, pacientes inmunocomprometidos desarrollan formas sistémicas y diseminadas ^{16, 17, 21, 22, 23, 24}.

^{25, 26}. Dentro de las diferentes formas de esporotricosis podemos encontrar: la forma linfocutánea, la cutánea fija, la cutánea diseminada y las extracutáneas ^{5, 21}.

Por otra parte, en la forma cutánea fija, el hongo permanece confinado en el sitio de inoculación, por lo que algunos reportes indican que esto refleja una buena respuesta inmune del hospedero y se presenta comúnmente en áreas endémicas para el hongo ¹⁷.

Sin embargo, las formas cutáneas diseminadas y las extracutáneas, como se mencionó, se han observado principalmente en individuos inmunocomprometidos ^{22, 23, 24, 25} de estas, las más comunes son la óseo-articular y la pulmonar, pero existen reportes de diseminación hematógena con implicaciones en múltiples órganos como ojos y sistema nervioso central ^{16, 25, 26, 27, 28}.

Los datos anteriores muestran que la infección con el hongo *S. schenckii* es una afección en la cual la respuesta inmune del hospedero es de gran importancia para el control de la infección, sin embargo, hoy en día existen pocos estudios acerca de los mecanismos de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa que participan en la eliminación del hongo *S. schenckii*.

RESPUESTA IMUNE EN CONTRA DEL HONGO.

La esporotricosis se manifiesta principalmente como una infección granulomatosa crónica a nivel de piel en individuos inmunocompetentes ²⁹, en la cual la formación del granuloma es un evento crítico en la respuesta inmune del hospedero en contra de *S. schenckii* ³⁰. Este granuloma, es considerado como un componente esencial en la respuesta normal del hospedero y se piensa que es el resultado de una respuesta inflamatoria dependiente de una respuesta inmune celular mediada por diferentes poblaciones tanto de la respuesta inmune innata como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, así como por poblaciones de la respuesta inmune

adaptativa como los linfocitos T, las cuales participan en la defensa del hospedero en contra de *S. schenckii* ^{17, 31, 32, 33, 34, 35}.

Diferentes estudios han demostrado que las respuestas celulares mediadas por diferentes poblaciones de la respuesta inmune innata y adaptativa son importantes para el control de la infección ^{30, 31, 33, 34, 35}.

Sin embargo, gran parte de los estudios realizados para entender la respuesta inmune que se desarrolla en contra de *S. schenckii* se han enfocado en evaluar la participación de los macrófagos en la respuesta inmune en contra del hongo, observando que el hongo puede ser reconocido por los receptores tipo Toll TLR-2 y TLR-4 ^{17, 34, 36, 37, 38, 39}. Además, se ha observado que otros receptores como los receptores tipo NOD y los receptores tipo lectina también participan en el reconocimiento del hongo. Sin embargo, las evidencias obtenidas muestran que existe un reconocimiento diferencial entre la forma de levadura y la forma de conidio por parte de estos receptores ^{40, 41}.

Por otra parte, existen algunos otros estudios que han evaluado la participación de otros tipos celulares en la respuesta inmune en contra de *S. schenckii*, en los cuales se ha descrito el papel de las células dendríticas ^{35, 42, 43, 44}.

Algunos desarrollados in vitro han demostrado que las células dendríticas (**DCs por sus siglas en inglés**) son capaces de reconocer diferentes antígenos de la pared celular de *S. schenckii* los cuales generan una activación diferencial de las DCs, induciendo una respuesta de linfocitos T cooperadores (**Th**) con un perfil Th1/ Th17 ^{42, 43, 44}. El desarrollo de este tipo de respuesta es importante para el control y la eliminación del hongo ^{19, 33, 45, 46}.

Uno de estos estudios, demuestra que la respuesta inmune en contra de *S. schenckii* puede ser modulada por una activación diferencial de las células dendríticas mediante su co-cultivo con las diferentes formas del hongo. En este estudio se observó, que las células dendríticas derivadas de monocitos humanos,

incubadas con levaduras o conidios obtenidos de aislados cutáneos de pacientes con la infección, se activan aumentando su expresión de moléculas HLA-DR y moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86. Además de producir citocinas pro-inflamatorias como IL-12, TNF- α e IL-6, las cuales favorecen la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos T, sugiriendo la generación de una respuesta tipo Th1. En contraste, las células dendríticas, estimuladas con levaduras o conidios obtenidos de aislados viscerales, se activan en menor grado e inducen la producción de altos niveles de IL-4 por parte de los linfocitos T, sugiriendo la generación de una respuesta tipo Th2, lo que podría ser un mecanismo de evasión de la respuesta inmune al inducir una débil respuesta Th1 ⁴³.

También, se observó, en otro estudio, que al co-cultivar *in vitro* a células dendríticas derivadas de medula ósea de ratón con levaduras del hongo o con un exoantígeno (Exo-Ag) extraído del mismo, las células dendríticas se activaban aumentando la expresión de moléculas como MHC-II, CD40, CD80 y CD86, así como la producción de citocinas como IL-12, IL-6, TNF- α e IL-1 β ^{42, 44}. Además estas células dendríticas eran capaces de endocitar a las levaduras del hongo ⁴⁴ y activar a los linfocitos T obtenidos de ratones infectados promoviendo su producción de IFN- γ e IL-17 ⁴².

Sin embargo, en los pocos estudios mencionados, en los cuales se ha evaluado la participación de las células dendríticas en el desarrollo de la respuesta inmune en contra del hongo *S. schenckii*, se han utilizado células dendríticas derivadas tanto de monocitos humanos como de medula ósea de ratón, las cuales difieren funcionalmente de las células dendríticas presentes en la piel, mismas que serían las primeras en tener contacto con el hongo durante el proceso de desarrollo de la infección. Por lo tanto, tomando en cuenta que la principal vía de entrada del microorganismo al hospedero es a través de traumatismos en la piel, sería de vital importancia estudiar la activación de las células dendríticas de la piel tras el encuentro con los conidios del hongo, con el objetivo de comprender de mejor manera el desarrollo de una respuesta inmune en contra de este hongo.

Sin embargo, a pesar de las limitaciones mencionadas en los estudios previos, estos sugieren que la activación de las células dendríticas por parte de los conidios y las levaduras del hongo es de gran importancia para la generación de una respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T CD4⁺, lo que concuerda con el hecho de que individuos con deficiencias en la respuesta inmune celular son más susceptibles a sufrir una infección sistémica ^{47, 48, 49, 50}, apoyando la idea de que la respuesta inmune mediada por linfocitos T es importante para el control de la diseminación de la infección ¹⁷.

Además, los primeros estudios que evaluaron la participación de la respuesta inmune en el control de la infección, mostraron que pacientes con defectos en la respuesta inmune celular son más susceptibles a la infección sistémica ⁴⁷. También se ha observado que la esporotricosis es más severa en ratones atímicos que en ratones inmunocompetentes y que estos ratones pueden ser protegidos contra la infección si se les transfieren células de la respuesta inmune obtenidas del bazo de un ratón normal ^{48, 49, 50}.

Otras investigaciones han demostrado que los linfocitos T CD4⁺ obtenidos de ratones infectados con el hongo, son capaces de producir citocinas como IFN- γ , citocina que potencia la actividad bactericida de los macrófagos en contra de los conidios fagocitados y favorece el establecimiento de una respuesta inmune tipo Th1 ^{19, 33, 45}. Además, se ha observado que algunas poblaciones de linfocitos, también son capaces de producir IL-17 ⁴², citocina que participa de manera importante en la eliminación del hongo en etapas tempranas de la infección. Se observó que durante las etapas tempranas de la infección con *S. schenckii* (10 días post-infección), tanto la cantidad de linfocitos T CD4⁺ ROR γ T⁺ y de linfocitos T CD4⁺ ROR γ T⁺ Tbet⁺ aumentaba de manera significativa en el bazo de los ratones infectados y que al re-estimular a las células obtenidas del bazo con las levaduras del hongo *S. schenckii* inactivadas por calor, la producción de las citocinas IFN- γ e IL-17 aumentaba de manera importante. Además en este mismo estudio se observó que al inocular un anticuerpo neutralizante anti-IL-23 como método para inhibir la

respuesta Th17, la cantidad de IL-17 producida por los esplenocitos de los ratones infectados disminuía cerca del 50%, lo que correlacionaba con un aumento en la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en el bazo de los ratones ⁴⁶.

El reporte de algunos casos clínicos en los cuales los pacientes con esporotricosis desarrollan una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (**DTH** por sus siglas en inglés) tras la inoculación intradérmica (**i.d.**) con esporotricina, la cual es un extracto glicoprotéico de *S. schenckii*, indican que la infección con *S. schenckii* podría inducir una respuesta inmune celular de memoria ^{5, 51, 52}.

Sin embargo, a diferencia de las respuestas Th1/Th17 que se han reportado como importantes para el control y la eliminación de la infección con *S. schenckii*, la respuesta tipo Th2 caracterizada principalmente por la producción de IL-4 se ha reportado en algunos estudios como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune por parte del hongo ⁴³.

Aunque se ha observado que la respuesta de linfocitos T CD4⁺ es de vital importancia para el control de la diseminación y erradicación de la infección, aún se desconoce cuáles de los perfiles de diferenciación de estos linfocitos son los más relevantes para la eliminación de la misma. Aunque existen evidencias del desarrollo de una respuesta de memoria tras la infección con el hongo *S. schenckii*, en la actualidad no existe ningún estudio en el que se haya evaluado el desarrollo de las diferentes poblaciones de linfocitos T de memoria durante la infección.

MEMORIA INMUNOLÓGICA MEDIADA POR LINFOCITOS T.

Definiciones clásicas de la memoria inmunológica mencionan características básicas de esta respuesta como son: la capacidad de recordar por largos periodos de tiempo a antígenos a los que ya han sido expuestos anteriormente, así como el

desarrollo de una respuesta mucho más rápida y robusta frente a una reexposición a los mismos antígenos, debido a la presencia en el organismo de una mayor cantidad de células antígeno específicas que además han adquirido diferentes propiedades funcionales. Sin embargo, definiciones más especializadas toman en cuenta diferentes características que debieran poseer los linfocitos T de memoria, tales como su capacidad de auto renovarse y permanecer en el organismo por largos periodos de tiempo sin la necesidad de una re-exposición repetida a su antígeno ⁵³.

Diversos estudios que se han realizado para tratar de comprender la respuesta de memoria de los linfocitos T han mostrado que existe una gran diversidad de linfocitos T de memoria conocidos y cada una de estas sub-poblaciones exhiben heterogeneidad fenotípica, funcional y anatómica ⁵³. Sin embargo, el entendimiento de cómo se generan estas diferentes sub-poblaciones, así como su origen, las relaciones que pudieran existir entre ellas y su participación en la inducción de una respuesta inmune protectora, aún está en discusión ^{54, 55}.

Algunas investigaciones han demostrado que las células con el potencial suficiente para convertirse en células de memoria se originan durante la fase aguda de la infección ^{56, 57}, mientras que una exposición crónica y repetida al microorganismo afecta el desarrollo de las propiedades características de las sub-poblaciones de memoria ⁵⁸. Sin embargo, existe una gran heterogeneidad entre los diferentes sub-tipos de linfocitos T de memoria, los cuales expresan diferentes moléculas de membrana, así como también poseen diferencias tanto funcionales como en su ubicación y en sus capacidades migratorias ^{55, 59, 60}, (**Tabla 1**). Tomando en cuenta la expresión de sus diversas moléculas de membrana, así como sus diferencias funcionales, se han clasificado a las diferentes sub-poblaciones de linfocitos T de memoria en 4 diferentes sub-poblaciones: linfocitos T de memoria central (**Tcm**), linfocitos T de memoria efectora (**Tem**), linfocitos T de memoria residentes de tejido (**Trm**) y una sub-población recientemente añadida a la clasificación denominada como linfocitos T “stem” de memoria, los cuales se ha descrito tienen la capacidad

de dar origen tanto a células terminalmente diferenciadas, así como a células capaces de autorenovarse tras una re-exposición con su antígeno ⁶¹.

Tabla 1.- Fenotipo de los linfocitos T CD4⁺ naive, efector, memoria central (cm), memoria efectora (em) y memoria residente de tejido (rm).

Property	Naïve	Effector	Tcm	Tem	Trm
CD44	Low	High	Intermediate	High	High
CD62L	High	Low	High	Low	Low
CCR7	High	Low	High	Low	Low
CD45 Isoform (Humans Only)	CD45RA	CD45RO	CD45RO	CD45RO/ CD45RA (Temra)	CD45RO
CD69	Low	High	Low	Low	High
CD103	–	–	–	–	– ^a
Migratory properties	Lymphoid tissues, circulation	Peripheral tissues	Lymphoid tissues	Peripheral tissues	Resident in peripheral tissue

^a Present in CD8 Trm

Fuente: “Memory CD4 T cells in influenza” ⁵⁵.

Esto se debe a que algunos resultados han demostrado que los linfocitos T de memoria residentes de tejido (**T_{RM}**), una sub-población de los linfocitos T de memoria efectora (**T_{EM}**) que residen en el sitio de entrada del antígeno y que además tienen una función efectora inmediata en el sitio, son esenciales para el desarrollo de una respuesta DTH y que pueden desarrollar esta respuesta sin la participación de linfocitos T de memoria central (**T_{CM}**) ⁶².

Tanto los linfocitos **T_{CM}** como los linfocitos **T_{EM}** son consideradas como poblaciones que recirculan en el organismo pero que poseen características funcionales específicas de cada uno y diferencias importantes en cuanto a su capacidad migratoria, ya que mientras que los linfocitos **T_{CM}** tienen la capacidad de producir altas cantidades de interleucina 2 (**IL-2**), así como de recircular entre los ganglios linfáticos a través de los vasos linfáticos tras su activación ⁶³, los linfocitos **T_{EM}** han sido considerados como poblaciones de memoria que proveen una línea de defensa que recircula entre los tejidos en los cuales puede ocurrir una re-infección ⁵³. Sin

embargo, se ha descrito que los linfocitos T_{RM} , una sub-población de los linfocitos T_{EM} , pierden esta capacidad de recircular entre los tejidos y residen en el sitio de entrada del antígeno llevando a cabo una función efectora inmediata ^{64, 65, 66, 67, 68}. Además, se ha observado que son esenciales para el desarrollo de una respuesta DTH y que pueden desarrollar esta respuesta sin la participación de linfocitos T_{CM} ⁶². Sin embargo, existen estudios en los que se ha observado que tanto los linfocitos T_{RM} como los T_{CM} participan en el desarrollo de esta respuesta y además son fundamentales para el desarrollo de protección en contra de infecciones crónicas ⁶⁹. Se ha observado que los linfocitos T_{RM} son capaces de proteger en contra de los virus de influenza, vaccinia, el virus de la coriomeningitis linfocítica y el virus herpes ^{55, 64, 65, 66, 70, 71}. En un modelo de infección con *Chlamydia trachomatis* se observó que los linfocitos T_{RM} requieren de la participación de los linfocitos T_{CM} para el control de la infección ^{62, 69}. Esto podría explicarse por los resultados obtenidos en otros estudios en los que se ha observado que los linfocitos T_{RM} aumentan la velocidad con la que se reconoce y se responde a nuevas infecciones, ya que su activación las lleva a producir citocinas que inducen la expresión local de integrinas por parte del epitelio vascular que promueven el tráfico leucocitario hacia el tejido inflamado lo que incluye el reclutamiento de diferentes sub-poblaciones de linfocitos T de memoria re-circulantes ^{66, 72}.

La participación de las diferentes sub-poblaciones de linfocitos T de memoria en las infecciones por hongos ha sido poco estudiada con tan solo un reporte en el que se utilizó como modelo de infección a *Candida albicans* ⁷³. No existe evidencia experimental que demuestre el desarrollo y la participación de las diferentes sub-poblaciones de linfocitos T de memoria durante la infección con *S. schenckii* o alguna otra infección crónica con hongos. Las evidencias experimentales demuestran que el rol de las distintas subpoblaciones de linfocitos T de memoria en el control de una infección, depende de manera importante del modelo utilizado para su estudio, lo que genera controversia en cuanto a su importancia y función.

Esta gran diversidad obtenida en los diferentes modelos de estudio utilizados puede deberse a que el mecanismo preciso que controla la diferenciación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T de memoria aun es desconocido. Sin embargo, se ha observado que diferentes factores como el tipo de infección, la abundancia de antígeno, el microambiente de citocinas y el sitio de infección pueden afectar el microambiente en el que se encuentre el linfocito T durante su activación y por lo tanto modificar su diferenciación ⁷⁴.

Esto podría explicar por qué el desarrollo de estas diferentes subpoblaciones de linfocitos T de memoria depende en gran medida del patógeno que se utilice, ya que la diferenciación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T de memoria se puede ver afectada por el microambiente, el patógeno, la ruta y el sitio de infección. Por lo tanto, muchos de los factores que determinan la diferenciación de los linfocitos T hacia una cierta sub-población de memoria o hacia un fenotipo efector en particular, podrían estar presentes durante los primeros contactos con el antígeno y con el microambiente que en ese momento predomine. Esto le confiere un papel muy relevante a las células presentadoras de antígeno, tales como las células dendríticas, en la diferenciación de los linfocitos T hacia las diferentes subpoblaciones de memoria o hacia los diferentes perfiles efectores productores de cierto grupo de citocinas.

Para estudiar el desarrollo de las diferentes sub-poblaciones de memoria desarrolladas durante la infección con un cierto patógeno como el hongo *S. schenckii*, es necesario considerar la ruta de entrada del patógeno al organismo, así como el sitio donde se desarrolla la infección y los tipos celulares con los que tendrá sus primeros encuentros. Estos determinan el microambiente en el que se desarrollarán las diferentes sub-poblaciones de memoria y que por lo tanto determinaran de manera importante su diferenciación.

TOXINA DEL COLERA Y SU UTILIZACIÓN COMO ADYUVANTE EN PIEL.

Existen distintos adyuvantes que pueden inducir cambios fenotípicos y funcionales en las DCs. Dentro de éstos, se ha descrito a la TC, la cual posee un potente efecto adyuvante en la inducción de distintos tipos de respuesta inmune *in vivo* ^{75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87}.

Al inocularse la TC completa en conjunto con antígenos modelo en mucosas, se ha observado la inducción de una respuesta tipo Th2 ⁸⁰. Sin embargo, también se ha observado la inducción de respuestas mixtas tipo Th1/ Th2 ^{75, 78, 83} y recientemente la inducción de una respuesta tipo Th1/ Th17, después de una inoculación en la piel en conjunto con la lisozima de huevo de gallina (HEL)⁷⁷.

La función adyuvante de la TC se debe a su capacidad de modificar tanto el perfil de citocinas expresadas, como el fenotipo de las células presentadoras de antígeno en las cuales aumenta la expresión de las moléculas clase I y II codificadas en el Complejo Principal de Histocompatibilidad (**MHC**, por sus siglas en inglés), moléculas co-estimuladoras y receptores de quimiocinas ^{77, 83, 88, 89, 90}. Esto implica un cambio en su capacidad de inducción de una respuesta inmune mediada por linfocitos T.

Aunque el mecanismo por el cual actúa la TC aún no está totalmente elucidado, ciertas investigaciones indican que esta toxina interactúa a través de la unión de su sub-unidad β (CTB) con el gangliósido GM1, presente en la membrana celular de la mayoría de las células del cuerpo, incluyendo a los leucocitos y las DCs ^{91, 92}. Este mecanismo crítico y esencial podría facilitar la llegada de las diferentes moléculas asociadas a estos adyuvantes a las DCs, para su posterior transporte a los nódulos linfáticos cercanos al sitio de inoculación⁹².

Diferentes estudios han demostrado que se pueden generar diferentes respuestas después de la inoculación de distintos antígenos en combinación con la TC, y que

esta variedad en los distintos tipos de respuesta generadas puede estar influenciada por diversos factores como la ruta de inoculación, la dosis de antígeno y del adyuvante, así como del tipo de DCs que se activa y captura al antígeno para su posterior presentación al linfocito T ^{75, 82, 86}.

Aunque la mayoría de los estudios en los que se ha evaluado el papel adyuvante de la toxina del cólera se han desarrollado en mucosas, trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la inmunización con toxina del cólera en conjunto con lisozima de huevo de gallina (**HEL** por sus siglas en inglés) induce una respuesta inmune celular de memoria mediada por linfocitos T CD4 con un fenotipo Th1/Th17 ⁷⁷. Este resultado demuestra que la CT puede inducir una eficiente respuesta de linfocitos T CD4 en contra de antígenos modelo con los cuales se co-administra. Sin embargo, se desconoce si una respuesta inmune similar puede ser inducida por la inoculación i.d de la CT en conjunto con antígenos microbianos, tales como los conidios del hongo *S. schenckii*.

HIPOTESIS.

La inmunización en piel con los conidios inactivados del hongo *S. schenckii* en conjunto con la TC generará una respuesta inmune celular de memoria diferente a la inducida por la infección y que además protegerá al ratón ante una infección posterior con *S. schenckii*.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la respuesta inmune celular inducida por la inmunización en piel con los conidios inactivos de *S. schenckii* en conjunto con la CT y compararla con la respuesta inmune generada por la infección activa.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Analizar las diferentes sub-poblaciones de linfocitos T de memoria inducidas tanto por la inmunización con los conidios inactivados más la CT así como por la infección.
- Determinar los perfiles de producción de citocinas generados tras la inmunización en piel con los conidios inactivados más la toxina del cólera y compararlos con los producidos por la infección.
- Evaluar si la respuesta inmune celular inducida por la inmunización con los conidios inactivados más la toxina de cólera es capaz de proteger al ratón ante una infección posterior con *S. schenckii*.

MATERIALES Y METODOS.

Hongo.

En todos los experimentos, se usó la cepa EH-143 del hongo *S. schenckii*, la cual se obtuvo de un paciente con una esporotricosis cutáneo-linfática. La identificación de esta cepa se basó en sus características fenotípicas y genotípicas⁹³ y se verificó mediante el análisis de secuencias de genes de la calmodulina⁹⁴. Forma parte de la Colección Cultural de Patógenos Fúngicos del Laboratorio de Micología Básica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**), y está registrada en la World Federal Culture Collection (WFCC por sus siglas en inglés) como BMFM-UNAM 834. De acuerdo a lo reportado por Uenotsuchi et al., (2006), el hongo se cultivó en agar Sabouraud durante 7 días a 28°C para promover el crecimiento de la forma micelial, que consiste en hifas y conidios. Los cultivos fúngicos se re-suspendieron en PBS y se inactivaron por calor mediante una incubación de 2 horas en un baño de agua a 60°C. El hongo inactivado se filtró a través del papel Whatman No. 1 para eliminar todas las hifas y pseudohifas recuperando únicamente los conidios puros.

Los conidios inactivados presentes en el filtrado final se sembraron en agar Sabouraud a 28°C para confirmar su inactivación. Posteriormente, los conidios inactivados se contaron en una cámara de Neubauer y se confirmó la presencia de únicamente conidios en el filtrado final. Finalmente, los conidios se llevaron a una concentración final de 5×10^4 conidios / μL y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Ratones.

Los ratones de la cepa C57BL/6 fueron proporcionados por el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. Todos los experimentos se realizaron en ratones de 8 a 12 semanas de edad de acuerdo con el Comité de Ética Institucional. (Comité local de investigación en salud) Protocolo número 3601. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la Facultad de Medicina de la UNAM, y siguieron la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los animales estaban libres de parásitos o patógenos, y las hembras eran nulíparas y no estaban embarazadas. Los animales fueron alimentados con el alimento para roedores LabDiet 5010 autoclaveable (LabDiet, EE. UU.) Y agua *ad libitum*.

Determinación de la producción de citocinas.

Se inyectaron a ratones de la cepa C57BL/6 de manera intradérmica (**i.d**) en las orejas con buffer salino de fosfatos (**PBS** por sus siglas en inglés), conidios inactivados por calor (**iC**) (5×10^5 conidios), TC (1 μg), iC en combinación con TC o conidios vivos (**LC**) (5×10^5 LC). Después de 14 días, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron 3×10^5 células de los ganglios linfáticos drenantes de las orejas (**sdLN**). Estas células se re-suspendieron en 100 μl de medio suplementado RPMI 1640 (Biowest, Francia) y se re-estimularon con 10 μl de PBS o 5×10^5 iC. Después de 24 horas (**h**) del re-estímulo, se evaluó la presencia de citocinas en los sobrenadantes de los cultivos libres de células usando el Cytometric Bead Array Kit

(Th1/Th2/Th17 para ratón) (BD Biosciences, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para su análisis mediante citometría de flujo.

Determinación del fenotipo de memoria y del perfil de diferenciación (Th1/Th17) en los linfocitos T CD4⁺ presentes en los sdLN.

Se inyectaron a ratones C57BL/6 de manera i.d. en las orejas con PBS, iC (5×10^5 iC), TC (1 μ g), iC en combinación con TC o LC (5×10^5 LC). Después de 14 días, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron 3×10^5 células de los sdLN y se cultivaron conjuntamente con 1×10^5 células CD11c⁺ (células dendríticas) que se aislaron de los sdLN de ratones C57BL/6 no inmunizados, mediante el uso de microperlas magnéticas MACS anti CD11c (Miltenyi Biotec , ESTADOS UNIDOS). Después de su obtención, las DC se co-cultivaron durante 24 h con 5×10^5 iC durante 24 h para posteriormente ser co-cultivadas durante 7 días con las células obtenidas de los sdLN obtenidos de los ratones inmunizados. Durante las últimas 4 h de co-cultivo, se agregó un cóctel de estimulación celular y un cóctel de inhibición del transporte de proteínas (eBioscience-Affymetrix, Santa Clara, CA, EE. UU.) para posteriormente evaluar la producción de citocinas mediante tinción intracelular. Finalmente, las células se tiñeron para los marcadores de superficie CD45, CD4 y la cadena beta del receptor de células T (**TCR- β**) y se trataron con la solución BD Cytotfix/Cytoperm (Kit de fijación / permeabilización) (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA.) para proceder a la tinción intracelular de las citocinas IFN- γ e IL-17 utilizando los anticuerpos anti-IFN- γ (Clon: XMG1.2, BioLegend, San Diego, CA, EE. UU.) y anti-IL-17 (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Por otra parte, se cultivaron en placa 3×10^5 células obtenidas de los sdLN en conjunto con 5×10^5 iC durante 7 días. Después del tiempo de cultivo las células se tiñeron para los marcadores de superficie CD45, CD4, TCR- β , CD44, CD62L, CCR7 y CD69 que nos permitieron determinar las diferentes poblaciones de linfocitos T de memoria y poder ser analizados por citometría de flujo.

La totalidad de las células CD45 + presentes en los sdLN se calculó utilizando perlas de conteo absoluto (CountBright, Life technologies, Eugene, OR, EE. UU.) en un citómetro de flujo FACS Canto (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.).

Determinación del fenotipo de memoria y la producción de citocinas en los linfocitos T CD4⁺ presentes en la piel de las orejas de los ratones.

Se inyectaron a ratones C57BL/6 de manera i.d. en las orejas con iC (5×10^5 iC), TC (1 μ g), iC más TC o LC (5×10^5 LC). Después de 14 o 31 días, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron las orejas. Las orejas se trataron con las enzimas Liberase TL (Roche, Mannheim, Alemania) y DNAasa I (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) por 45 minutos, para posteriormente ser cortadas en trozos pequeños y sometidas a una agitación constante de 200 rpm para la obtención de las células presentes en estos tejidos. Las células obtenidas de las orejas se re-suspendieron en 100 μ L de medio RPMI suplementado y se co-cultivaron en conjunto con 5×10^5 iC durante la noche; Durante las últimas 4 h de co-cultivo, se agregó un cóctel de estimulación celular y un cóctel de inhibición del transporte de proteínas (eBioscience-Affymetrix, Santa Clara, CA, EE. UU.) para evaluar la producción de citocinas mediante tinción intracelular.

Las células se tiñeron para marcadores de superficie (CD45, CD4, TCR- β) y se trataron con el Kit de BD Cytofix/Cytoperm (Kit de fijación / permeabilización) (BD Biosciences, San Diego, CA, EE. UU.) para tinción intracelular, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las citocinas intracelulares se detectaron usando anticuerpos anti-IFN- γ , anti-IL-17 y anti-TNF- α .

Además, todas las células obtenidas de las orejas de los ratones inmunizados se co-cultivaron en conjunto con 5×10^5 iC durante 7 días, para posteriormente ser teñidas para los marcadores de superficie CD45, CD4, TCR- β , CD44, CD62L, CCR7 y CD69 (que nos permiten evaluar las diferentes sub-poblaciones de linfocitos T de memoria) y se analizaron por citometría de flujo.

El número total de células CD45⁺ presentes en las orejas se calculó utilizando perlas de conteo absoluto (CountBright, Life technologies, Eugene, OR, EUA) en el citómetro FACS Canto Flow.

Respuesta DTH.

Se inyectaron a ratones C57BL/6 de manera i.d. en las orejas con PBS (10 µL), iC (5x10⁵ iC), CT (1 µg), iC con CT (1 µg) o LC (5x10⁵ LC). Después de 31 días, se midió el grosor de la oreja y se retó a los ratones mediante la inoculación i.d. en las orejas con 5x10⁵ iC. El grosor de la oreja se midió a las 24 y 48 h después del reto.

Eliminación y tinción de los linfocitos T CD4⁺ presentes en los sdLN y las orejas.

Se inyectaron a ratones C57BL/6 de manera i.d. en las orejas con iC (5x10⁵ iC) en conjunto con la TC (1 µg). Después de 31 días, se midió el grosor de las orejas y se inoculó a los ratones el anticuerpo monoclonal anti-CD4 (clon GK 1.5) (250 µg) o anticuerpo irrelevante (Rat IgG1 □ Iso Control, Clon eBRG1, eBioscience) (250 µg) por vía intraperitoneal (i.p.). Después de 24 h de inoculación con el anticuerpo anti-CD4 o el anticuerpo irrelevante, se midió el grosor de las orejas y se retó a los ratones mediante la inyección i.d. en las orejas con iC (5 x 10⁵ iC). El grosor de las orejas se midió a las 24 y 48 h posteriores al reto. Se obtuvieron las células presentes en los sdLN y en las orejas, para posteriormente ser teñidas para los marcadores CD45, CD4, TCR-β, CD44, CD62L, CCR7 y CD69, y finalmente se analizaron por citometría de flujo.

El número total de células CD45⁺, presentes en el sdLN y en las orejas, se calculó utilizando cuentas de conteo absoluto (CountBright, Life technologies, Eugene, OR, EE. UU.) En el citómetro de flujo FACS Canto.

Modelo de Infección.

Se inoculó de manera i.d. en las orejas a ratones C57BL/6 con dos cantidades diferentes de LC (5×10^5 y 10×10^6 LC). Después de 17, 24 y 31 días, se calculó el área de las lesiones locales en las orejas utilizando el software ImageJ (ImageJ Software, National Institutes of Health) y se evaluó la aparición de granulomas en la cola de los ratones desde el primer día de la inoculación y hasta los 60 días posteriores a la inoculación.

Modelo de Protección.

Se inyectó a ratones C57BL/6 de manera i.d. en las orejas con PBS (10 μ L), iC (5×10^5 iC), la TC (1 μ g) o iC más la TC (iC + TC). Después de 31 días de la inmunización, los ratones fueron retados mediante la inoculación i.d. en las orejas con 10×10^6 LC. Después de 17 y 24 días de la inoculación de los LC, se calculó el área de las lesiones locales presentes en las orejas de los ratones con ayuda del software Image J y se evaluó además, la aparición de granulomas en la cola desde el primer día de la inoculación y hasta el día 75. Además, algunos ratones que fueron inmunizados con los iC+TC fueron inoculados de manera i.p. con el anticuerpo monoclonal anti-CD4 (250 μ g) o un anticuerpo irrelevante (250 μ g) a las 24 h previas a la inmunización o 24 h antes del desafío y antes de calcular el área de la lesión en las orejas.

Citometría de Flujo.

El número total de células CD45⁺, presentes en los sdLN y en las orejas, se calculó utilizando las perlas de conteo absoluto (CountBright, Life technologies, Eugene, OR, EE. UU.) en el citómetro de flujo FACS Canto.

Las células que se tiñeron para marcadores extracelulares o citocinas intracelulares se analizaron usando un citómetro de flujo FACS Canto (BD Biosciences, San José,

CA, EE. UU.). Los resultados se analizaron utilizando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EE. UU.).

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, EE. UU.). Los análisis de ANOVA de una vía o de dos vías y los post-pruebas paramétricas de Bonferroni se utilizaron para calcular la significancia estadística entre los grupos. Todos los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS.

Producción diferencial de citocinas en respuesta a la inmunización de *S. schenckii* comparada con la infección natural.

En estudios previos se ha demostrado que la inoculación i.d. en la oreja con HEL en combinación con la TC induce una respuesta del tipo Th1/Th17 ⁷⁷; por lo tanto, para evaluar si una respuesta inmune similar podría ser inducida por la inoculación i.d. en la oreja de componentes del hongo *S. schenckii* en combinación con la TC, los ratones se inocularon en las orejas con conidios del hongo *S. schenckii* inactivados por calor (**iC**), en conjunto con la TC, o con conidios vivos del hongo, capaces de causar la infección (**LC**). Inicialmente, se evaluó la producción de citocinas en los ganglios linfáticos que drenan la piel de las orejas de los ratones (**sdLN**). El total de las células presentes en los sdLN de los diferentes grupos de ratones se cultivaron en conjunto con células dendríticas (**DC**) cargadas con iC. Las células de los sdLN de los ratones inoculados con iC+TC o con LC, expresaron niveles similares de IFN- γ e IL-17 (**Figuras 1A-1B**). Sin embargo, las células de los sdLN de los ratones inoculados con iC+TC expresaron niveles significativamente más altos de IL-2, en comparación con las células de los sdLN de los ratones inoculados con los LC (**Figura 1C**). En contraste, las células de los sdLN de los ratones infectados con los LC expresaron significativamente más TNF- α en comparación con las células de los sdLN de los ratones inoculados con iC+TC (**Figura 1D**). La expresión de estas citocinas no se observó en las células de los sdLN de los ratones inoculados con PBS, iC sin la TC o con la TC sola. La expresión de la interleucina 4 (**IL-4**) no se observó en ninguno de los grupos evaluados (**Figura 1E**) y no se observaron diferencias significativas en la expresión de la interleucina 10 (**IL-10**) (**Figura 1F**). En conjunto, los resultados sugieren que tanto la inmunización (iC+CT) como la infección (LC) inducen una respuesta similar de IFN- γ /IL-17; sin embargo, la mayor expresión de TNF- α inducida por la infección, refleja una diferencia importante entre las respuestas generadas tanto por la infección como por la inmunización, idea que además, se refuerza al observar una mayor

expresión de IL-2 por parte de las células de los ratones inoculados con iC+CT sugiriendo que la inmunización podría provocar una respuesta inmune celular de memoria diferente en comparación con la infección. También, de manera importante, los resultados indican que la TC puede inducir una respuesta de IFN- γ /IL-17 después de su administración en conjunto con componentes del hongo *S. schenckii*.

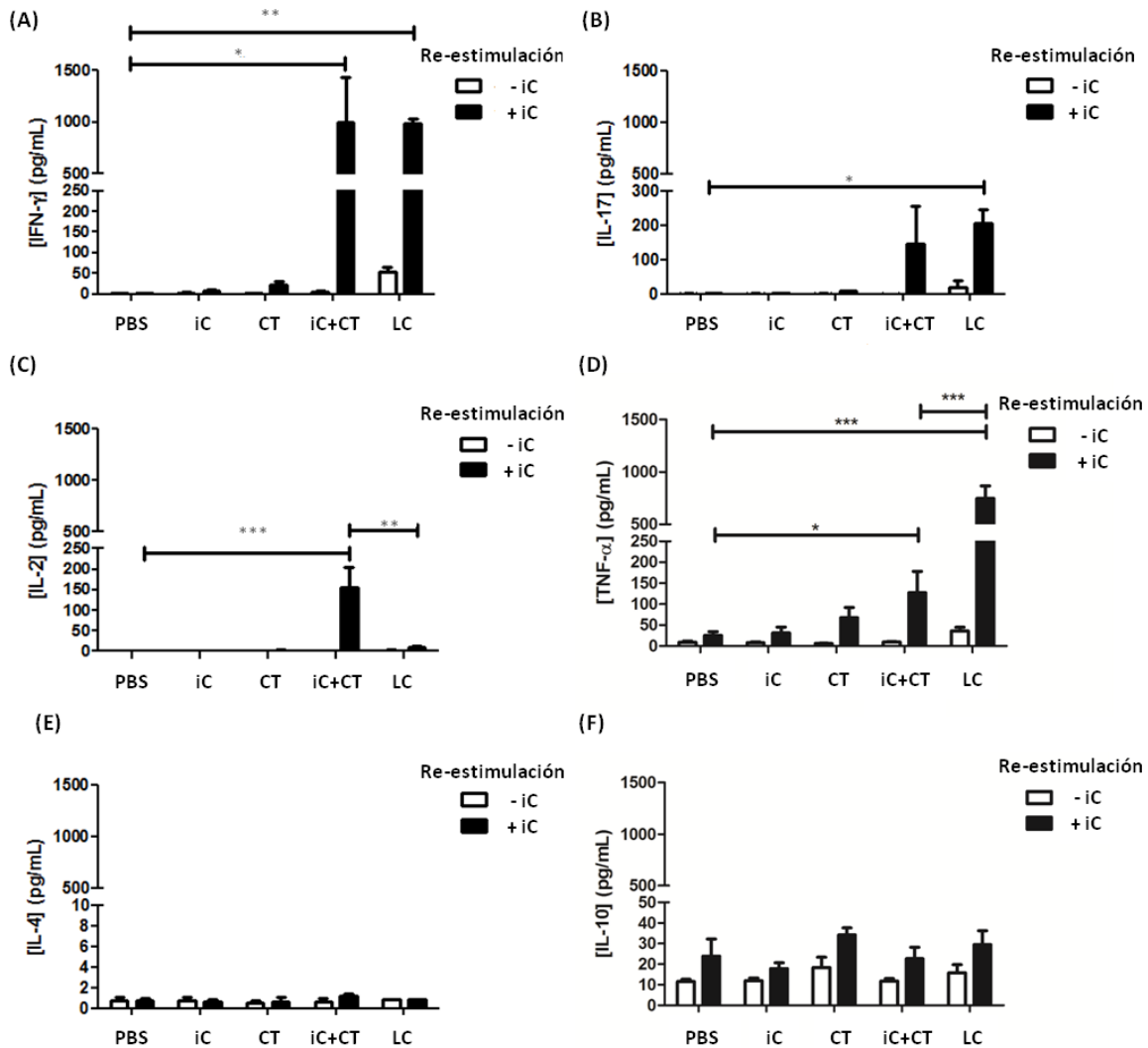


Figura 1. La inoculación intradérmica (i.d.) de los conidios inactivados de *S. schenckii* (iC) en combinación con la Toxina del Cólera (CT) induce una alta producción de IFN- γ , IL-17 e IL-2, en contraste con la infección. Se inyectaron ratones de manera i.d. en las orejas con buffer salino de fosatos (PBS), iC, CT, iC en conjunto con CT (iC+CT) o conidios vivos (LC). Después de 14 días de la inoculación, se obtuvieron 3×10^5 células presentes en los ganglios linfáticos drenantes de la piel de las orejas (sdLN) y se re-estimularon (+iC) o no (-iC) con 5×10^5 iC. Después de 24 horas

(h) de re-estimulación se obtuvieron los sobrenadantes del cultivo para evaluar la presencia de las citocinas IFN- γ (A), IL-17 (B), IL-2 (C), TNF- α (D), IL-4 (E) and IL-10 (F). Todas las gráficas muestran la media \pm el error estándar medio (SEM). Los datos provienen de tres experimentos independientes con tres ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrollaron un ANOVA de dos vías y una post-prueba de Bonferroni; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

La inoculación de los conidios de *S. schenckii* en conjunto con la TC induce una gran cantidad de linfocitos T CD4⁺ productores de IL-17 en comparación con la infección.

Para evaluar a los linfocitos T CD4⁺ específicos para los conidios del hongo *S. schenckii* y determinar su producción de citocinas, se cargaron a DC con iC y se cultivaron durante 7 días en conjunto con las células obtenidas de los sdLN de ratones inmunizados con iC+TC o con LC. La expansión de los linfocitos T CD4⁺ y su producción de citocinas (mediante la evaluación de las citocinas intracelulares) se evaluó mediante citometría de flujo. Inesperadamente, se observó un aumento significativo en la frecuencia de los linfocitos T CD4⁺ obtenidos de los ratones inmunizados con iC+TC en comparación con las obtenidas de los ratones inoculados con LC (**Figuras 2A-2B**). Además, la frecuencia de linfocitos T CD4⁺IL-17⁺ fue significativamente mayor en los ratones inmunizados con iC+TC en comparación con los ratones inmunizados con LC (**Figuras 2C-2D**). En contraste, la frecuencia de los linfocitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ fue mayor en los ratones inoculados con los LC, en comparación con los ratones inmunizados con iC+TC (**Figura 2E**). Además, la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ IL-17⁺/IFN- γ ⁺ fue similar en los ratones inmunizados con iC+TC o LC (**Figura 2F**), a diferencia de los pocos linfocitos T CD4⁺ que expresan estas citocinas detectadas en los ratones inoculados con PBS, iC o TC. Estos resultados indican que la inmunización con iC en combinación con la TC puede inducir una gran cantidad de linfocitos T CD4⁺ que producen IL-17, mientras que la infección con el hongo *S. schenckii* induce preferentemente una respuesta de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ .

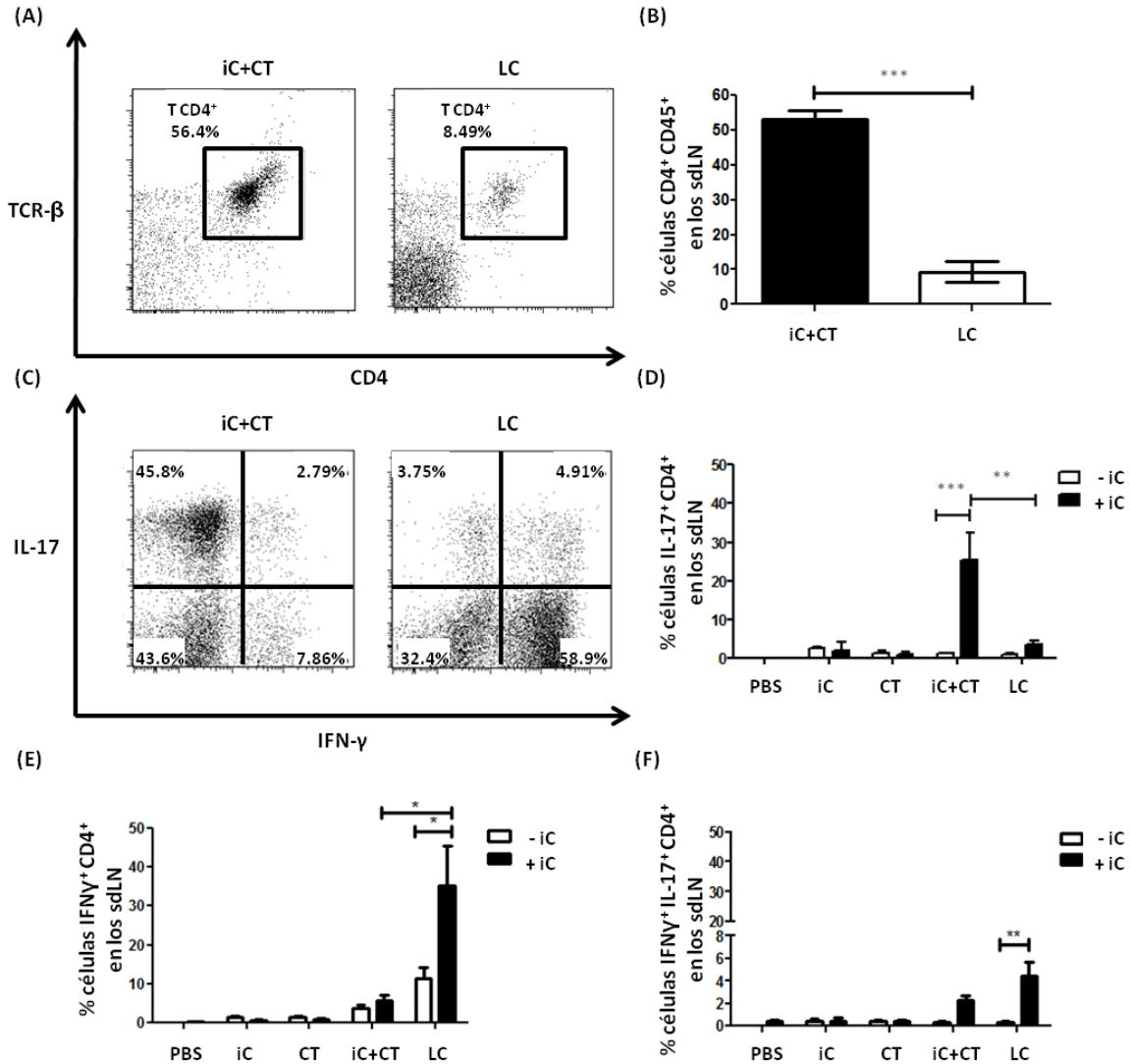


Figura 2. Los conidios inactivados de *S. schenckii* en conjunto con la CT inducen una fuerte respuesta Th17 comparada con la infección en piel. Se inyectaron a ratones C57BL/6 de manera intradérmica en las orejas con PBS, iC (5×10^5 iC), CT (1 μ g), iC+CT or LC (5×10^5 LC). Después de 14 días, se obtuvieron 3×10^5 células presentes en los s.dLN y se co-cultivaron por 7 días con 1×10^5 células dendríticas (DCs) que habían sido previamente cultivadas (+iC) o no (-iC) con iC (5×10^5 iC). Después de 7 días de co-cultivo las células fueron teñidas para los marcadores de superficie CD45, CD4 y TCR- β , así como para las citocinas intracelulares IFN- γ e IL-17. **(A, C)** Se muestran plots representativos que muestran la frecuencia de las poblaciones CD45⁺CD4⁺TCR- β ⁺ **(A)** y la expresión de las citocinas IFN- γ e IL-17 en los linfocitos T CD4⁺ **(C)**. **(B)** La gráfica muestra la frecuencia de las poblaciones CD45⁺CD4⁺TCR- β ⁺. **(D-F)** Así como la frecuencia de las poblaciones IL-17⁺ **(C)** IFN- γ ⁺ **(D)** e IL-17⁺IFN- γ ⁺ **(E)** provenientes de la población de linfocitos T CD4⁺. Todas las gráficas muestran la media \pm SEM, los datos provienen de dos experimentos independientes con

tres ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de una vía (**B**) o una ANOVA de dos vías (**D, E, F**) así como una post-prueba de Bonferroni; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Los conidios inactivados del hongo *S. schenckii* en conjunto con la TC inducen una respuesta de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo de memoria central y memoria efectora, en comparación con la infección.

Considerando el aumento en la frecuencia de los linfocitos T CD4⁺ y la alta producción de IL-2 obtenida de los ratones inmunizados con iC+TC, en comparación con los ratones inoculados con LC, se decidió evaluar el fenotipo de los linfocitos T CD4⁺ presentes en los sdLN en busca de la expresión de marcadores de memoria. Todas las células presentes en los sdLN de los ratones inmunizados con iC+TC o LC se cultivaron durante 7 días en conjunto con iC. La expresión de los diferentes marcadores de memoria de superficie presentes en los linfocitos T CD4⁺ fue evaluada mediante citometría de flujo.

De manera importante, en los ratones inmunizados con iC+TC, se encontró una población de linfocitos T CD4⁺ que expresa los marcadores CD62L y CD44, y que es significativamente mayor en estos ratones (**Figuras 3A y 3C**). Además, hay una población que expresa el marcador CD44 y que es negativa para la expresión del marcador CD62L (CD44⁺CD62L⁻), la cual aunque en el dot plot representativo se muestra que es mayor en los ratones inyectados con LC (**Figuras 3A**), cuando se evalúa la expresión del marcador CD62L en esta población, se observa que en los ratones inyectados con los LC esta población posee una alta expresión de este marcador, lo que podría describir la presencia de un fenotipo efector de linfocitos T generados tras la inoculación de los LC (**Figura 3B**). Por otra parte, la expresión de los marcadores de memoria (CD44 y CD62L) y la baja expresión de CD69 en la población con marcadores CD44⁺ y CD62L⁻ en las poblaciones de linfocitos T generados tras la inmunización con iC+CT (**Figura 3B**), sugieren que podrían corresponder a poblaciones con un fenotipo de memoria central y memoria efectora, respectivamente. En conjunto, estos resultados indican que la inmunización con iC en combinación con la TC induce una respuesta de linfocitos T CD4⁺ con un fenotipo

de memoria central y memoria efectora en los sdLN, mientras que la respuesta inducida por la infección cutánea con *S. schenckii* presenta un fenotipo efector.

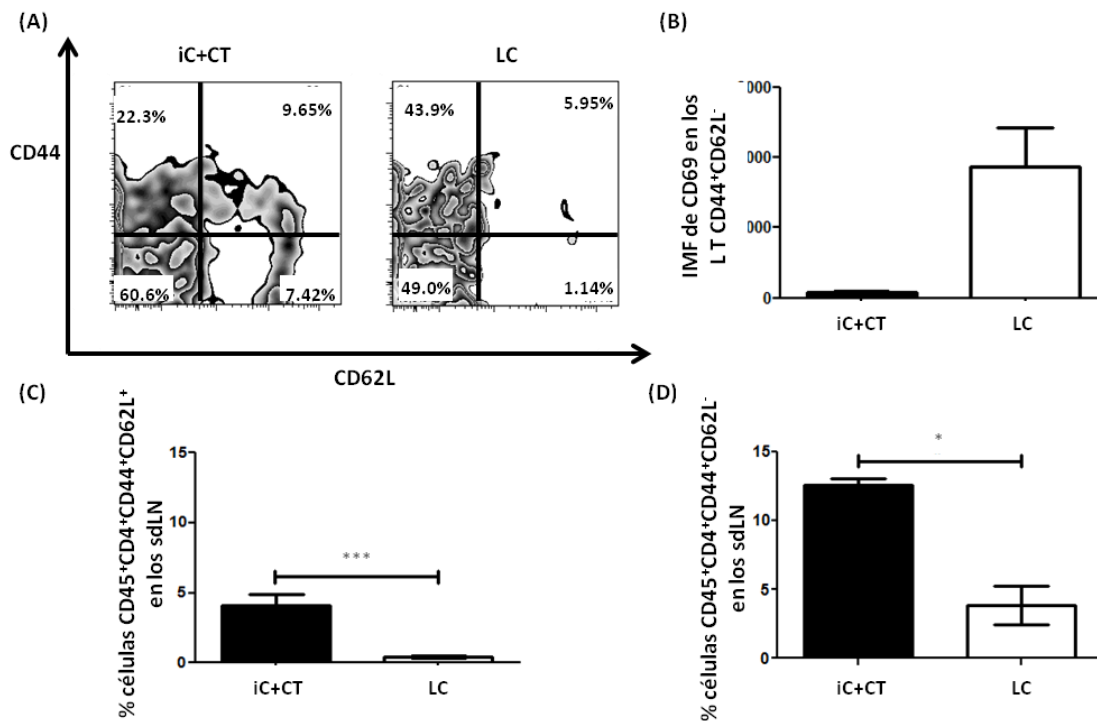


Figura 3. Los conidios inactivados de *S. schenckii* en conjunto con la CT inducen una respuesta de linfocitos T CD4⁺ con fenotipo de memoria central (T_{CM}) y memoria efectora (T_{EM}) comparado con la infección. Se inocularon a ratones C57BL/6 de manera i.d. en las orejas con iC+CT o LC (5 x 10⁵ LC). Después de 14 días, se obtuvieron 3 x 10⁵ células presentes en los sdLN y se so-cultivaron durante 7 días con 5 x 10⁵ iC. Después de los 7 días de co-cultivo las células fueron teñidas para los marcadores de superficie CD45, CD4, TCR-β, CD44, CD62L and CD69. **(A-B)** Se muestra un plot representativo que muestra las frecuencias de las poblaciones CD44⁺CD62L⁺ y CD44⁺CD62L⁻ provenientes de la población de linfocitos T CD4⁺ **(A)**; así como la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de la expresión del marcador CD69 en la población CD44⁺CD62L⁻ **(B)**. **(C-D)** Las gráficas muestran los porcentajes de las poblaciones CD4⁺CD44⁺CD62L⁺ (Fenotipo de T_{CM}) **(C)** y CD4⁺CD44⁺CD62L⁻ (Fenotipo de T_{EM}) **(D)** provenientes de la población CD45⁺. Todas las gráficas muestran la media ± SEM de dos experimentos independientes con tres ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de una vía y una post-prueba de Bonferroni; *p<0.05; ***p<0.001.

La infección con el hongo *S. schenckii* induce una fuerte respuesta Th1/ Th17 en la piel.

Tomando en cuenta las diferencias observadas en el fenotipo de los linfocitos T CD4⁺ presentes en los sdLN después de la inoculación con iC+CT, en comparación con la inoculación de LC, se evaluó la presencia de linfocitos T CD4⁺ y su producción de citocinas pero ahora en el sitio de la inoculación. De manera sorprendente se observó un aumento en la frecuencia (**Figura 4A**) y en el número total (**Figura 4B**) de linfocitos T CD4⁺ en las orejas de los ratones infectados con LC, en comparación con los ratones inmunizados con iC+TC. Es importante destacar que la frecuencia y el número total de linfocito T CD4⁺ IFN γ ⁺ son significativamente mayores en los ratones infectados con LC, en comparación con los ratones inoculados con iC+TC (**Figuras 4C y 4E**). Además, es importante señalar que después de la re-estimulación de los linfocitos T CD4⁺ con la mezcla de Ionomicina/Forbol 12-miristato 13-acetato (**Iono / PMA**), la frecuencia de los linfocitos T CD4⁺IL-17⁺ es similar en los ratones inoculados con iC+TC y en los inoculados con LC (**Figura 4C**), sin embargo, el número total de linfocitos T CD4⁺IL-17⁺ es mayor en los ratones inoculados con los LC (**Figura 4D**). Además, la frecuencia de los linfocitos T CD4⁺ IFN γ ⁺/IL-17⁺ es similar en los ratones inoculados con iC+TC y con LC (**Figura 4C**), aunque el número es mayor en los ratones infectados (**Figura 4F**). Así también, es importante recalcar que no se observaron diferencias por la presencia de iC durante la re-estimulación de estas células, esto puede deberse a que la estimulación policlonal de los linfocitos T con la mezcla Iono/PMA es demasiado intensa, lo que podría estar ocultando la respuesta específica contra los iC. Sin embargo, a pesar de que la estimulación no pone de manifiesto la respuesta antígeno específica, si deja claro las diferencias en los perfiles de diferenciación de los linfocitos T presentes en la piel tras la inmunización de los ratones con los iC+CT o los LC. Además, la frecuencia y el número total de linfocitos T CD4⁺ TNF α ⁺ es mayor en los ratones infectados con los LC en comparación con los ratones inoculados con iC+CT (**Figura 4G y 4H**). Estos resultados sugieren que la infección con *S. schenckii* induce una fuerte respuesta Th1 (IFN- γ y TNF α) y Th17 en la piel.

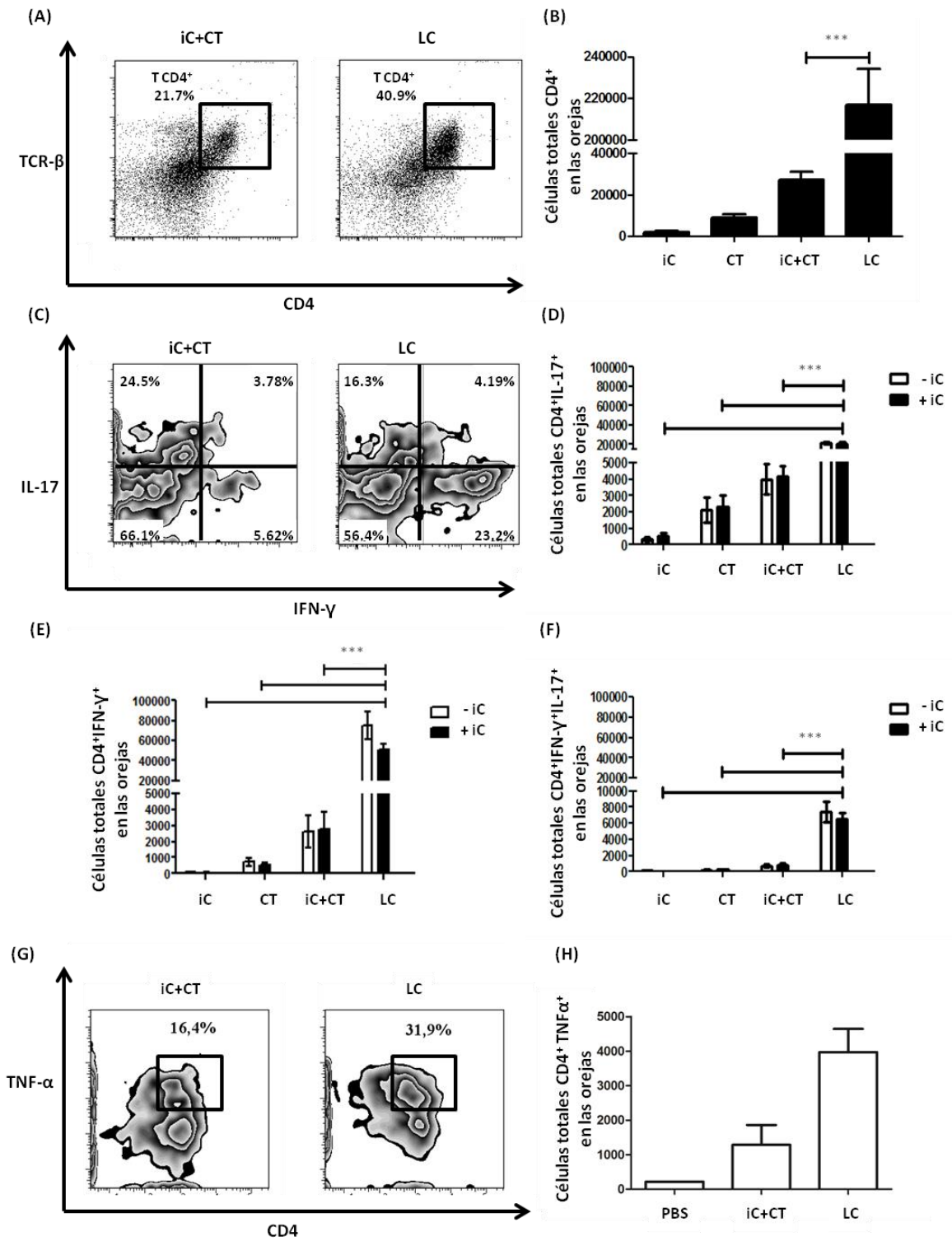


Figura 4. La infección con *S. schenckii* induce una fuerte respuesta de IFN- γ / IL-17 en piel. Se inocularon a ratones C57BL/6 de manera i.d. en las orejas con iC (5×10^5 iC), CT (1 μ g), iC+CT o LC (5×10^5 LC). Después de 31 días se obtuvieron las células de las orejas y se re-estimularon (+iC)

o no (-iC) con 5×10^5 iC por toda la noche, para finalmente ser teñidas para los marcadores de superficie CD45, CD4 and TCR- β , así como para las citocinas intracelulares IFN- γ e IL-17. **(A, C)** Se muestran plots representativos que muestran la frecuencia de las poblaciones CD45⁺CD4⁺TCR- β ⁺ **(A)** y la expresión de las citocinas IFN- γ e IL-17 en los linfocitos T CD4⁺ después de la re-estimulación lono/PMA **(C)**. **(B)** La gráfica muestra los números totales de las células CD45⁺CD4⁺TCR- β ⁺ presentes en las orejas. **(D-F)** Así como los números totales de linfocitos T CD4⁺ productores de IL-17⁺ **(D)**, IFN- γ ⁺ **(E)** e IL-17⁺IFN- γ ⁺ **(F)**. Todas las gráficas muestran la media \pm SEM de dos experimentos independientes con tres ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de una vía **(B)** o una ANOVA de dos vías **(D, E, F)** así como una post-prueba de Bonferroni; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Los conidios de *S. schenckii* en combinación con la CT inducen una respuesta DTH de mayor intensidad en comparación con la infección, y esta respuesta es dependiente de los linfocitos T CD4⁺ circulantes.

Teniendo en cuenta la producción de citocinas observada en la piel y los diferentes fenotipos de memoria de los linfocitos T CD4⁺ presentes en los sdLN, decidimos evaluar la capacidad de estas células para responder a un desafío *in vivo* con iC. Los ratones fueron inoculados con iC+CT o LC, después de un mes de la inmunización se retaron mediante la inoculación i.d. en la oreja de iC. Como se puede observar en la **Figura 5A**, la inoculación con iC+CT indujo una respuesta de DTH más fuerte, en comparación con los ratones inmunizados con LC, la cual se observa desde las 24 h posteriores al reto. Es importante destacar que la DTH inducida por la inmunización con el iC+CT se mantiene hasta las 48 h después del reto con iC. En contraste, la DTH inducida por los LC es menos intensa y solo se observa a las 24 h posteriores al reto, ya que no se mantiene hasta las 48 h después del reto. La respuesta DTH no se observó en los ratones inoculados con PBS, iC o CT **(Figura 5A)**. Es importante destacar que la respuesta DTH inducida por la inoculación de iC+CT se observó después de 1 mes de la inmunización, lo que indica la presencia de linfocitos T CD4⁺ de memoria. Por lo tanto, para evaluar qué sub-poblaciones de linfocitos T de memoria están involucrados en el desarrollo de la respuesta DTH, se eliminaron los linfocitos T CD4⁺ en los ratones inmunizados con iC+CT mediante la inoculación intraperitoneal (**i.p.**) de un anticuerpo

monoclonal anti-CD4 (α -CD4) 24 h antes del reto. Como se puede observar en la **Figura 5B**, la inoculación del anticuerpo monoclonal anti-CD4 (250 μ g) inhibe el desarrollo de la respuesta DTH. Además, la administración i.p. del anticuerpo anti-CD4 muestra una reducción significativa en el número total de linfocitos T CD4⁺ con un fenotipo de memoria central y memoria efectora presentes en los sdLN (**Figura 5C**). En contraste, no hay reducción en la cantidad de linfocitos T CD4⁺ presentes en las orejas de los ratones inoculados con el anticuerpo anti-CD4 (**Figura 5D**). Como se mencionó anteriormente, hay más células con un fenotipo de linfocito T_{CM} y T_{EM} presentes en los sdLN de los ratones inmunizados con iC+CT, en comparación con los ratones infectados con LC (**Figura 5C**). Sin embargo, el número total de linfocitos T CD4⁺ con un fenotipo de memoria efectora en la piel de los ratones infectados es mayor que el de los ratones inmunizados con iC+CT (**Figura 5D**). Estos resultados son similares a los observados en las Figuras 3 y 4. En conjunto, estos datos indican que la inoculación en la oreja con conidios de *S. schenckii* combinados con la CT induce una respuesta de DTH superior a la generada por la infección, y que esta respuesta depende de manera importante de los linfocitos T CD4⁺ con un fenotipo de memoria circulante (T_{CM} y T_{EM}).

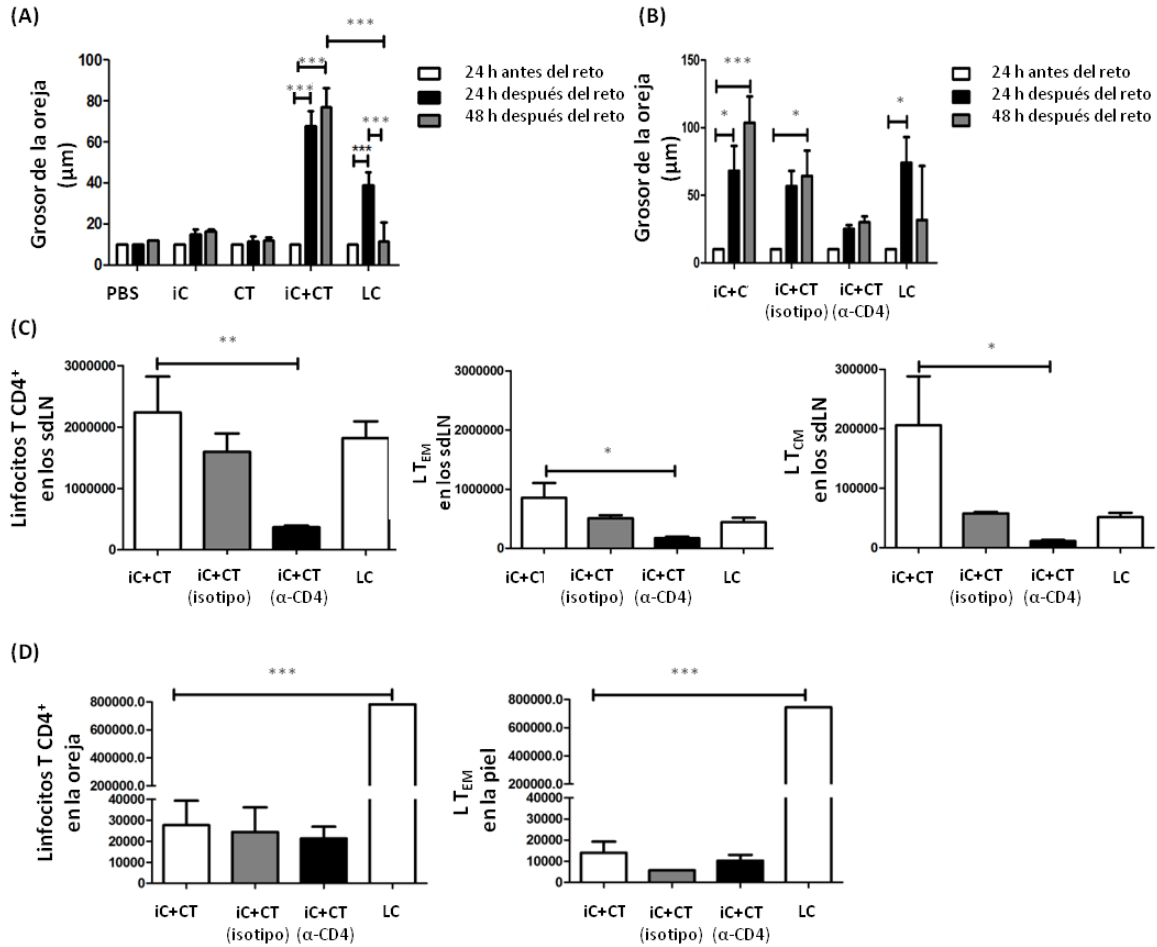


Figura 5. Los conidios inactivados de *S. schenckii* en conjunto con la CT inducen una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) mayor que la generada por la infección, la cual depende de los linfocitos T CD4⁺ de memoria circulante. **(A)** Se inocularon a ratones C57BL/6 de manera i.d. en las orejas con PBS (10 μL), iC (5 x 10⁵ iC), CT (1 μg), iC+CT o LC (5 x 10⁵ LC). Después de 31 días se midió el grosor de las orejas y los ratones se retaron mediante la inoculación i.d. en la oreja con iC (5 x 10⁵ iC). Después de 24 y 48 h post-reto, el grosor de la oreja fue medido nuevamente. **(B-D)** Además se inocularon a ratones C57BL/6 de manera i.d. en las orejas con iC+CT o LC. Después de 31 días, los ratones inmunizados con iC+CT fueron inoculados de manera intraperitoneal (i.p.) con PBS, un anticuerpo monoclonal anti-CD4 (α -CD4) (250 μg) o un anticuerpo irrelevante (isotipo) (250 μg), mientras que los ratones inoculados con los LC solo fueron inoculados con PBS vía i.p. Después de 24 h posteriores a la inoculación con PBS, anti-CD4 o el anticuerpo irrelevante, se midió el grosor de las orejas y los ratones fueron retados mediante la inoculación i.d. en las orejas con iC (5 x 10⁵ iC). El grosor de las orejas se midió a las 24 y 48 h post-reto **(B)**. Además se obtuvieron las células presentes en los sdLN y en las orejas de los ratones y se tiñeron para los marcadores CD45, CD4, TCR- β , CD44, CD62L, CCR7 y CD69. Las gráficas

muestran los números totales de linfocitos T CD4⁺, así como aquellos con un fenotipo de memoria central (T_{CM}) y memoria efectora (T_{EM}) presentes en los sdLN (C) y en las orejas de los ratones (D). Todas las gráficas muestran la media ± SEM de dos experimentos independientes con tres ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de dos vías (A, B) o una ANOVA de una vía (C, D) así como una post-prueba de Bonferroni; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Los conidios inactivados de *S. schenckii* en combinación con la CT inducen una respuesta protectora mediada por linfocitos T CD4⁺ de memoria circulante.

Teniendo en cuenta que la inmunización con los conidios inactivados de *S. schenckii* en conjunto con la CT induce una respuesta Th17 de memoria central y que la DTH inducida por esta misma inmunización depende de los linfocitos T CD4⁺ con un fenotipo de memoria circulante, decidimos evaluar la protección inducida por la inmunización con iC+CT, después de un reto con los conidios vivo de *S. schenckii* en una concentración capaz de inducir una infección sistémica en el ratón. Con este objetivo en mente, desarrollamos un modelo de infección en las orejas de los ratones que nos permitió observar lesiones locales en la piel y manifestaciones sistémicas de la infección después de la administración i.d. en las orejas con diferentes cantidades de LC. Los resultados mostraron que, aunque los ratones desarrollaron lesiones cutáneas cuando se les inoculan 5x10⁵ LC, a esta dosis no desarrolla la aparición de granulomas en la cola de los ratones infectados. En contraste, una dosis de 10x10⁶ LC, permite el desarrollo de lesiones tanto locales como sistémicas (granulomas en la cola) (**Figura 6A**). Interesantemente, la inmunización con iC+CT muestra una reducción significativa del área de la lesión en la piel después de 17 o 24 días de la infección, en comparación con los ratones inoculados con PBS, iC o CT (**Figura 6B**). Es importante destacar que la inmunización con iC+CT también muestra un aumento significativo en el porcentaje de ratones libres de granulomas en la cola (90%), en comparación con los ratones inoculados con PBS, iC o CT (**Figura 6C**). Finalmente, para evaluar el papel de los linfocitos T CD4⁺ de memoria circulante en la protección contra una infección por *S. schenckii*, se evaluó el área de la lesión cutánea. Como se puede observar en la

figura 6D, tras la inoculación i.p. del anticuerpo monoclonal anti-CD4, el cual elimina de manera importante a los linfocitos T CD4⁺ con un fenotipo de memoria circulante presentes en los sdLN, el área de la lesión en la oreja, generada tras la inoculación de los LC en los ratones previamente inmunizados con iC+CT, es del mismo tamaño al área de las lesiones obtenidas en ratones que no han sido inmunizados (PBS). Este resultado sugiere que los linfocitos T CD4⁺ con un fenotipo de memoria circulante generados mediante la inmunización con iC+CT, desempeñan un papel importante en el control óptimo de una infección por *S. schenckii* (**Figura 6D**). Estos datos indican que la inmunización i.d. en las orejas de los ratones con conidios inactivados de *S. schenckii* en combinación con la CT induce una protección local mediada por linfocitos T CD4⁺ de memoria circulante.

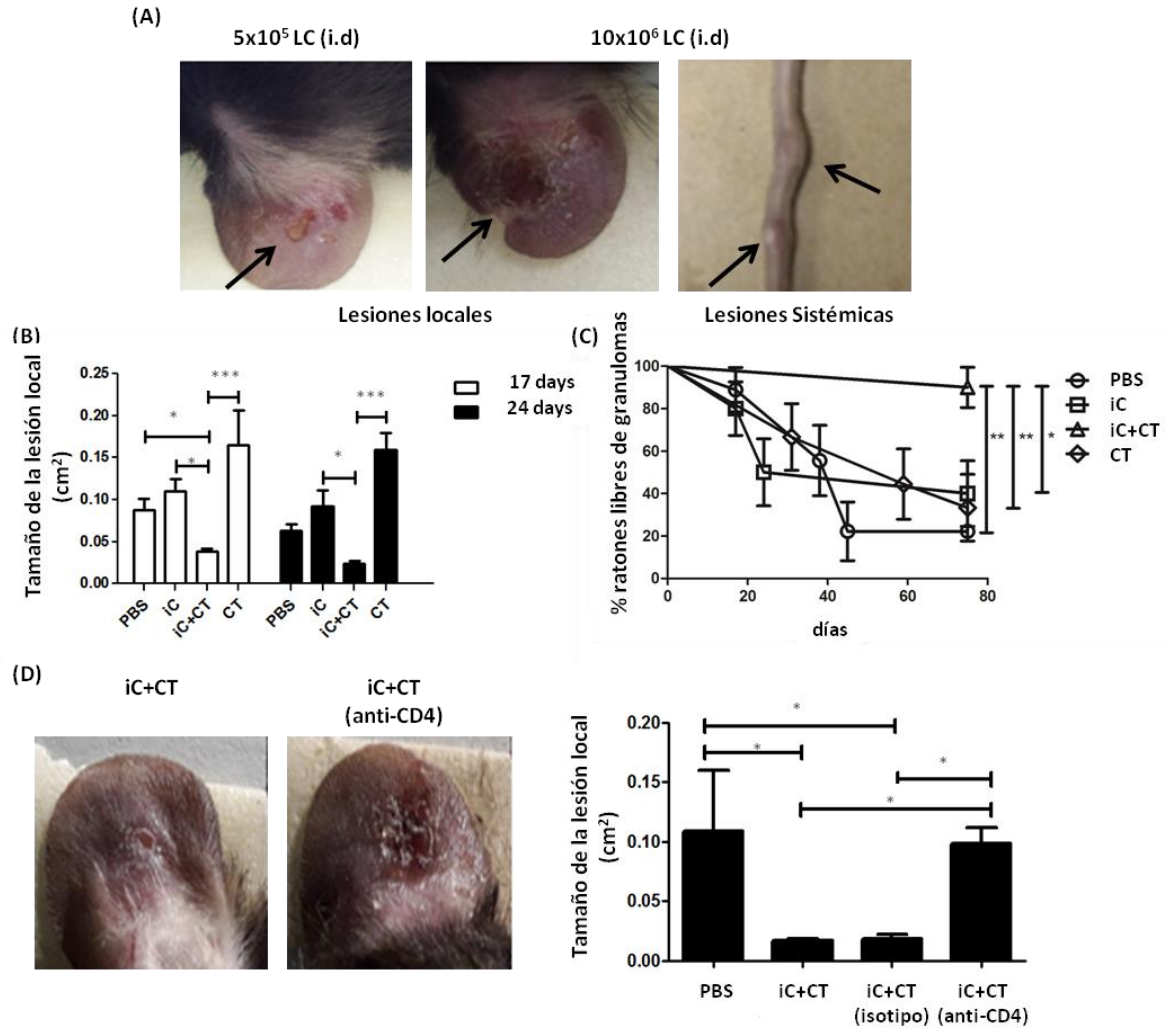


Figura 6. Los conidios inactivados de *S. schenckii* en conjunto con la CT inducen una respuesta protectora mediada por linfocitos T CD4⁺ de memoria circulante. (A) Se inocularon a ratones C57BL/6 de manera i.d. en las orejas con LC (5×10^5 o 10×10^6 LC). Después de 17 días se evaluó la aparición de lesiones locales en las orejas y de granulomas en la cola de los ratones infectados. (B-D) Además se inocularon a ratones C57BL/6 de manera i.d. en las orejas con PBS (10 μ L), iC (5×10^5 iC), CT (1 μ g) o iC+CT. Después de 31 días los ratones fueron infectados mediante la inoculación i.d. en las orejas con 10×10^6 LC. Después de 17 y 24 días post-infección se calculó el área de las lesiones locales en las orejas (B) y se evaluó la aparición de granulomas en la cola de los ratones infectados (C). Adicionalmente los ratones inmunizados con iC+CT fueron inoculados de manera i.p. con un anticuerpo monoclonal anti-CD4 (250 μ g) o un anticuerpo irrelevante (isotipo) (250 μ g) 24 h antes de la infección y se determinó el tamaño de las lesiones locales en las orejas (D). Las imágenes muestran ejemplos representativos de las lesiones locales y sistémicas presentes en los ratones infectados. Todas las gráficas muestran la media \pm SEM de tres experimentos

independientes con tres ratones por grupo. Para el análisis estadístico se desarrolló una ANOVA de una vía (B, D) así como una post.-prueba de Bonferroni; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

DISCUSIÓN.

Algunos reportes han demostrado que la infección por el hongo *S. schenckii* puede generar una respuesta inmune adaptativa y que además, esta respuesta es importante para el control y eliminación de la infección ^{19, 30, 31, 33, 42, 43, 44, 46}. Sin embargo, se desconocía si la infección podría inducir una respuesta inmune celular de memoria. Así también, recientemente en nuestro laboratorio demostramos que la inmunización en piel con CT en combinación con antígenos modelo como la HEL induce una respuesta inmune celular de memoria con un fenotipo Th1 / Th17 ⁷⁷. Sin embargo, se desconocía si la inmunización con antígenos microbianos en piel en conjunto con la CT podría inducir una respuesta inmune similar. En este estudio demostramos que la inmunización i.d. en las orejas de los ratones con conidios inactivados de *S. schenckii* en conjunto con la CT induce una respuesta inmune celular mediada por linfocitos T CD4⁺ con un fenotipo de memoria circulante. Además, estas células producen principalmente IL-17 y pueden proteger a los ratones contra la infección. Por el contrario, observamos que la infección induce una potente respuesta inmune en la piel de los ratones mediada por linfocitos T CD4⁺ con un fenotipo efector que produce altos niveles de IFN- γ y TNF α . Recientemente, algunos artículos demostraron que una respuesta inmune celular Th1/Th17 es importante para el control y la eliminación óptima del hongo *S. schenckii* ^{31, 42, 43, 45, 46}. Sin embargo, estos resultados se obtuvieron mediante modelos *in vitro* o mediante la inoculación por diferentes vías sistémicas de las levaduras de *S. schenckii*, en ratones que además poseían en su mayoría un fondo genético BALBc ^{44, 46}, el cual se ha reportado es una cepa más susceptible a la infección y en donde predomina una respuesta inmune con un perfil tipo Th1 ⁹⁵. Por el contrario, en nuestro modelo de estudio encontramos que en ratones con un fondo genético C57BL/6 se induce una respuesta inmune Th1/ Th17 utilizando los conidios de *S. schenckii*, los cuales representan la forma infectiva del hongo, además los ratones

fueron inoculados a través de la piel, la cual es la vía de entrada más frecuente que utiliza el hongo para causar la infección⁵. Sin embargo, sería relevante determinar si bajo nuestras condiciones de infección o inmunización la respuesta inmune inducida es similar en diferentes cepas de ratones. Algunos informes indican que los conidios de *S. schenckii* cambian a su forma de levadura durante la infección, una vez que entran en el organismo ^{3, 5, 6,} , a pesar de esto, en nuestro modelo al menos durante el contacto inicial con las DC en la piel los conidios parecen mantener su morfología. El desarrollo de una respuesta inmune con un perfil Th1/Th17 obtenida a través de nuestro modelo de infección en piel con los conidios de *S. schenckii* es relevante ya que aunque los conidios y las levaduras comparten moléculas, ambas morfologías podrían potencialmente generar diferentes respuestas inmunes ^{41, 43, 96,}

Reportes previos han demostrado que tanto los conidios como las levaduras inactivadas del hongo así como un extracto proteico obtenido de ambas morfologías son antígenos capaces de activar a las CD *in vitro* ^{42, 43, 44}. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la inoculación i.d. de solo los conidios inactivados no induce una respuesta inmune celular, y que es necesario inocularlos en conjunto con la CT para inducir una respuesta. Estos resultados sugieren que hay moléculas que son necesarias para la inducción de una respuesta inmune celular, que están presentes en los conidios vivos pero que se pierden durante la inactivación por calor de los conidios. Adicionalmente, nuestros resultados demuestran el potencial adyuvante de la CT en piel cuando se combina con antígenos fúngicos, como los conidios de *S. schenckii*.

En este estudio, demostramos también diferencias importantes entre la respuesta inmune inducida por la inmunización en piel con iC+CT y la respuesta inducida por la infección. Una de las principales diferencias fue la producción diferencial de IFN- γ e IL-17. Mientras que la infección indujo preferentemente una alta producción de IFN- γ por los linfocitos T CD4⁺, la inmunización en la piel con iC+CT indujo principalmente la producción de IL-17. Estos resultados concuerdan con evidencia previa que muestra la presencia de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ en las

lesiones de los pacientes, mismos que solo controlan la diseminación de la infección ^{31, 45}, mientras que la producción de IL-17 se ha asociado principalmente con la eliminación óptima de *S. schenckii*, así como de otras bacterias extracelulares y de otros hongos, como por ejemplo *Candida albicans*, en cuyos casos, la producción de IL-17 se ha asociado con el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección, así como para la producción de citocinas pro-inflamatorias por parte de las células epiteliales, mecanismos que en conjunto permiten la correcta eliminación del patógeno ^{34, 46, 97}. Sin embargo desconocemos si estos mismos mecanismos se aplicarían en la eliminación y la protección en contra del hongo *S. schenckii* generada mediante nuestro mecanismo de inmunización, por lo que sería importante evaluar estos mecanismos en estudios posteriores. Además, la alta producción de IL-17 por los linfocitos T CD4⁺ generada mediante la inmunización en piel podría ser un efecto de la CT como lo han mencionado informes anteriores ⁹⁸. Además, este fenotipo correlaciona con el obtenido por la inmunización en piel de la TC combinada con HEL ⁷⁷.

Otra diferencia importante entre la infección y la inmunización en piel, fue la producción de altos niveles de IL-2 inducida por la inmunización en piel con iC+CT, en comparación con la infección. Esta citocina es importante para la proliferación de los linfocitos T y el desarrollo de linfocitos T de memoria ⁶³. Los linfocitos T_{CM} son una población con la capacidad de producir altos niveles de IL-2, esta población se generó por inmunización en piel con iC+CT, mientras que la infección generó principalmente células T CD4⁺ con un fenotipo efector. Reportes previos han demostrado que los linfocitos T con un fenotipo efector son reclutados al sitio de la infección, mientras que los linfocitos T con un fenotipo de memoria circulante (T_{CM} y T_{EM}) tienen la capacidad de recircular a través de los tejidos y los ganglios linfáticos ^{54, 55, 69}. Estos resultados podrían explicar el aumento de los linfocitos T CD4⁺ presentes en las orejas de los ratones infectados. Sin embargo, a pesar de la presencia de estos linfocitos en la piel, todo parece indicar que son incapaces de resolver la infección. Por lo tanto, la presencia de conidios vivos en la piel podría promover un ambiente inflamatorio permanente que aumenta la severidad de la

lesión promoviendo la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ presentes en los sdLN hacia células T efectoras que se reclutan hacia el sitio de la infección para poder eliminar al patógeno, mecanismo que se ha demostrado en reportes previos ^{99, 100}. En este contexto, modelos de infecciones virales agudas, han demostrado que las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicas del virus que son estimuladas por cortos períodos de tiempo se desarrollan preferentemente hacia linfocitos T con un fenotipo de memoria ¹⁰¹. Además, en las infecciones virales agudas, se han reportado ambos fenotipos de memoria (central y efectora) ¹⁰². Los resultados son similares a nuestros hallazgos en donde la inmunización con los iC+CT podría simular una infección aguda. En contraste, en un reporte previo se menciona que durante una infección viral crónica, los linfocitos T CD8⁺ específicos del virus no lograron adquirir las propiedades de un linfocito T de memoria ⁵⁸, algo similar a nuestros resultados obtenidos con la infección por *S. schenckii*.

Sin embargo, a pesar de que informes previos mencionan que los linfocitos T presentes en los tejidos podrían mediar una reacción de DTH sin la participación de los linfocitos T de memoria circulante ⁶², nuestros resultados muestran que durante la infección, las células T presentes en la piel no fueron capaces de mantener la respuesta DTH a las 48 horas post-reto; mientras que la DTH inducida por la inmunización en la piel con iC+CT que genera linfocitos T de memoria circulante fue más intensa y se mantuvo incluso después de las 48 horas post-reto. Estos resultados sugieren que los linfocitos T presentes en la piel son importantes en el comienzo de la reacción de DTH, pero que es necesaria la participación de los linfocitos T de memoria circulante para el mantenimiento de esta respuesta. Por lo tanto, cuando nosotros eliminamos a los linfocitos T CD4⁺ con un fenotipo de memoria circulante mediante la administración de un anticuerpo monoclonal anti-CD4 que no eliminaba a los linfocitos T CD4⁺ residentes de tejido, la respuesta DTH no se mantuvo.

Es importante destacar que la inmunización cutánea que genera una respuesta inmune mediada por linfocitos T CD4⁺ con un fenotipo de memoria circulante, que

producen principalmente IL-17, se tradujo en una respuesta inmune protectora mediada por estas células (T_{CM} y T_{EM}). Por el contrario, la infección indujo una respuesta efectora no protectora con un fenotipo Th1 que produce altas cantidades de TNF- α , citocina que se ha reportado participa en la gravedad de las lesiones cutáneas ^{95, 103}. Además, la infección induce una respuesta DTH transitoria que podría estar relacionada con la respuesta inmune observada en pacientes con esporotricosis ^{31, 45}. El hecho de que la IL-17 producida por los linfocitos T CD4⁺ presentes en la piel no protege en nuestro modelo de infección podría estar relacionada con el hecho de que estos linfocitos poseen un fenotipo efector que contrasta con lo observado en el modelo de infección por *Candida albicans* en donde se desarrolla una respuesta inmune mediada por linfocitos T pero con un fenotipo de memoria residente de tejidos (T_{RM}) ⁷³.

Finalmente, algunos reportes previos han demostrado la capacidad de los linfocitos T_{RM} para proteger en contra de una infección con el virus de influenza ^{55, 70, 71} o en contra de infecciones fúngicas generadas por *Candida albicans* ⁷³. Sin embargo, nuestros resultados muestran que cuando el anticuerpo monoclonal anti-CD4 se inoculó en los ratones, se perdió la protección contra la infección, la cual había sido inducida por la inmunización cutánea con iC+CT, lo que demuestra que, los linfocitos T CD4⁺ con un fenotipo de memoria circulante son los principales responsables de mediar la protección contra la infección por *S. schenckii*. Estos resultados concuerdan con informes previos que demuestran la importancia de los linfocitos T con fenotipo de memoria circulante en la generación de una respuesta inmune protectora contra la infección por *Chlamydia trachomatis* ^{62, 69}. Este es el primer reporte que demuestra la participación de los linfocitos T CD4⁺ con fenotipo de memoria circulante para el desarrollo de una respuesta inmune protectora contra la infección por *S. schenckii*.

En resumen, existen diferencias importantes entre la respuesta inmune inducida por la infección y la inducida por la inmunización en piel. Nosotros proponemos que la generación de una disminuida respuesta de linfocitos T CD4⁺ de memoria circulante

(centrales y efectores), en combinación con linfocitos T CD4⁺ efectores no protectores que expresan altas cantidades de TNF α , representan un mecanismo importante que utiliza el hongo para generar daño tisular y así poder evadir una respuesta inmune efectiva, generando de esta manera una infección crónica. Este reporte muestra el desarrollo y la importancia de los linfocitos T CD4⁺ de memoria circulante en la eliminación del hongo *S. schenckii*, lo que contribuye a la comprensión del desarrollo de una respuesta inmune de memoria que podría proteger contra esta infección. Esta información podría proporcionar nuevas ideas para el entendimiento de otras infecciones fúngicas crónicas, así como para el diseño de vacunas eficaces en contra de este hongo y posiblemente en contra de otras infecciones crónicas.

CONCLUSIÓN.

Nuestros resultados demostraron que la inoculación intradérmica de los conidios inactivados en conjunto con la CT induce una respuesta inmune celular mediada por linfocitos T CD4⁺ de memoria circulante, los cuales preferencialmente producen IL-17 y protegen al ratón en contra de una infección con *S. schenckii*. En contraste, la inoculación i.d. con los conidios vivos del hongo induce una respuesta de linfocitos T CD4⁺ efectores que principalmente producen IFN- γ . Nuestros hallazgos tienen importantes implicaciones para el entendimiento de la respuesta inmune observada durante la infección con *S. schenckii*, así como para el entendimiento de los roles que desempeñan las diferentes sub-poblaciones de linfocitos T de memoria en el desarrollo de una respuesta inmune protectora en contra de infecciones crónicas por hongos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rivitti, E. A. & Aoki, V. Deep fungal infections in tropical countries. *Clin.*

Dermatol. **17**, 171–90; discussion 105-6

2. López-Romero, E. *et al.* Sporothrix schenckii complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol.* **6**, 85–102 (2011).
3. Ramos-e-Silva, M., Vasconcelos, C., Carneiro, S. & Cestari, T. Sporotrichosis. *Clin. Dermatol.* **25**, 181–7 (2007).
4. Kauffman, C. A. Sporotrichosis. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 231–6; quiz 237 (1999).
5. Bonifaz, A. & Vázquez-González, D. Sporotrichosis: an update. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* **145**, 659–73 (2010).
6. Vázquez-del-Mercado, E., Arenas, R. & Padilla-Desgarenes, C. Sporotrichosis. *Clin. Dermatol.* **30**, 437–43 (2012).
7. Marimon, R. *et al.* Sporothrix brasiliensis, S. globosa, and S. mexicana, three new Sporothrix species of clinical interest. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3198–206 (2007).
8. Marimon, R., Gené, J., Cano, J. & Guarro, J. Sporothrix luriei: a rare fungus from clinical origin. *Med. Mycol.* **46**, 621–5 (2008).
9. Arrillaga-Moncrieff, I. *et al.* Different virulence levels of the species of Sporothrix in a murine model. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 651–5 (2009).
10. de Meyer, E. M. *et al.* Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting Sporothrix species in the Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii complex. *Mycologia* **100**, 647–61
11. Alba-Fierro, C. A., Pérez-Torres, A., López-Romero, E., Cuéllar-Cruz, M. & Ruiz-Baca, E. Cell wall proteins of Sporothrix schenckii as immunoprotective agents. *Rev. Iberoam. Micol.* **31**, 86–9 (2014).
12. Reed, K. D., Moore, F. M., Geiger, G. E. & Stemper, M. E. Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* **16**, 384–7 (1993).

13. Morris-Jones, R. Sporotrichosis. *Clin. Exp. Dermatol.* **27**, 427–31 (2002).
14. De Araujo, T., Marques, A. C. & Kerdel, F. Sporotrichosis. *Int. J. Dermatol.* **40**, 737–42 (2001).
15. Belknap, B. S. Sporotrichosis. *Dermatol. Clin.* **7**, 193–202 (1989).
16. Carvalho, M. T. M. *et al.* Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **35**, 655–9
17. Carlos, I. Z., Sassá, M. F., da Graça Sgarbi, D. B., Placeres, M. C. P. & Maia, D. C. G. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia* **168**, 1–10 (2009).
18. Dixon, D. M. *et al.* Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1106–13 (1991).
19. Maia, D. C. G., Sassá, M. F., Placeres, M. C. P. & Carlos, I. Z. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* **161**, 11–9 (2006).
20. Tachibana, T., Matsuyama, T. & Mitsuyama, M. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. *Med. Mycol.* **36**, 21–7 (1998).
21. da Rosa, A. C. M. *et al.* Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J. Am. Acad. Dermatol.* **52**, 451–9 (2005).
22. Shaw, J. C., Levinson, W. & Montanaro, A. Sporotrichosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**, 1145–7 (1989).
23. Heller, H. M. & Fuhrer, J. Disseminated sporotrichosis in patients with AIDS: case report and review of the literature. *AIDS* **5**, 1243–6 (1991).
24. Gori, S., Lupetti, A., Moscato, G., Parenti, M. & Lofaro, A. Pulmonary sporotrichosis with hyphae in a human immunodeficiency virus-infected

- patient. A case report. *Acta Cytol.* **41**, 519–21
25. Rocha, M. M. *et al.* Sporotrichosis in patient with AIDS: report of a case and review. *Rev. Iberoam. Micol.* **18**, 133–6 (2001).
 26. Silva-Vergara, M. L. *et al.* Multifocal sporotrichosis with meningeal involvement in a patient with AIDS. *Med. Mycol.* **43**, 187–90 (2005).
 27. Kauffman, C. A., Hajjeh, R. & Chapman, S. W. Practice Guidelines for the Management of Patients with Sporotrichosis. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 684–687 (2000).
 28. Lopes-Bezerra, L. M., Schubach, A. & Costa, R. O. Sporothrix schenckii and sporotrichosis. *An. Acad. Bras. Cienc.* **78**, 293–308 (2006).
 29. Davis, B. A. Sporotrichosis. *Dermatol. Clin.* **14**, 69–76 (1996).
 30. Miyaji, M. & Nishimura, K. Defensive role of granuloma against Sporothrix schenckii infection. *Mycopathologia* **80**, 117–24 (1982).
 31. Koga, T., Duan, H. & Furue, M. Immunohistochemical detection of interferon-gamma-producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. *Med. Mycol.* **40**, 111–4 (2002).
 32. Cunningham, K. M., Bulmer, G. S. & Rhoades, E. R. Phagocytosis and intracellular fate of Sporothrix schenckii. *J. Infect. Dis.* **140**, 815–7 (1979).
 33. Tachibana, T., Matsuyama, T. & Mitsuyama, M. Involvement of CD4+ T cells and macrophages in acquired protection against infection with Sporothrix schenckii in mice. *Med. Mycol.* **37**, 397–404 (1999).
 34. Martínez-Álvarez, J. A., Pérez-García, L. A., Flores-Carreón, A. & Mora-Montes, H. M. The immune response against Candida spp. and Sporothrix schenckii. *Rev. Iberoam. Micol.* **31**, 62–6 (2014).
 35. Koga, T., Duan, H., Urabe, K. & Furue, M. Immunohistochemical localization of activated and mature CD83+ dendritic cells in granulomas of

sporotrichosis. *Eur. J. Dermatol.* **11**, 527–9

36. Sassá, M. F. *et al.* Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis. *Immunology* **128**, 301–309 (2009).
37. Sassá, M. F., Ferreira, L. S., Ribeiro, L. C. de A. & Carlos, I. Z. Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-deficient mice. *Mycopathologia* **174**, 21–30 (2012).
38. Negrini, T. de C. *et al.* Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune response against *Sporothrix schenckii*. *Immunol. Invest.* **42**, 36–48 (2013).
39. Li, M., Chen, Q., Sun, J., Shen, Y. & Liu, W. Inflammatory response of human keratinocytes triggered by *Sporothrix schenckii* via Toll-like receptor 2 and 4. *J. Dermatol. Sci.* **66**, 80–2 (2012).
40. Gonçalves, A. C. *et al.* Involvement of major components from *Sporothrix schenckii* cell wall in the caspase-1 activation, nitric oxide and cytokines production during experimental sporotrichosis. *Mycopathologia* **179**, 21–30 (2015).
41. Guzman-Beltran, S., Perez-Torres, A., Coronel-Cruz, C. & Torres-Guerrero, H. Phagocytic receptors on macrophages distinguish between different *Sporothrix schenckii* morphotypes. *Microbes Infect.* **14**, 1093–101 (2012).
42. Verdán, F. F. *et al.* Dendritic cell are able to differentially recognize *Sporothrix schenckii* antigens and promote Th1/Th17 response in vitro. *Immunobiology* **217**, 788–94 (2012).
43. Uenotsuchi, T. *et al.* Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *Int. Immunol.* **18**, 1637–46 (2006).

44. Kusahara, M. *et al.* Mouse bone marrow-derived dendritic cells can phagocytize the *Sporothrix schenckii*, and mature and activate the immune response by secreting interleukin-12 and presenting antigens to T lymphocytes. *J. Dermatol.* **41**, 386–92 (2014).
45. Fujimura, T. *et al.* Local expression of migration inhibitory factor and Th1 type cytokine mRNA in sporotrichosis lesions. *Acta Derm. Venereol.* **76**, 321–2 (1996).
46. Ferreira, L. S. *et al.* Optimal clearance of *Sporothrix schenckii* requires an intact Th17 response in a mouse model of systemic infection. *Immunobiology* **220**, 985–92 (2015).
47. Plouffe, J. F., Silva, J., Fekety, R., Reinhalter, E. & Browne, R. Cell-mediated immune responses in sporotrichosis. *J. Infect. Dis.* **139**, 152–7 (1979).
48. Shiraishi, A., Nakagaki, K. & Arai, T. Role of cell-mediated immunity in the resistance to experimental sporotrichosis in mice. *Mycopathologia* **120**, 15–21 (1992).
49. Shiraishi, A., Nakagaki, K. & Arai, T. Experimental sporotrichosis in congenitally athymic (nude) mice. *J. Reticuloendothel. Soc.* **26**, 333–6 (1979).
50. Dickerson, C. L., Taylor, R. L. & Drutz, D. J. Susceptibility of congenitally athymic (nude) mice to sporotrichosis. *Infect. Immun.* **40**, 417–20 (1983).
51. Carlos, I. Z., Sgarbi, D. B., Angluster, J., Alviano, C. S. & Silva, C. L. Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *Sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease. *Mycopathologia* **117**, 139–44 (1992).
52. Koga, T. *et al.* Cytokine production of peripheral blood mononuclear cells in a patient with sporotrichosis in response to stimulation with sporotrichin. *Acta Derm. Venereol.* **74**, 328 (1994).

53. Chang, J. T., Wherry, E. J. & Goldrath, A. W. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat. Immunol.* **15**, 1104–15 (2014).
54. Antia, R., Ganusov, V. V & Ahmed, R. The role of models in understanding CD8+ T-cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 101–11 (2005).
55. Zens, K. D. & Farber, D. L. Memory CD4 T cells in influenza. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **386**, 399–421 (2015).
56. Kaech, S. M. *et al.* Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* **4**, 1191–8 (2003).
57. Huster, K. M. *et al.* Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5610–5 (2004).
58. Wherry, E. J., Barber, D. L., Kaech, S. M., Blattman, J. N. & Ahmed, R. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 16004–16009 (2004).
59. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–712 (1999).
60. Hamann, D. *et al.* Phenotypic and Functional Separation of Memory and Effector Human CD8+ T Cells. *J. Exp. Med.* **186**, 1407–1418 (1997).
61. Fearon, D. T., Manders, P. & Wagner, S. D. Arrested Differentiation, the Self-Renewing Memory Lymphocyte, and Vaccination. *Science (80-.)*. **293**, 248–250 (2001).
62. Matheu, M. P. *et al.* Imaging of effector memory T cells during a delayed-type hypersensitivity reaction and suppression by Kv1.3 channel block. *Immunity* **29**, 602–14 (2008).

63. Kaech, S. M. & Wherry, E. J. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity* **27**, 393–405 (2007).
64. Gebhardt, T. *et al.* Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* **10**, 524–30 (2009).
65. Jiang, X. *et al.* Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* **483**, 227–31 (2012).
66. Schenkel, J. M., Fraser, K. A., Vezys, V. & Masopust, D. Sensing and alarm function of resident memory CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* **14**, 509–513 (2013).
67. Turner, D. L. *et al.* Lung niches for the generation and maintenance of tissue-resident memory T cells. *Mucosal Immunol.* **7**, 501–10 (2014).
68. Sathaliyawala, T. *et al.* Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* **38**, 187–97 (2013).
69. Stary, G. *et al.* VACCINES. A mucosal vaccine against Chlamydia trachomatis generates two waves of protective memory T cells. *Science* **348**, aaa8205 (2015).
70. Hogan, R. J. *et al.* Protection from respiratory virus infections can be mediated by antigen-specific CD4(+) T cells that persist in the lungs. *J. Exp. Med.* **193**, 981–6 (2001).
71. Teijaro, J. R. *et al.* Cutting edge: Tissue-retentive lung memory CD4 T cells mediate optimal protection to respiratory virus infection. *J. Immunol.* **187**, 5510–4 (2011).
72. Schenkel, J. M. *et al.* T cell memory. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science* **346**, 98–101

(2014).

73. Park, C. O. *et al.* Staged development of long-lived T-cell receptor $\alpha\beta$ TH17 resident memory T-cell population to *Candida albicans* after skin infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2017). doi:10.1016/j.jaci.2017.09.042
74. Kaech, S. M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 749–61 (2012).
75. Anjuère, F. *et al.* Transcutaneous Immunization with Cholera Toxin B Subunit Adjuvant Suppresses IgE Antibody Responses Via Selective Induction of Th1 Immune Responses. *J. Immunol.* **170**, 1586–1592 (2003).
76. Datta, S. K. *et al.* Mucosal adjuvant activity of cholera toxin requires Th17 cells and protects against inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10638–43 (2010).
77. Meza-Sánchez, D., Pérez-Montesinos, G., Sánchez-García, J., Moreno, J. & Bonifaz, L. C. Intradermal immunization in the ear with cholera toxin and its non-toxic β subunit promotes efficient Th1 and Th17 differentiation dependent on migrating DCs. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2894–904 (2011).
78. Eriksson, K., Fredriksson, M., Nordström, I. & Holmgren, J. Cholera toxin and its B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1 and Th2 development. *Infect. Immun.* **71**, 1740–1747 (2003).
79. Williams, N. A., Hirst, T. R. & Nashar, T. O. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol. Today* **20**, 95–101 (1999).
80. Yamamoto, S. *et al.* A nontoxic mutant of cholera toxin elicits Th2-type responses for enhanced mucosal immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5267–72 (1997).
81. Schaffeler, M. P., Brokenshire, J. S. & Snider, D. P. Detection of precursor Th cells in mesenteric lymph nodes after oral immunization with protein

antigen and cholera toxin. *Int. Immunol.* **9**, 1555–62 (1997).

82. Lee, J.-B., Jang, J.-E., Song, M. K. & Chang, J. Intranasal delivery of cholera toxin induces th17-dominated T-cell response to bystander antigens. *PLoS One* **4**, e5190 (2009).
83. Gagliardi, M. C. *et al.* Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur. J. Immunol.* **30**, 2394–2403 (2000).
84. Sun, J. B., Rask, C., Olsson, T., Holmgren, J. & Czerkinsky, C. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by feeding myelin basic protein conjugated to cholera toxin B subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7196–201 (1996).
85. Rask, C. *et al.* Prolonged oral treatment with low doses of allergen conjugated to cholera toxin B subunit suppresses immunoglobulin E antibody responses in sensitized mice. *Clin. Exp. Allergy* **30**, 1024–1032 (2000).
86. Tamura, S., Shoji, Y., Hasiguchi, K., Aizawa, C. & Kurata, T. Effects of cholera toxin adjuvant on IgE antibody response to orally or nasally administered ovalbumin. *Vaccine* **12**, 1238–40 (1994).
87. Sun, J. B., Holmgren, J. & Czerkinsky, C. Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10795–9 (1994).
88. Braun, M. C., He, J., Wu, C. Y. & Kelsall, B. L. Cholera toxin suppresses interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor beta1 and beta2 chain expression. *J. Exp. Med.* **189**, 541–52 (1999).
89. George-Chandy, A. *et al.* Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen-presenting cells. *Infect. Immun.* **69**, 5716–5725 (2001).
90. Bromander, A., Holmgren, J. & Lycke, N. Cholera toxin stimulates IL-1

production and enhances antigen presentation by macrophages in vitro. *J. Immunol.* **146**, 2908–14 (1991).

91. Kawamura, Y. I. *et al.* Cholera toxin activates dendritic cells through dependence on GM1-ganglioside which is mediated by NF-kappaB translocation. *Eur. J. Immunol.* **33**, 3205–12 (2003).
92. Holmgren, J. & Lindholm, L. Cholera toxin, ganglioside receptors and the immune response. *Immunol. Invest.* **5**, 737–756 (1976).
93. Mesa-Arango, A. C. *et al.* Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of Sporotrichosis. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 3004–11 (2002).
94. Madrid, H. *et al.* *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Rev. Iberoam. Micol.* **26**, 218–22 (2009).
95. Alba-Fierro, C. A. *et al.* Immune Response Induced by an Immunodominant 60 kDa Glycoprotein of the Cell Wall of *Sporothrix schenckii* in Two Mice Strains with Experimental Sporotrichosis. *J. Immunol. Res.* **2016**, 1–15 (2016).
96. Fernandes, K. S., Coelho, A. L., Lopes Bezerra, L. M. & Barja-Fidalgo, C. Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their susceptibility to nitric oxide. *Immunology* **101**, 563–9 (2000).
97. Hernández-Santos, N. & Gaffen, S. L. Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host and Microbe* **11**, 425–435 (2012).
98. Tsa, H.-C., Velichko, S., Lee, S. & Wu, R. Cholera toxin enhances IL-17A production in both CD4+ and CD8+ cells via a cAMP/PKA-mediated IL-17A promoter activation. *Immunology* (2018). doi:10.1111/imm.12900
99. Joshi, N. S. *et al.* Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* **27**, 281–95 (2007).

100. Intlekofer, A. M. *et al.* Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* **204**, 2015–21 (2007).
101. Moulton, V. R., Bushar, N. D., Leiser, D. B., Patke, D. S. & Farber, D. L. Divergent generation of heterogeneous memory CD4 T cells. *J. Immunol.* **177**, 869–76 (2006).
102. Bingaman, A. W. *et al.* Novel phenotypes and migratory properties distinguish memory CD4 T cell subsets in lymphoid and lung tissue. *Eur. J. Immunol.* **35**, 3173–86 (2005).
103. Romo-Lozano, Y., Hernández-Hernández, F. & Salinas, E. Mast cell activation by conidia of *Sporothrix schenckii*: role in the severity of infection. *Scand. J. Immunol.* **76**, 11–20 (2012).